دراسة تحلل المبيدين Atrazin و 2,4-D بعزلات بكتيرية مطفرة

كريم عبيد حسن
كلية الزراعة / جامعة بغداد

الخلاصة

استحصلت عزلات بكتيرية من 25 عينة تربة زراعية ملوثة بالمبيدات ، اختبرت قابليتها في تحلل مبيدي Atrazin و 2,4–D . اختيرت عزلتين بكتيريتين قادرتين على تحلل المبيدين ، عزلت وشخصت باستعمال الاوساط الزرعية والاختبارات الكيموحيوية.

اظهرت النتائج ان العزلتين البكتيريتين المشخصة هي : Esherichia coli رمزها B6 ، والاخرى بكتريا Pseudomonas flurescance رمزها B13 ، حضنت البكتريا مع تراكيز متزايدة من المبيدين (5.0–17.5) ملغرلم. لتر-1 لمبيد الاترازين و (5.0-20.0) ملغرام. لتر-1 لمبيد 2,4–D . ازدادت نسبة التحلل تدريجياً مع زيادة التراكيز وبلغت اعلى نسبة تحلل (70و60)% للعزلتين B13 و B6 على التوالي ، عند التركيز 12.5 ملغرام. لتر-1 لمبيد الاترازين ، وان اعلى نسبة تحلل لمبيد 2,4–D (73 و 61)% عند التركيز 15.0 ملغرام. لتر-1 بعد فترة حضن خمسة ايام. تم الحصول على عدد من الخلايا الطافرة باستعمال الكيمياوي (النايتروزوكوانيدين) بتركيز 500 مايكروغرام. مللتر-1 بمدد زمنية مختلفة (0.5 ، 1.0 ، 1.5 ، 2.0)ساعة.

بينت النتائج ان مدة ساعة واحدة كافية لاستحداث الطفرة في البكتريا ، اذ زادت نسبة التحلل (93 و89)% لمبيد الاترازين للعزلات (B13C6 و B6C3) على التوالي عند التركيز 12.5 ملغرلم. لتر-1 و (97 و93)% لمبيد 2,4–D عند التركيز 15.0 ملغرام. لتر-1 .جرى تحييد بلازميدات العزلات البكتيرية (B13C6 و B6C3) لتحديد العوامل الوراثية المسؤولة عن تحلل المبيدات المستعملة بواسطة مادة (الاكردين البرتقالي) ومادة (كبريتات دوديسيل الصوديوم) (SDS) ونتج عن ذلك تحييد خلايا العزلتين (B13C6 و B6C3) الطافرة باستعمال 2500 مايكروغرام. مللتر-1 من مادة (SDS) و 200 مايكروغرام مللتر-1 من صبغة الاكردين البرتقالي.

الكلمات المفتاحية : تحليل مبيد Atrazin ، مبيد 2,4-D ، بكتريا مطفرة ، تلوث

المقدمة

يعد تلوث لـاه احـد المشـاكل البيئيـة
ذ ان بعـض اسـباب هـذه المشـاكل ،
الإاد الكيميائيـة والصـناعية ونفايـات
المجاىافة الى نفايات العمليات الزراعيـة.
ـدات احـد اهـم المركبـات الكيميائيـة
المستعملة في الزراعة في معظم بلدان العالم.
ونتيجة للعمليات الزراعية خلفت [illegible] من
[illegible] ومخلفاتها [illegible] طريقها الى المحيط
الحيوي وتعد سامة لمعظم الكائنات الحية فضلاً عن ان بعضها مواد مسرطنة Carcinogenic ولها قابلية الانتقال في السلسلة الغذائية. عتمدت معظم الدول التي تعاني مشكلة تلوث التربة والمياه بمخلفات المبيدات على طرق طبيعية آمنة صحياً ولا تمثل عبئاً جديداً على البيئة المثقلة بالملوثات ، اذ تعد الطريقة البايولوجية Bioremedation من افضل الطرق لمعالجة الترب والمياه الملوثة ذلك لانها لا تترك بقايا لمكونات ذلك الملوث ولا تترك اثار جانبية لمركبات سامة تهدد البيئة كما في الطرق الكيميائية ، فضلاً عن انها طريقة غير مكلفة

(Atlas and Bartha , 1993). لقد تطور مفهوم التحلل الحيوي Biodegradation على فترات زمنية مختلفة تخللتهاافات و تطوير اساليب جديدة لاستهلاك المبيدوعزل وتشخيص انواع مختلفة من الاحياء المجهرية لها حلل المبيدات ومواد اخرى كمصدر وحيد للطاقة ، اذ تؤدي البكتريا دوراً مهماً في التربة بسبب امتلاكها خصائص ايضية وانزيمية تمكنها من مقاومة ظروف التربة ، ويحتل جنس Pseudomonas المرتبة الاولى بين الاحياء المجهرية من حيث قابليتها على انتاج انزيمات تحلل اعقد المركبات الكيميائية المتواجدة في التربةلوسط (المصلح والحيدري ، 1985).

التطفير Mutagensis هو التغيير الذي تتعرض له المادة الوراثية (DNA) والذي يمكن ان يتسبب عند التعرض لعوامل مطفرة مختلفة منها كيميائية أو فيزيائية او حيوية ، وهذا التغيير يؤدي الى حدوث اخطاء وتتعتيز في جينوم الخلية عند تضاعفه Kuroda and ; Hertog et al., 1997) (Hara, 1999 . ذكر Thomas (2000) , ان وظيفة البلازميدات Plasmids يمكن ان تشفر الى فعاليات خلوية مختلفة توفر للبكتريا فائدة انتخابية في الوسط الذي تعيش فيه ، اذ يمكن زميدات ان تحمل الجينات الخاصة بضراوة ريا كالجينات المسؤولة عن انتاج السموم الداخلية enterotoxins المختلفة وجينات المقاومةلحيوية المتنوعة او انتاج المضادات وغيرها ، ومنها بلازميدات تفكك وتحلل المركبات المنتشرة في مدى واسع في البيئة . وبناءاً على ما تقدم هدفت الدراسة الى: الحصول علىات بكتيرية مطفرة لزيادة قدرتها على تحلل المبيدات الملوثة للتربة والماء والتحري عن المحددات الوراثية المسؤولة عن التحلل باستعمال تحييد البلازميدات.

المواد وطرائق العمل

تم الحصول على 25 عينة تربة من مناطق زراعية معرضة للتلوث بالمبيدات الزراعية ، وضعت العينات في قناني زجاجية معقمة ونقلت الى المختبر. اخذ 0.5 غرام من كل عينة تربة ووضع في دوارق سعة 250 مللتر والتي تحتوي على 50 مللتر من وسط الاملاح المعدنية والذي حضر من : 1.2 غرام K2HPO4 و 1 غم KH2PO4 و 0.5 غرام NH4NO3 و 0.02 غرام CaCl2.2H2O و 0.2 غرام MgSO4.7H2O و 0.05 غرام FeSO4.7H2O . اذيبت هذه المكونات في 800 مللتر من الماء المقطر وعدل الرقم الهيدروجيني الى 7 ثم اكمل الحجم الى 1 لتر وبعد تعقيمه جرى اضافة المبيدين Atrazin و 2,4-D بتركيز 0.5 ملغرام لتر-1 كمصدر وحيد للكاربون والطاقة. ولاجل تحضير الوسط الصلب اضيف 20 غرام من الاكر.حضنت الدوارق بدرجة حرارة 30 م لخمسة ايام ، بعدها جرى نشر 1 مللتر من الوسط السائل على وسط الاملاح الصلب الحاوي على المبيدين ، وبعد 24 ساعة من الحضانة ظهرت المستعمرات البكتيرية.

عزل وتشخيص البكتريا :

بعد الحصول على مستعمرات مفردة من البكتريا المعزولة جرى نقلها الى وسط (MacConkey Agar) لاختبار قابلية البكتريا على تخميرها لسكر اللاكتوز ، اذ حضنت العينات بدرجة حرارة 30 م لمدة 24 ساعة ثم نقلت الى وسط الاكار المغذي Nutrient agar . جرى عمل شريحة مصبغة بصبغة كرام حسب (Atlas et al., 1995) لملاحظة لون وشكل الخلايا بعد فحصها بالمجهر الضوئي.

الاختبارات الكيموحيوية:

اجريت الاختبارات الاتية : اختبار الاوكسيديز ، اختبار الكاتاليز ، اختبار الحركة ، اختبار اليوريز ، اختبار الاندول ، اختبار احمر المثيل

، استهلاك السترات (Mac Faddin, 2000) ، فضلاً عن استعمال الاوساط الزرعية الانتخابية والتشخيصية في تنمية البكتريا مثل وسط الستيرمايد الصلب ، وسط King B, A .

تحضير اللقاح البكتيري :

استعمل وسط نقيع الدماغ والقلب السائل لتنشيط العزلات البكتيرية ، اذ حضر في 50 مللتر من الماء المقطر في دورق 250 مللتر وعقم بالموصدة ، لقح الوسط بالعزلات البكتيرية المنماة على وسط الصلب لمدة 24 ساعة وحضنت بدرجة حرارة 30 م واخذ 0.5 مللتر من اي ذو الكثافة الضوئية 0.6 على طول موجي 550 نانومتر لتلقيح الاوساط في التجارب اللاحقة.

الفقدان الكمي للمبيدات:

جرى دراسة الفقد الكمي للمبيد في وسط الاملاح والملقح بالبكتريا ، اذ بعد ثلاثة ايام من الحضانة واجراء الطرد المركزي للوسط على سرعة 6000 دورة. دقيقة-1 لمدة 0.5 ساعة واهمال الراسب ، اخذ الراشح وجرى قياس الامتصاصية للمبيد باستعمال جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer (Grite et al., 2004).

تطبيع العزلات لزيادة قدرتها على تحلل المبيد :

درست قدرة العزلات البكتيرية المتحملة للعزلة Pseudomonas fluorescens و Escherichia coli على تحلل المبيد بعد تنميتها على وسط الإملاح المضاف اليه المبيد بتركيز (5 ، 7.5 ، 10.0 ، 12.5 ، 15.0 ، 17.5 و 20.0) ملغرام. لتر-1 مصدر وحيد للكاربون والطاقة ، حضنت الاوساط بدرجة حرارة 30 م لمدة ثلاثة ايام ، ثم جرى قراءة الامتصاصية ، حسب الفقدان الكمي للمبيد وحددت نسبة التحلل لذلك العدد الحي للخلايا بعد اجراء عدة تخافيف عشرية وقورنت النتائج للعزلات حسب (Arai et al., 1999).

التطفير باستعمال النايتروزوكوانيدين:

اتبعت الطريقة الموصوفة من قبل Gerhardt et al., (1981) باستعمال 2 مللتر من المطفر N-methyl-N-nitro-N-) nitrosoguanidine) (NTG) بتركيز 500 مايكروغرام. مللتر-1 ، اذ حضر محلول خزين من مادة (NTG) بتركيز 1 ملغرام. مللتر-1 (اذيب 0.1 غرام في 100 مللتر من الماء المقطر) ثم خفف المحلول لتحضير محلول بتركيز 500 مايكروغرام. مللتر-1 ، ووضع المحلول في قنينة زجاجية محكمة ومغلفة بورق الالمنيوم لتجنب تأثره بالضوء.كررت المعاملة بالمطفر (NTG) بتركيز 400 مايكروغرام. مللتر-1 ولفترات حضن تراوحت (1-2) ساعة ثم اختيرت المعاملة التي اعطت نسبة قتل 90% وجرى حساب عدد الخلايا المتبقية ومنها حسبت نسبة القتل بتطبيق القانون الاتي :

النسبة المئوية للقتل = (عدد الخلايا الاصلية – عدد الخلايا المتبقية) / عدد الاخلايا الاصلية × 100

ثم اختبرت قابلية العزلات المطفرة على تحلل المبيد وقورنت مع نموذج السيطرة.

ولتحديد الجرعة اللازمة من المطفر الكيميائي (NTG) للحصول على طافرات من العزلات قيد الدراسة استخدم المطفر بتركيز 500 مايكروغرام. مللتر-1 وبفترات زمنية (0.5 ، 1.0 ، 1.5 ، 2.0) ساعة على اعتبار ان الجرعة حاصل تأثير فترة التعرض والتركيز على اساس نسبة قتل للخلايا مقدرة 90% وهي النسبة اللازمة لتحفيز المادة الوراثية باتجاه زيادة نسبة الطفرات المتولدة.

تحييد البلازميدات :

اتبعت الطريقة الموصوفة من قبل Maniatis et al., (1982) في تحييد بلازميدات الخلايا البكتيرية باستعمال صبغة الاكردين البرتقالي

وبروميد الاثيديوم ومادة Sodium Dodecyl Sulphate (SDS) وبالتراكيز الاتية : صبغة الاكردين البرتقالي (0.05 ، 0.10 ، 0.20 و 0.3) ملغرام. مللتر-1 ، اما صبغة بروميد الاثيديوم (0.1 ، 0.2 ، 0.3 و 0.4) ملغرام. مللتر-1 ومادة (SDS) (0.1 ، 1.5 ، 2.0 ، 2.5) ملغرام. مللتر-1.لقحت الانابيب بـ 100 مايكروليتر من المزروع البكتيري وبعد التحضين لمدة 24 ساعة، قورنت كثافة النمو في الانابيب الحاوية على تراكيز مختلفة من العوامل المحيرة مع السيطرة بدون بكتريا تم ملاحظته بالعين المجردة.

النتائج والمناقشة

عزل البكتريا المحللة للمبيدات:

اظهرت النتائج قابلية 10 عزلات بكتيرية على تحلل المبيدين مع وجود تباين في قابليتها على التحلل الجدول (1) واستناداً الى نتائج التحلل اختيرت العزلات (B1 ، B5 ، B6 ، B13) التي تميزت بنسب تحلل ونمو اعلى مقارنة ببقية العزلات على الرغم من انها تعود الى اجناس مختلفة حسب الصفات المظهرية للمستعمرات وطبيعة نموها على الاوساط الغذائية الصلبة. تميزت العزلة B13 باعلى نسبة تحلل 65 و 69% لمبيدي الاترازين و 2,4-D على التوالي والعزلة B6 60% و 64% لمبيدي الاترازين و 2,4-D على التوالي كما في الجدول (1) استناداً الى تقدير الامتصاصية كدليل على تحلل المبيدات كونهما يعطيان اعلى قيمة للامتصاصية عند اعلى نسبة تحلل حسب ما جرى تحديده من خلال المحاليل القياسية (Grit et al., 2004). اذ ان هذه الطريقة التي اتبعت في غربلة العزلات البكتيرية اتصفت بالسرعة والكفاءة في تحديد العزلات الكفوءة في تحلل المبيدين والاستدلال عليها عن طريق متابعة التحلل في وسط الاملاح المغذي.

جدول (1) تحلل المبيدين بواسطة نمو عزلات بكتيرية مختلفة في وسط الأملاح الحاوي على المبيدين (Atrazine و 2,4-D)

رمز العينة	الامتصاصية في وسط مبيد الاترازين بتركيز 5 ملغرام. لتر-1	نسبة تحلل المبيد (%)	الامتصاصية في وسط مبيد 2,4-D بتركيز 5 ملغرام. لتر-1	نسبة تحلل المبيد (%)
B1	0.22	25	0.51	52
B2	0.10	10	0.11	13
B3	-	0	-	0
B4	-	0	-	0
B5	0.61	50	0.43	30
B6	0.65	60	0.66	64
B7	-	0	-	0
B8	0.43	30	0.25	28
B9	0.37	26	0.22	25
B10	0.14	14	0.43	30
B11	0.11	12	0.15	15
B12	-	0	-	0
B13	0.67	65	0.70	69
B14	0.31	35	0.37	26
B15	-	0	-	0

B- رمز للعزلة . (0.1 – 0.2) نمو ضعيف ، (0.3 – 0.4) نمو متوسط ، (0.5 – 0.7) نمو عالي ، - عدم وجود نمو.

تشخيص العزلات الكفوءة في تحلل المبيدين:
امكن تشخيص عزلتين بكتيريتين حسب المفتاح التشخيصي المقترح من قبل Holt et al., (1994) وكما يلي :الصفات المظهرية ، ظهرت الخلايا البكتيرية عند الفحص بالمجهر الضوئي بعد تصبيغها بصبغة كرام حمراء اللون وبشكل عصوية الشكل وهناك تفاوت في احجامها .
الاختبارات الكيموحيوية :
تفاوتت هاتين العزلتين في الاستجابة للاختبارات (اختبار الاوكسيديز ، الحركة ، الاندول ، اليوريز ، احمر المثيل ، الفوكس بروسكاور ، استهلاك السترات) . اظهرت نتائج التشخيص لبكتريا B6 انها موجبة مع كل من اختبار الاندول واحمر المثيل والكاتليز والحركة ، في حين اعطت نتائج سالبة في اختبار الاوكسيديز واستهلاك السترات والفوكس بروسكار واليوريز. في حين اظهرت العزلة الاخرى(B13) انها موجبة لاختبار الاوكسيديز والفوكس بروسكاور واختبار السترات. وسالبة لاختبار الاندول ، و اظهر الفحص المجهري ان العزلة كانت على شكل خلايا عصوية قصيرة مفردة او بشكل سلاسل ، قادرة على الحركة ، ظهرت مستعمرات هذه العزلة منتظمة الشكل خضراء مصفرة متفلورة على وسط King B فضلاً عن قدرتها على النمو في درجة حرارة 4 م ولم تتمكن من النمو بدرجة حرارة 41م ، الجدول (2) وهي غير مخمرة لسكر اللاكتوز . واستناداً لذلك امكن تشخيص العزلتين البكتيريتين الى الانواع الاتية :

Escherichiacoli = B6
Pseudomonas mfluorescens =B13

جدول (2) نتائج الاختبارات الكيموحيوية للعزلات المنتخبة

رمز العزلة / الاختبارات الكيموحيوية	استهلاك سكر اللاكتوز	صبغة كرام	الاوكسيديز	الكاتليز	الاندول	احمر المثيل	الفوكس بروسكاور	الستريت	الحركة	انتاج الصبغات
B6	+	سالبة	-	+	+	+	-	-	+	-
B13	-	سالبة	+	+	-	-	+	+	+	+

تطبيع البكتريا على المبيدين:
اظهرت النتائج ان في نسبة تحلل المبيدين وكذلك العدد الكلي للخلايا الحية عند التركيز 5 ملغم . لتر$^{-1}$ الجدولين (3 و 4) اذ بلغت نسبة التحلل (65 و54)% لمبيد الاترازين و (50 و 38)% لمبيد 2,4-D للعزلة B13 و B6 على التوالي. مع زيادة تدريجية في نسبة التحلل للمبيدين وكذلك العدد للخلايا البكتيرية للعزلة B13 ، B6 وبلغت اعلى نسبة لتحليل مبيد الاترازين (70 و 60)% عند التركيز 12.5 ملغرام. لتر$^{-1}$ واعلى نسبة تحلل لمبيد 2,4-D (73 و 61)% للعزلتين B13 و B6 على التوالي عند التركيز 15.0 ملغرام. لتر$^{-1}$. ان هذه النتائج تظهر قدرة العزلات المذكورة على التطبع لزيادة في تحلل المبيدات وبالتراكيز المذكورة ، في حين لوحظ انخفاض التحلل والعدد الحي للخلايا البكتيرية B13 و B6 نتيجة لتثبيط نمو البكتريا ، اذ ان اعلى تركيز للمبيدين يسمح لنمو البكتريا فيه كمصدر وحيد للكاربون والطاقة هو (12.5 و 15.0) ملغرام. لتر$^{-1}$ على التوالي. بينت النتائج ان اكفأ العزلات في تحلل المبيدين هي العزلة B13 والتي اعطت اعلى نسبة تحلل ومن ثم العزلة B6. ان التعرض المتدرج للخلايا البكتيرية لتراكيز متزايدة لهذه المبيدات قد ادى الى حدوث تغيرات تركيبية وفسلجية لها علاقة بالاغلفة البكتيرية ومستوى نفاذيتها للمبيدات او حدوث تغيرات في الجينات التنظيمية الخاصة بالتعبير الوراثي مما ادى الى زيادة نسبة التحلل (Arai et al., 1999).
تأثير المطفرات الكيميائية في قدرة العزلات البكتيرية في تحلل المبيدات:
اظهرت نتائج استخدام المطفر (NTG) لمدة ساعة واحدة ، حقق نسبة القتل المذكورة ، اذ اختبرت بعد ذلك الصفات المطلوبة المتمثلة بالنمو وتحلل المبيدات وتبين ان ستة طوافر

للعزلة B6 التي تعود لـ E. coli ، وتسعة طوافر للعزلة B13 التي تعود الى *P. fluorescens* اعطت نتائج موجبة من خلال تغير صفاتها المظهرية زراعية ، اذ قل انتاجها للصبغات ، فضلاً عن اختبار صفة تحلل المبيدات ، بينت النتائج ان ثلاثة طوافر للعزلة B6 وخمسة طوافر للعزلة B13 تفوقت في كفائتها فيحلل المبيدات مقارنة بالعزلات الاولية. اذ تميزت العزلات الطافرة بزيادة تحللها لمبيد الاترزين و 2,4-D وزادت نسبة التحلل اذ بلغت (93 ، 89)% لمبيد الاترازين عند التركيز 12.5 ملغرام لتر$^{-1}$ للعزلة B13C6 و B6C3 وتحلل مبيد 2,4-D بنسبة (97 ، 93%) عند التركيز 15.0 ملغرام لتر$^{-1}$ للعزلات B13C6 و B6C3 على التوالي ، الجدول (5) ، اذ تعد زيادة الجرعة المستعملة في قتل الخلايا وتحفيز الخلايا المتبقية حدوث الطفرات ، لذا تم الحصول على طفرات من العزلات (B6 ، B13) باستعمال المطفر (NTG) الذي سبب زيادة في قدرة العزلات الطافرة على تحلل المبيدات مقارنة بالعزلات (غير الطافرة) . ان المطفر الكيميائي (NTG) يحدث طفرة تحول Transition mutation باستبدال قاعدة بيورين على احد شريطي الـ DNA بقاعدة بيورين اخرى او استبدال قاعدة بيرميدينية على احد شريطي الـ DNA بقاعدة بايرميدينية اخرى ويؤدي ايضا حدوث طفرة الحذف (Synder and Champness, 1997)

جدول (3) تأثير التراكيز المتدرجة من مبيد الاترازين في قدرة العزلات البكتيرية على تحلل المبيد والعدد الكلي للخلايا الحية البكتيرية

نسبة تركيز المبيد / رمز العزلة	5 ملغرام لتر$^{-1}$			7.5 ملغرام لتر$^{-1}$			10.0 ملغرام لتر$^{-1}$			12.5 ملغرام لتر$^{-1}$			15.0 ملغرام لتر$^{-1}$			17.5 ملغرام لتر$^{-1}$		
	التركيز المتبقي %	نسبة التحلل %	Cfu X 10^6	التركيز المتبقي %	نسبة التحلل %	Cfu X 10^6	التركيز المتبقي %	نسبة التحلل %	Cfu X 10^6	التركيز المتبقي %	نسبة التحلل %	Cfu X 10^6	التركيز المتبقي %	نسبة التحلل %	Cfu X 10^6	التركيز المتبقي %	نسبة التحلل %	Cfu X 10^6
B6	46	54	25	41	59	48	58	40	47	60	40	51	54	46	4	52	54	4
B13	40	60	29	37	63	35	65	30	51	70	30	51	68	32	13	61	39	13

جدول (4) تأثير التراكيز المتدرجة من مبيد 2,4-D في قدرة العزلات البكتيرية على تحلل المبيد والعدد الكلي للخلايا الحية البكتيرية

نسبة تركيز المبيد / رمز العزلة	5 ملغرام لتر$^{-1}$			7.5 ملغرام لتر$^{-1}$		10.0 ملغرام لتر$^{-1}$		12.5 ملغرام لتر$^{-1}$		15.0 ملغرام لتر$^{-1}$			17.5 ملغرام لتر$^{-1}$			20.0 ملغرام لتر$^{-1}$		
	التركيز المتبقي %	نسبة التحلل %	Cfu X 10^6	التركيز المتبقي %	نسبة التحلل %	التركيز المتبقي %	نسبة التحلل %	التركيز المتبقي %	نسبة التحلل %	التركيز المتبقي %	نسبة التحلل %	Cfu X 10^6	التركيز المتبقي %	نسبة التحلل %	Cfu X 10^6	التركيز المتبقي %	نسبة التحلل %	Cfu X 10^6
B6	62	38	31	55	45	50	50	47	53	39	61	56	48	52	61	55	45	14
B13	50	50	32	47	53	41	59	36	64	27	73	59	39	61	59	52	48	16

جدول (5) اختبار العزلات البكتيرية الطافرة في تحلل المبيدين

رمز العزلة البكتيرية	نسبة تحلل مبيد الاترازين %	نسبة تحلل مبيد 2,4-D %
B6C1	84	88
B6C2	82	88
B6C3	89	93
B6C4	87	86
B6C5	83	82
B6C6	88	90
B13C1	83	88
B13C2	87	94
B13C3	85	80
B13C4	80	86
B13C5	81	88
B13C6	93	97
B13C7	80	91
B13C8	82	87
B13C9	84	90

تحييد البلازميدات:

اوضحت النتائج ان اعلى تركيز من مادة الاكردين البرتقالي ومادة SDS الذي ظهر فيه نمو لوحظ مجردة هو 200 مايكروغرام مللتر$^{-1}$ و 2500 مايكروغرام مللتر$^{-1}$ لكل من هذه المواد على التوالي. اشارت النتائج الى الحصول على خلايا محيدة للعزلتين B13C6 باستعمال مادة SDS وصبغة الاكردين البرتقالي الجدول (6) اذ تميزت العزلات المحيدة بفقدان قدرتها على النمو عند تعرضها للمبيدين . وقد اشار Saha et al., (2000) الى نجاح تحييد عزلات *Pseudomonas spp.* باستعمال مادة SDS في حين أثبتت الدراسة التي قام بها Thkura et al., (2001) نجاح تحييد عزلات Pseudomonas spp. باستعمال مادة SDS في حين اثبتت الدراسة التي قام بها (Thkura et al., 2001) نجاح تحييد العزلات باستعمال صبغة الاكردين البرتقالي.

جدول (6). قابلية العزلات المحيدة على تحلل المبيدين

رمز العزلة	نسبة تحلل المبيدات	
	مبيد الاترازين	2,4-D
B13C6	-	-
B6C3	-	-

- لايوجد تحلل .

المصادر

المصلح ، رشيد محجوب ، والحيدري ، نظام كاظم. (1985). علم احياء التربة المجهرية ، جامعة بغداد . 480 صفحة.

Abdulrashid , N., and Clark , D.P. (1987). Isolation and genetic analysis of mutations allowing the degradation of furans and thiophenes by *Escherichia coli*.J. Bactoriol. 169 : 1267-1271.

Arai , H; Akahira , S; Ohishi , T. and Kudo , T. (1999). Adaptation

of *comamonas testosteroni* TA441 to utilization of phenol by spontaneous mutation of the gene for atrans – acting factor. Mol Microbiol. 33 , 1132-1140.

Atlas , R.M; Parks , L.C. and Brown , A.E. (1995). Laboratory manual of experimental microbiology . Mosby. London.

Atlas , R.M; and Bartha , R. (1995). Microbiol Ecology , Fundamentals and Applications. PP. 237-238 , 410. The Benjamin. Cummings, Canada.

Gerhardt , P. ; Murray , R.G.E. ; Cotsilow , R.N. ; Nester , E.W. ; Wood , W.A. ; Krieg , N.R. and Phillips , G.B. (1981). Manual of methods for general bacteriology . Section II, P.P. 221-242.

Grite , N. ; Riho , T. ; Liis , M. ; Maia , K., ; Frieder , S. and Hermann , J. H. (2004). Simultaneous Degradation of Atrazine and phenol by *Pseudomonas sp.* strain ADP : Effects of toxicity and adaptation. Appl. Environment Microbiol. 70 (4) : 1907-1912.

Haigler , B. , E.and Spain , J.,C. (1989). Dagradation of P – chlorotoluene by a Mutant of *Pseudomonas sp*. Strain Js6 . Appl. Environ. Microbiol. 55 : (2) : 372-379.

Hartog , M. G.L. ; Popple , G.V. and Verhcovea , D. (1997). Potentially Anticarcinogenic Secondary Metabolites of Fruit and Vegetables , Ed. F.A. Tomas – Barberan. Clarehdon Press : Oxford.

Holt , J.G.; Krieg , N.R. ; Sneath , P.H.A. ; Staley , J.T. and Williams , S.T. (1994). Berg's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed. Williams and Wilking . Maryland, USA.

MacFaddin , F.J. (2000). Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria , 3rd ed. Printed in United State of America .

Mantiatis , T. ; Fritsch , I.N. and Sambrook , J. (1982). Molecular cloning : A laboratory manual . Cold Spring, New York.

Synder , D. and Champness , W. (1997). Molecular genetic of Bacteria Mutation in Bacteria. PP. 75-103.

Thkura , I.S. ; Verma , P.K. ; Upadhaya , K.C. (2001). Involvement of plasmid in degradation of pentachloropenol by *Pseudomonas sp*. from a chemostat. Biochem. Biophys Res. Commun. 286 (1) : 109-130.

Thomas , C.M. (2000). The Horizontal Gene Pool. The Gordan and Breach Publishing Group. U.K.

A Study of The Degradation of Atrazin and 2,4-D Herbicide by Mutagenic Bacterial Isolates

Kareem Ubed Hasan
College of Agriculture
University of Baghdad

Abstract
Microbial isolates are isolated from 25 agricultural soil samples contaminated by herbicide. Their ability of degradation atrazin and 2,4-D herbicides are examined . Two isolates are chosen according to ability for degradation , then isolated and identified by using numbers of culture media and biochemical tests Results have indicated that the bacteria are *Escherichia coli* (B6) and *Pseudomonas fluorescens* (B13) , which have been incubated with a number of herbicides concentrations (5.0 -17.5) mg L^{-1} from atrazin and (5.0 -20.0) mg L^{-1} from 2,4-D.
Results have shown the degradation increases with increasing the concentrations (65 ، 60)% for isolate B6 , B13 respectively with 12.5 mg L^{-1} of atrazin and (73، 61)% of 2,4-D with 15.0 mgL^{-1} of atrazin and (73،61) % of 2,4-D with 15.0 mgL^{-1} after five days incubation.Chemical mutagen (Nitrosoguanidine) 500 µg mL^{-1} used to mutant bacteria cell with time (0.5 , 1.0 , 1.5 and 2.0) hr. one hour is enough to do that , there fore rasio degradation increases (93 , 89) % Atrazin of (B13C6 , B6C3) respectively in 12.5 mgL^{-1} and (97 , 93) % , 2,4-D in 15.0 mgL^{-1} . Achridin orange and sodium Dodecyl sulphate (SDS) are used to curined bacteria plasmids by 2500 µg mL^{-1} from (SDS) and 200 µg mL^{-1} from (Achridin orange). The results show (B13C6 , B6C3) became curing cells.

Key Words : Degradation of Atrazin , Degradation of 2,4 –D .