



The effects of pesticides on microbial population of saline soils using culture-dependent and next generation sequencing methods

Safoura Hashemi joker¹, Mahmoud Shavandi², Azam Haddadi¹, Ebrahim Alaie³

¹Department of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran. ²Assistant Professor, Microbiology and Biotechnology Group, Research Institute of Petroleum Industry. ³Environment and Biotechnology Research Division, Research Institute of Petroleum Industry, Tehran, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Despite of widely use of pesticides in agricultural industry, their ecotoxicological impacts on the environment are not still well understood. In the present study, the effects of chlorpyrifos and deltamethrin pesticides on soil microbial diversity in different salinities were investigated.

Materials and methods: Four soil samples with various salinities (0, 1%, 2% and 4%) were contaminated with 200 mg/kg of chlorpyrifos and deltamethrin. Then, the effects of these compounds were investigated by culture-dependent and Next Generation Sequencing (NGS) methods. The dominant bacterial strains were isolated and compared with the results of the NGS method.

Results: Remarkable groups of active soil species were destroyed. The main groups at the phylum level were, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* and *Actinobacteria*. Examination of the pattern of operational taxonomic unit (OTU) showed that the lowest abundance belonged to the group of soil samples contaminated with chlorpyrifos and the highest abundance belonged to the non-contaminated sample. Alpha diversity analysis revealed that the highest number of strains was observed in non-saline and uncontaminated soil microcosms, and the lowest number of strains was observed in the presence of deltamethrin (1% salinity) and chlorpyrifos (0% salinity).

Conclusion: The results indicated that soil salinity had significant impact on the resistance of soil microorganisms to the chlorpyrifos and deltamethrin. Every soil samples will have its own microbial composition based on its physicochemical conditions under the influence of pesticide contamination. By comparison of microbial composition by culture-dependent and molecular-based methods, almost similar findings were obtained.

Keywords: Soil microbial composition, Next Generation Sequencing, chlorpyrifos, deltamethrin, Soil Salinity.

Received: 4 December 2020

Revised: 27 January 2021

Accepted: 11 April 2021

Correspondence to: Mahmoud Shavandi

Tel: +98 21-48255166

E-mail: shavandim@ripi.ir

Journal of Microbial World 2021, 14(1): 21-34

DOI: 10.30495/jmw.2021.690437



Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.



تاثیر سموم آفت کش بر جمعیت میکروبی خاک های شور به کمک روش های وابسته به کشت و توالی یابی نسل جدید

صفورا هاشمی جوکار^۱، محمود شوندی^{۲*}، اعظم حدادی^۱، ابراهیم علایی^۲

^۱ گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران.
^۲ پژوهشکده محیط زیست و بیوتکنولوژی، پژوهشگاه صنعت نفت، تهران، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: علی رغم استفاده گسترده آفت کش ها در صنعت کشاورزی، تأثیرات مخرب زیست محیطی آنها مورد مطالعه قرار نگرفته است. در پژوهش حاضر، تأثیر آفت کش های کلرپیریفوس و دلتامترین بر تنوع میکروبی خاک در شوری های مختلف بررسی شد.

مواد و روش ها: چهار نمونه خاک با شوری های مختلف (صفر، ۰.۱٪، ۰.۲٪ و ۰.۴٪) به میزان 200 mg/kg از هر یک از ترکیبات کلرپیریفوس و دلتامترین آلوده شدند. تأثیرات مخرب این آفت کش ها بر جمعیت میکروبی خاک به کمک روش های وابسته به کشت و توالی یابی نسل جدید (NGS) بررسی شد. در ادامه، باکتری های شاخص، جداسازی و با نتایج حاصل از روش توالی یابی نسل جدید مقایسه شد.

یافته ها: درصد بالایی از گونه های فعال خاک در اثر این آفت کش ها از بین رفتند. گروه های اصلی در سطح شاخه فرمیکوتس ها، پروتوباکترها، باکتریوئیدها و اکتینوباکترها بودند. بررسی الگوی واحدهای عملکردی تاکسونومیک (OTU) در بین نمونه ها نشان داد که کمترین فراوانی مربوط به گروه نمونه های خاک آلوده به کلرپیریفوس و بالاترین فراوانی مربوط به نمونه شاهد غیرآلوده بود. مقایسه با استفاده از آنالیز آلفا نیز نشان داد که بالاترین تعداد سویه ها در میکروکازم خاک غیر شور و غیرآلوده و پایین ترین تعداد سویه ها در حضور دلتامترین (۰.۱٪ شوری) و کلرپیریفوس (۰٪ شوری) مشاهده شد.

نتیجه گیری: نتایج بدست آمده حاکی از تأثیر قابل توجه شوری بر مقاومت میکروارگانیسم های موجود در خاک در حضور کلرپیریفوس و دلتامترین بود. هر یک از خاک های مورد مطالعه تحت تأثیر آلودگی سموم آفت کش بر اساس شرایط فیزیکی شیمیایی خود، جمعیت میکروبی اختصاصی خود را خواهد داشت و در بررسی آنها با روش های وابسته به کشت و روش های مولکولی یافته های تقریباً مشابهی بدست آمد.

واژگان کلیدی: جمعیت میکروبی خاک، توالی یابی نسل جدید، کلرپیریفوس، دلتامترین، شوری خاک.

پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۱/۲۲

ویرایش مقاله: ۱۳۹۹/۱۱/۸

دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۹/۱۴

مقدمه

حشرات خانگی، کشاورزی و امور دامپزشکی کاربرد گسترده ای دارند. ورود کنترل نشده این ترکیبات به محیط زیست تهدیدی برای سلامتی عمومی و اکوسیستم های طبیعی به شمار می آید. از سوی دیگر نرخ تجزیه پایین این ترکیبات موجب می شود که

حشره کش های ارگانوفسفره نظیر کلروپیریفوس به منظور کنترل

* آدرس برای مکاتبه: پژوهشکده محیط زیست و بیوتکنولوژی، پژوهشگاه صنعت نفت، تهران.
تلفن: ۰۲۱-۴۸۲۵۵۱۶۶
پست الکترونیک: shavandim@ripi.ir



درجه خطر کم‌تر نسبت به کلرپیریفوس هستند (۱۶). همچنین، تأثیر قابل توجه باکتری تجزیه‌کننده کلرپیریفوس بر رشد گیاهان در یک منطقه آلوده توسط اکبر و همکاران مورد مطالعه قرار گرفت (۱۷). با این وجود، نشان داده شده است که تنوع میکروبی خاک می‌تواند تحت تأثیر سم کلرپیریفوس باقی‌مانده در خاک قرار گیرد (۱۸). فانگ و همکاران نشان دادند که سم‌پاشی مداوم کلرپیریفوس منجر به افزایش نرخ تجزیه این ترکیب در خاک توسط جوامع میکروبی می‌شود. به این ترتیب، اثر مهاری کلرپیریفوس بر میکروارگانیزم‌ها به میزان قابل توجهی کاهش یافت (۱۹).

در مطالعه مونوز لوئز و همکاران نشان داده شده است که دلتامترین خاصیت مهاری بر تنفس میکروبی خاک تحت شرایط بی‌هوایی دارد. این در حالی است که پدیده فوق در حضور نیترات برطرف می‌شود (۲۰). در مقابل این نتایج، ویدنفالک و همکاران نشان دادند که دلتامترین بر تنفس جوامع میکروبی موجود در رسوبات تأثیر قابل توجهی ندارد (۲۱).

علاوه بر آن، نشان داده شده است که آلودگی خاک به دلتامترین موجب افزایش جمعیت میکروارگانیزم‌های تجزیه‌کننده دلتامترین می‌شود (۲۲). اخیراً، ژان و همکاران مسیرهای متابولیکی تجزیه‌سویه‌های مصرف‌کننده آفت‌کش‌های پایرتروئیدی را مورد بررسی قرار دادند، اما آن‌ها اقرار داشتند که دستیابی به یک روش زیست‌پالایی موثر، نیازمند اجرای یک مطالعه و پژوهش کامل بر میکروارگانیزم‌های تجزیه‌کننده پایرتروئیدها است (۹).

در مجموع، متأسفانه تاکنون پژوهش کاملی در زمینه تغییرات تنوع زیستی خاک پس از آلودگی به ترکیبات ارگانوفسفره و پایرتروئیدی صورت نگرفته است. با توجه به اینکه سموم آفت‌کش مورد استفاده در باغات و زمینهای کشاورزی از طریق آب‌های سطحی وارد نواحی با خاک‌های نسبتاً شور می‌شود، این پژوهش باهدف مطالعه تأثیر آلودگی آفت‌کش‌ها بر تنوع میکروبی خاک‌های با شوری‌های متفاوت به کمک روش توالی‌یابی نسل جدید به منظور شناسایی باکتری‌های اصلی

برای مدت طولانی در محیط ماندگاری داشته باشند (۱). مطالعات متعددی بر تأثیرات منفی این ترکیبات سمی بر سلامتی انسان صورت گرفته است (۲ و ۴). ریدانو و همکاران نشان دادند که بیان ژن گیرنده فاکتور رشد اندوتلیال (endothelial) عروقی، عروق پراکسیزوم گامای فعال شده، فاکتور القای هیپوکسی ۱-آلفا و β زیر واحد گنادوتروپین کوریونی (chorionic gonadotropin) انسان با قرار گرفتن در معرض کلرپیریفوس کاهش می‌یابد (۵).

هان و همکاران نیز اثبات کردند که با قرار گرفتن در معرض دلتامترین، سلول‌های کبد فیروز شده و منجر به افزایش تنش اکسیداتیو، فسفوریلاسیون Smad2/3 و فعال‌سازی دگرگونی فاکتور رشد $\beta 1$ می‌شود (۶). تأثیرات منفی دلتامترین بر رونویسی ژن‌های مغزی زنبورهای عسل نیز به اثبات رسیده است (۷).

علاوه بر آن، تلاش‌های بسیاری جهت پاکسازی این آلاینده‌ها از خاک و آب صورت گرفته است (۸). در این زمینه، روش‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی نامزدهای حذف و یا تجزیه ترکیبات ارگانوفسفره و پایرتروئیدی از بسترهای مختلف هستند (۳ و ۹ و ۱۱).

هرچند پژوهش‌های متعددی در زمینه آسیب‌های ترکیبات رایج ارگانوفسفره و پایرتروئیدی بر سلامت انسان و حیوانات و نیز پاکسازی آن‌ها از محیط زیست انجام شده است، اما تعداد کمی از آن‌ها بر تأثیرات سوء این آفت‌کش‌ها بر محیط زیست متمرکز شده است (۱۲ و ۱۳). بر اساس گزارشی کلرپیریفوس به عنوان عامل مهارکننده فرایندهای نیتریفیکاسیون میکروبی خاک شناخته شده است (۱۴). همچنین عنوان شده است که خواص فیزیکی-شیمیایی خاک در حضور کلرپیریفوس و دلتامترین تغییر می‌یابد (۱۵).

در پژوهشی دیگر، اثر آلودگی خاک به کلرپیریفوس بر جامعه میکروبی مورد مطالعه قرار گرفت و نشان داده شد که گونه استرپتومایسس قادر به تجزیه کلرپیریفوس به ۳،۵،۶-تری‌کلرو-۲-پاریدینول و دی‌اتیل فسفورتیوات است که ترکیباتی با

با روش اندازه‌گیری هدایت الکتریکی (Electrical Conductivity) تعیین شد. سپس نمونه‌های خاک با شوری صفر درصد (نمونه ۱۰)، شوری ۱ درصد (نمونه ۱)، شوری ۲ درصد (نمونه ۲) و شوری ۴ درصد (نمونه ۳) بر اساس دسته‌بندی موسسه کشاورزی امریکا برای خاک‌ها با شوری مختلف، به عنوان نماینده خاک‌های غیرشور، کم شور و لب شور انتخاب شدند.

ج) طراحی میکروکازم (*microcosm*): به منظور بررسی نحوه تأثیر آفت‌کش‌ها بر جمعیت میکروبی خاک، ابتدا میزان ۸۳ میلی‌گرم از آفت‌کش دلتامترین و کلریپریفوس (غلظت نهایی ۲۰۰ mg/kg از هر آفت‌کش در خاک) در ۲۵۰ میلی‌لیتر استون حل شده و به ۴۰۰ گرم از نمونه‌های خاک با درصد شوری مختلف (صفر، یک، دو و چهار درصد) اضافه و کاملاً همگن شد. پس از تبخیر حلال در زیر هود شیمیایی، نمونه‌های خاک آماده شده به ظرف‌های پلاستیکی (۲۰×۱۵ cm²) منتقل شدند (۲۵). به منظور تأمین نیترات و فسفات مورد نیاز باکتری‌های خاک، نمک‌های نیترات آمونیوم (۸ میلی‌گرم) و فسفات پتاسیم (۰/۸ میلی‌گرم) در ۸۰ میلی‌گرم آب مقطر استریل به خاک‌های آلوده به آفت‌کش‌های دلتامترین و کلریپریفوس و میکروکازم شاهد (حاوی استون خالص) افزوده شد. به منظور تبادل هوا منافذی بر روی در ظروف تعبیه شد. پس از آماده شدن ظروف وزن شده و به صورت هفتگی رطوبت از دست رفته با افزودن آب مقطر استریل جبران شد.

د) بررسی باکتری‌های خاک آلوده به روش وابسته به کشت: از هر یک از میکروکازم‌های تهیه شده، در فواصل زمانی مشخص (۳ هفته) به میزان یک گرم نمونه خاک برداشته شد. رقت‌های سریالی از نمونه‌ها تا رقت ۱۰^{-۱۰} تهیه شده و سپس در شرایط استریل ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت با استفاده از سمپلر به محیط‌های کشت جامد R2A با شوری‌های مشابه با هر کدام از خاک‌های آلوده به آفت‌کش (صفر درصد، ۱ درصد، ۲ درصد و ۴ درصد) کشت شد. پلیت‌های تلقیح شده به مدت یک هفته در دمای ۳۰ درجه‌ی سلسیوس گرمخانه گذاری شد.

تجزیه کننده این آفت‌کش‌ها در نمونه‌های خاک مختلف انجام شد و در نهایت نتایج حاصل شده با نتایج روش وابسته به کشت مقایسه گردید. دانش حاصل از این مطالعات علاوه بر روشن نمودن اثر ورود آفت‌کش‌ها بر جمعیت میکروبی خاک، در تعیین راهبرد رفع آلودگی این ترکیبات نیز موثر است.

مواد و روش‌ها

الف) منطقه‌ی مورد مطالعه و گردآوری نمونه: پس از تعیین نقاط نمونه برداری، به منظور مطالعه اثر آفت‌کش‌های دلتامترین و کلریپریفوس بر تنوع میکروبی خاک و نیز جداسازی باکتری‌هایی با قابلیت تجزیه این آفت‌کش‌ها، نمونه‌های خاک از ۱۰ منطقه‌ی مختلف از روستای رحمانیه، از توابع شهرستان اشتهارد استان البرز، از عمق ۲۰-۰ سانتی‌متری خاک به شعاع ۱۵ متر از سطح زمین به وسیله‌ی تجهیزات استریل تهیه شده و در ظروف استریل به آزمایشگاه منتقل شدند. مختصات منطقه‌ی جمع‌آوری نمونه‌های مورد پژوهش در جدول ۱ ارائه شده است. تمامی نمونه‌ها تا زمان شروع آزمون در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند (۲۳ و ۲۴).

جدول ۱: مشخصات و مختصات جغرافیایی مناطق نمونه‌برداری از زمین‌های زراعی روستای رحمانیه

نمونه	مختصات جغرافیایی	نمونه	مختصات جغرافیایی
۱	۵۰.۷۱۶۵۰	۶	۵۰.۷۱۲۲۳
۲	۵۰.۷۱۵۳۶	۷	۵۰.۷۱۰۹۷
۳	۵۰.۷۱۳۴۶	۸	۵۰.۷۱۱۳۱
۴	۵۰.۷۱۳۱۴	۹	۵۰.۷۱۱۸۳
۵	۵۰.۷۱۲۵۷	۱۰	۵۰.۷۱۴۳۲

ب) گزینش نمونه‌های مناسب به منظور بررسی تنوع میکروبی: برای اجرای مراحل بعدی پژوهش، شوری نمونه‌های خاک

داده و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

همچنین، بررسی تنوع بتا با کمک نرم افزار QIIME انجام گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌های جمع آوری شده شاخص در بین گونه‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS و با بهره‌گیری از آنالیز واریانس یک طرفه مورد مطالعه و تحلیل آماری قرار گرفت. مقادیر به دست آمده برحسب (میانگین \pm SD) بیان شده و مقادیر p کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

آنالیز بافت خاک در نمونه‌های مورد بررسی نشان داد که تمامی خاک‌ها تقریباً دارای حدود ۳۰٪ ماسه و بین ۴۰ تا ۵۰٪ سیلت بودند و لذا از نظر دسته‌بندی نوع خاک بر اساس استاندارد دسته‌بندی سازمان کشاورزی آمریکا (USDA) در دسته خاک‌های سیلتی - ماسه‌ای قرار می‌گیرند. جدول ۲ نحوه کدگذاری، شوری و نیز غلظت نمونه‌های DNA استخراج شده از میکروکازم‌ها را نشان می‌دهد. گروه C مربوط به سم کلرپیریفوس، گروه D مربوط به سم دلتامترین و گروه S مربوط به نمونه‌های شاهد است. این نمونه‌ها با شوری‌های مختلف صفر، یک، دو و چهار درصد مورد مطالعه قرار گرفتند.

جدول ۲: نامگذاری نمونه‌ها و غلظت DNA استخراج شده

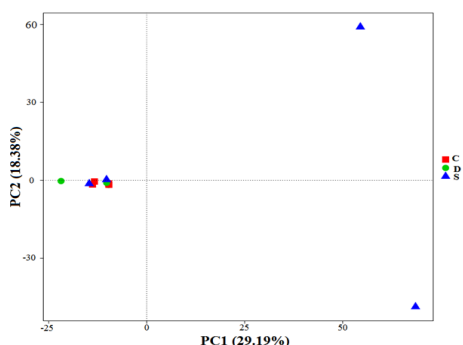
نمونه	آلاینده	شوری	غلظت DNA (ng/ μ L)
C1	کلرپیریفوس	٪۱	۶۶/۹
D1	دلتامترین	٪۱	۱۰۶/۱
C2	کلرپیریفوس	٪۲	۷۱/۲
D2	دلتامترین	٪۲	۱۱۰/۲
C3	کلرپیریفوس	٪۴	۱۰۱/۵
D3	دلتامترین	٪۴	۶۶/۷
C0	کلرپیریفوس	٪۰	۲۹۸/۵
D0	دلتامترین	٪۰	۱۲۳/۳
S1	-	٪۱	۱۷/۶
S2	-	٪۲	۲۲/۷
S3	-	٪۴	۱۹/۵
S0	-	٪۰	۷/۴

باکتری‌های غالب هر میکروکازم از بین تک‌کلنی‌های ایجاد شده بر روی محیط‌های کشت با رقت و شوری مختلف بر اساس خصوصیات مورفولوژیک انتخاب و خالص شدند. به منظور اطمینان از خلوص باکتری‌های جدا شده، جدایه‌ها ۳ مرتبه و به صورت خطی کشت داده شدند.

ه) استخراج DNA از نمونه‌های خاک: به منظور استخراج DNA از خاک، از کیت استخراج DNA (Macherey Nagel، آلمان) استفاده شد. نمونه‌های DNA بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شده و تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. قطعه‌ای به طول تقریبی ۴۰۰ نوکلئوتید از ناحیه V3-V4 ژن 16S rRNA با پلتفرم ایلومینا HiSeq 2500 توسط شرکت Novogene به روش توالی‌یابی نسل جدید تعیین توالی شدند (۲۶).

و) استخراج DNA از باکتری: جهت استخراج DNA ژنومی باکتری‌های خالص شده و شناسایی باکتری‌های تجزیه کننده آفت‌کش‌های دلتامترین و کلرپیریفوس، از کیت استخراج DNA از باکتری (NucleoSpin Microbial DNA kit، MN آلمان) استفاده شد. ژن 16S rRNA نمونه‌های DNA استخراج شده با کمک پرایمرهای اختصاصی این ژن موسوم به 9F (5'-AAGAGTTTGATCATGGCTCAG-3' و 15141R (5'-AGGAGGTGATCCAACCGCA-3') با روش PCR تکثیر شدند. محصولات PCR پس از خالص‌سازی، به صورت یک طرفه و بدون کلونینگ تعیین توالی شدند (شرکت میکروسنس سوئیس). جهت شناسایی جدایه‌ها از نرم افزار آنالیز Blast پایگاه EzTaxon استفاده شد.

ز) تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها: توالی‌های شناسایی شده با توالی‌های موجود در پایگاه داده ژن در NCBI مقایسه شدند و سویه‌های با ۹۸٪ شباهت یا بیشتر در توالی در یک گروه قرار گرفتند. به منظور محاسبه تنوع آلفا، پیچیدگی تنوع گونه‌ها از طریق شاخص‌های مختلفی از جمله Chao، ACE، شاخص شنون و شاخص سیمپسون که با استفاده از نرم افزار QIIME نسخه (۱.۸.۰) محاسبه و به کمک نرم افزار R (۲ و ۱۵) نشان



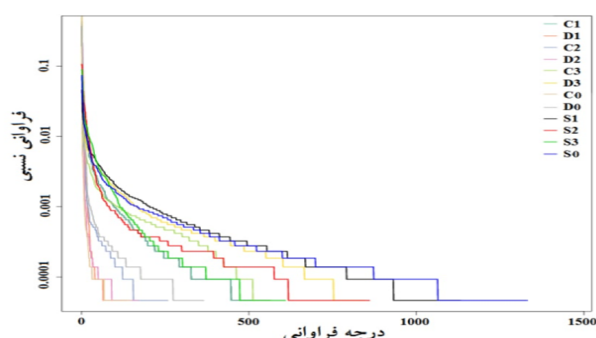
شکل ۲: آنالیز مؤلفه اصلی (PCA) در نمونه‌های خاک مورد مطالعه. S نمونه غیر آلوده؛ C نمونه آلوده به کلرپریفوس؛ D نمونه آلوده به دلتامترین.

نشان دهنده گروهی است که به آن تعلق دارد. در آنالیز مؤلفه اصلی به خوبی مشخص شد که با آلودگی خاک به آفت‌کش‌های کلرپریفوس و دلتامترین، فراوانی جامعه میکروبی نسبت به نمونه شاهد (S) تغییرات قابل توجهی داشته است. در عین حال، تغییر فراوانی در شوری‌های مختلف نیز در نمونه S به خوبی نشان داده شده است. بررسی همبستگی جمعیت میکروبی در خاک‌های مختلف با کمک تحلیل مؤلفه اصلی (PCA) نشان داد که گونه‌های مورد بررسی در خاک‌های مورد نظر دارای شباهت‌هایی زیادی به لحاظ فراوانی می‌باشند، اما در نمونه S تفاوت‌هایی به لحاظ جمعیت میکروبی با دیگر گروه‌ها مشاهده شد.

ب) مقیاس‌بندی چند بعدی غیرمتریک (NMDs): مقیاس‌بندی چند بعدی غیرمتریک (NMDs)، ناهمسانی بین گروه‌های مختلف را نشان داد. تجزیه و تحلیل MMDs یک مدل غیرخطی است که برای نمایش بهتر ساختار داده‌های بیولوژیکی غیرخطی با هدف غلبه بر نقص در روش‌های خطی طراحی شده است. شکل ۳ نمودار NMDs مربوط به نمونه‌های مختلف مورد بررسی را نشان می‌دهد. فاصله بین نقاط، میزان تغییر را معین می‌کند و رنگ نمونه‌ها مبین گروه مربوطه است. در این روش، زمانی که مقدار فاکتور استرس کمتر از ۰/۲ باشد، NMDs تا حدی قابل اعتماد در نظر گرفته می‌شود.

ج) بررسی تغییرات گونه‌ای در بین گروه‌ها: از آزمون‌های T و MetaStat برای سنجش تغییرات بین گروهی استفاده شد. نتایج

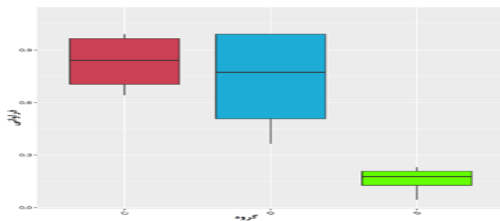
مطابق شکل ۱، الگوی واحدهای عملکردی تاکسونومیک (Operational taxonomic unit) نشان دهنده اختلافات قابل توجهی در فراوانی جوامع میکروبی بین گروه‌های مختلف است. همانطور که در شکل ۱ نشان داده شده است، کمترین فراوانی مربوط به گروه نمونه‌های خاک آلوده به کلرپریفوس است و بالاترین فراوانی در نمونه شاهد مشاهده شد. در عین حال، مشخص شد که شوری خاک نیز از جمله عوامل موثر بر تنوع میکروبی است. در گروه S1 بیشترین گونه‌های باکتریایی مربوط به اکتینوباکتر و پروتئوباکتر بود و در گروه S2، گونه‌های از مایکوباکتر مشاهده شد. بررسی‌ها در گروه خاک‌های آلوده به آفت‌کش‌های دلتامترین و کلرپریفوس نشان می‌دهد این گروه‌ها از نظر گونه‌های باکتریایی بسیار متفاوت می‌باشند و در برخی نمونه‌ها تعداد گونه‌های محدودی در این خاک‌ها باقی مانده‌اند.



شکل ۱: فراوانی نسبی OTUs در نمونه‌های خاک مورد مطالعه. S نمونه غیر آلوده؛ C نمونه آلوده به کلرپریفوس؛ D نمونه آلوده به دلتامترین.

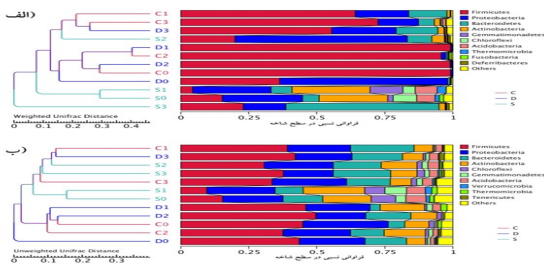
الف) تجزیه و تحلیل مؤلفه اصلی (Principal component analysis): شباهت جوامع میکروبی بین گروه‌های مختلف در شکل ۲ نشان داده شده است. PCA یک روش آماری برای استخراج مؤلفه‌ها و ساختارهای اصلی در داده‌ها با استفاده از کاهش ابعاد داده‌ها است. هرچه ترکیب جامعه در بین نمونه‌ها، شباهت بیشتری داشته باشد، فاصله نقاط داده‌های مربوطه در نمودار PCA نزدیک تر است. همچنین، هر نقطه نمونه‌ای را نشان می‌دهد که توسط مؤلفه اصلی دوم در محور Y و اولین مؤلفه اصلی در محور X ترسیم شده است که رنگ آن

گرفت. این یک روش آماری دقیق با توجه به فراوانی است. همچنین، اختلافات فراوانی مشاهده شده در بین گروه‌ها از طریق آزمون فرضیه چندگانه برای ویژگی‌های نمونه برداری پراکنده و نرخ کشف اشتباه (false discovery rate) مورد بررسی قرار گرفت. در عین حال، با بهره‌گیری از آزمون MetaState، فراوانی بین گروهی مربوط به ۱۲ گونه شاخص از نمونه‌ها مورد مقایسه قرار گرفت. همان گونه که در شکل ۵ نشان داده شده است، تفاوت کاملاً معنی داری بین گروه‌های آلوده C و D نسبت به نمونه شاهد S فاقد هرگونه آفت‌کشی، مشاهده می‌شود.



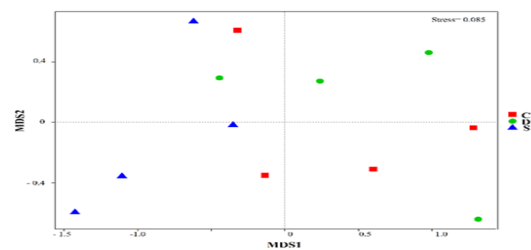
شکل ۵: تغییرات فراوانی گونه‌ای در نمونه‌های D و C نسبت به گروه S.S (نمونه غیر آلوده؛ C) نمونه آلوده به کلرپریفوس؛ (D) نمونه آلوده به دلتامترین.

بررسی تنوع میکروبی در سطح شاخه: با بررسی فراوانی نسبی جمعیت میکروبی در سطح شاخه مشخص شد که فرمیکتس‌ها، پروتئوباکتری‌ها، باکتروئیدها و اکتینوباکتری‌ها شاخه‌های اصلی در نمونه‌ها هستند که در حضور دلتامترین و کلرپریفوس حذف نشدند (شکل ۶). خطوط رنگی کنار نمودار نشان دهنده فاصله تنوع نمونه‌ها از یکدیگر است که تعیین می‌کند به چه میزان، به لحاظ تعداد گونه موجود (الف) و یا نوع گونه‌های موجود (ب) به هم شبیه و یا از هم متفاوتند.

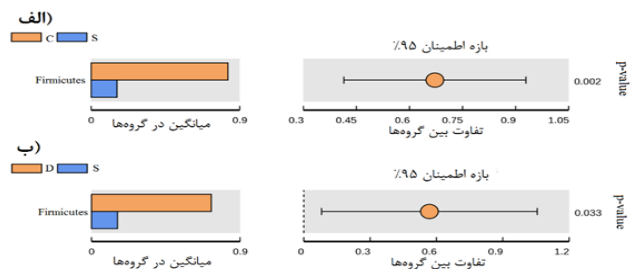


شکل ۶: فراوانی نسبی گونه‌ای در سطح شاخه. الف) بررسی تغییرات کمی و ب) بررسی تغییرات کیفی تنوع. (S) نمونه غیر آلوده؛ (C) نمونه آلوده به کلرپریفوس؛ (D) نمونه آلوده به دلتامترین.

این آنالیز حاکی از آن بود که بین گروه‌های S-C و S-D تفاوت معنی داری از لحاظ جامعه میکروبی بین گروهی وجود دارد. بدین معنی که آفت‌کش‌های مورد استفاده جمعیت میکروبی را به میزان قابل توجهی تغییر داده‌اند. به عنوان نمونه، فرمیکتس‌ها که یکی از شاخه‌های شاخص جمعیت‌های باکتریایی است، بین گروه‌های C-S و D-S مقایسه شد (شکل ۴).



شکل ۳: آنالیز مقیاس‌بندی چند بعدی غیرمتریک (NMDs) در نمونه‌های خاک مورد مطالعه. (S) نمونه غیر آلوده؛ (C) نمونه آلوده به کلرپریفوس؛ (D) نمونه آلوده به دلتامترین.



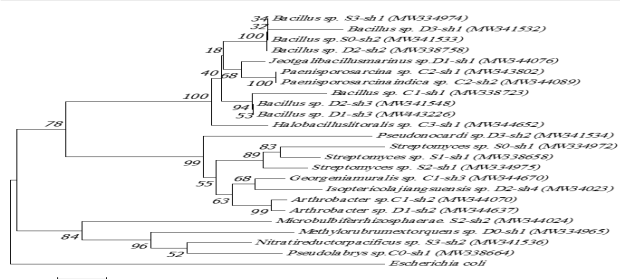
شکل ۴: تغییرات جمعیت فرمیکتس‌ها در نمونه‌های D و C نسبت به گروه S.S (نمونه غیر آلوده؛ C) نمونه آلوده به کلرپریفوس؛ (D) نمونه آلوده به دلتامترین.

شکل ۴ تجزیه و تحلیل آزمون T بین گروه‌های C-S و D-S را ارائه می‌دهد. در شکل، "میانگین گروه‌ها" بیانگر فراوانی فرمیکتس‌ها در گروه‌ها است. در عین حال با تعیین مقدار $p\text{-value} < 0.05$ در این بررسی، مشخص شد که تغییرات بین گروه‌های مورد مطالعه، معنی دار است. "تفاوت بین گروه‌ها" نیز فاصله اطمینان بین تغییرات گروهی را بیان می‌کند. همچنین، مرکز دایره مبین مقدار متوسط بوده و رنگ آن با گروهی که میانگین آن بالاتر است یکسان است. آزمون MetaState جهت تشخیص گونه‌های دارای تنوع درون گروهی مورد استفاده قرار

روابط فیلوژنتیکی سویه‌های جدا شده از میکروکازم‌های مختلف نشان داده است.

جدول ۴: باکتری‌های جدا شده از میکروکازم‌های مختلف، درصد شباهت و نزدیکترین سویه در EzTaxon و شماره دست یابی ژن 16S rRNA تعیین توالی شده جدایه در بانک ژن

نام جدایه	شماره دستیابی	نزدیکترین سویه در EzTaxon	شباهت (درصد)
C1-Sh1	MW338723	<i>Bacillus salsus</i> , A24	98/56
C1-Sh2	MW344070	<i>Arthrobacteroryzae</i> , KV-651	99/18
C1-Sh3	MW344670	<i>Georgeniamuralis</i> , DSM 14418	99/29
C2-Sh1	MW343802	<i>Paenisporosarcinaindica</i> , PN2T	99/60
C2-Sh2	MW344089	<i>Paenisporosarcinaindica</i> , PN2T	99/60
C3-Sh1	MW344652	<i>Halobacilluslitoralis</i> , SL-4	100
C0-Sh1	MW338664	<i>PseudolabrysQRGO_sGY_H</i>	100
D1-Sh3	MW443226	<i>Bacillus cheonanensis</i> , PFS-5	99/34
D1-Sh1	MW344076	<i>Jeotgalibacillusmarinus</i> , DSM 1297	99/07
D1-Sh2	MW344637	<i>Arthrobacterginsengisoli</i> , DCY81 (T)	100
D2-Sh2	MW338758	<i>Bacillus berkeleyi</i> , KMM 6244	98/00
D2-Sh3	MW341548	<i>Bacillus cheonanensis</i> , PFS-5	99/73
D2-Sh4	MW344023	<i>Isoptericolajiangsuensis</i> , DSM 21863	99/20
D3-Sh1	MW341532	<i>Bacillus berkeleyi</i> , KMM 6244	98/92
D3-Sh2	MW341534	<i>Pseudonocardiacarboxydivorans</i> , Y8	99/85
D0-Sh1	MW334965	<i>Methylorubrumextorquens</i> , IAM 12631	100
S1-Sh1	MW338658	<i>Streptomyces lateritius</i> , LMG 19372	98/96
S2-Sh1	MW334975	<i>Streptomyces caelestis</i> , NRRL 2418	99/59
S2-Sh2	MW344024	<i>Microbulbiferferrhizosphaerae</i> , Cs16b	99/60
S3-Sh1	MW334974	<i>Bacillus berkeleyi</i> , KMM 6244	99/22
S3-Sh2	MW341536	<i>Nitratireductorpacificus</i> , pht-3B	99/41
S0-Sh1	MW334972	<i>Streptomyces cinereus</i> , NBRC 12247	99/21
S0-Sh2	MW341533	<i>Bacillus berkeleyi</i> , KMM 6244	99/07



شکل ۷: ترسیم درخت روابط فیلوژنتیکی سویه‌های جدا شده از میکروکازم‌های مختلف که با روش Neighbor-joining، اشریشیا کلی به عنوان گروه خارجی (Outgroup) در نظر گرفته شده است. شماره دست یابی ژن 16S rRNA در بانک ژن نیز نشان داده شده است.

د) تغییرات جمعیت میکروبی به روش وابسته به کشت: بررسی تغییرات جمعیت قابل کشت میکروکازم‌های مورد بررسی نیز حاکی از تأثیرات قابل توجه آفت‌کش‌های مورد استفاده بر جمعیت میکروبی میکروکازم‌ها بود. جمعیت قابل کشت نیز تحت تأثیر این سموم قرار گرفته‌اند، اما نکته حائز اهمیت، قابلیت بازگشت جمعیت به میزان موجود در نمونه کنترل است. این امر به علت قابلیت بازسازی و ترمیم جمعیت میکروبی خاک است که به مرور این امکان برای میکروارگانیسیم‌های مقاوم به آلاینده فراهم می‌شود که به رشد و فعالیت خود ادامه داده و بتوانند تعداد باکتری‌های خاک را به حالت قبل برگردانند. نکته دیگر، تأثیرات مخرب بیشتر دلتامترین نسبت به کلرپیریفوس است که در نمونه‌های مختلف قابل مشاهده است. شناسایی گونه‌های مختلف باکتریایی: با جداسازی و شناسایی باکتری‌های شاخص به روش وابسته به کشت مشخص شد که گونه‌های باسیلوس یکی از مقاوم‌ترین باکتری‌ها به آفت‌کش‌های مورد استفاده است (جدول ۴). سویه باسیلوس برکلی در نمونه‌های D3، D2، S3 و S0 مشاهده شد، از این امر می‌توان نتیجه گرفت که سویه یادشده، نه تنها به حضور آفت‌کش‌ها مقاومت داشت بلکه تغییر در میزان شوری خاک نیز بر آن بی‌تأثیر بود. همانطور که در نتایج توالی‌یابی نسل جدید مشاهده شد، در سطح شاخه، فرمیکتس‌ها به عنوان یکی از شاخه‌های اصلی شناخته شدند. با توجه به اینکه باسیلوس برکلی به شاخه فرمیکتس‌ها تعلق دارد، نتایج حاصل به طور قابل توجهی هم‌خوانی دارند. علاوه بر سویه باسیلوس شناسایی شده، گونه‌های مختلفی از استرپتومایسس نیز شناسایی شدند که متعلق به شاخه اکتینوباکتری‌ها می‌باشند. این سویه‌ها تنها در نمونه‌های شاهد مشاهده شدند و در حضور سموم کلرپیریفوس و دلتامترین حذف شده‌اند. با بررسی جدایه‌های شناسایی شده، به خوبی این نکته مشخص می‌شود که گونه‌های اصلی حاضر در نمونه‌ها مربوط به شاخه‌های فرمیکتس‌ها، پروتئوباکتری‌ها، باکتریوئیدها و اکتینوباکتری‌ها می‌باشند که در بخش نتایج مولکولی نیز یافته‌های مشابهی بدست آمد. در شکل ۷، درخت

بحث

آلوده به کلریپریفوس) برخوردار است که این امر می‌تواند ناشی از زیست‌تجزیه‌پذیری بیشتر دلتامترین نسبت به کلریپریفوس توسط این جنس باشد (۳۴).

نتایج بدست آمده در پژوهش حاضر، این پیش‌فرض را که شوری خاک می‌تواند بر تجزیه‌پذیری و همچنین تنوع میکروبی تأثیرگذار باشد را به خوبی اثبات نمود. به این ترتیب، مشخص شد که نمونه‌های خاک غیر شور (شوری صفر درصد) نسبت به نمونه‌های خاک با شوری متفاوت، بیشتر تحت تأثیر سمیت ترکیبات شیمیایی قرار گرفتند. این امر می‌تواند ناشی از عادت کردن باکتری‌های هالوفیل به محیط‌های افراطی و یا مقاومت بیشتر هالوفیل‌ها در مقابل این آلاینده‌ها باشد (۳۵). رفیعیان و همکاران سویه باکتریایی نمک دوست با شباهت ۱/۹۸ درصد *Halomonas kenyensis* AIR-2 متعلق به رده گاما پروتئوباکتیریا را جداسازی کردند. نتایج پژوهش آن‌ها نشان داد که باکتری‌های نمک دوست جدا شده از محیط‌های کشاورزی به علت سازگاری با شرایط نمکی می‌توانند گزینه مناسبی برای تجزیه آفت‌کش‌های ارگانوفسفاته در محیط‌های آلوده شور باشند (۳۶).

بر اساس داده‌های بدست آمده مشخص شد که اعضای فرمیکتس‌ها و پروتئوباکتری‌ها قادر به تجزیه دلتامترین هستند که با نتایج لی و همکاران مطابقت داشت (۳۷). مقاومت این باکتری‌ها در برابر دلتامترین ناشی از هیدرولیز باند استری توسط آنزیم استراز/کربوکسیل استراز است که این امکان را برای باکتری فراهم می‌آورد تا بتواند دلتامترین را به عنوان منبع کربن و نیتروژن جهت رشد و فعالیت مصرف کند (۳۸). به این ترتیب، استراز به عنوان سلاحی قدرتمند برای تجزیه حشره‌کش‌های پائرتروئیدی توسط باکتری شناخته می‌شود (۳۹).

به منظور بررسی تنوع گونه‌ها مختلف در هر نمونه، آنالیز آلفا مورد استفاده قرار گرفت. با مقایسه تعداد سویه‌های مشاهده شده در نمونه‌های خاک مورد بررسی، بالاترین تعداد سویه در نمونه S0 (خاک غیر شور و غیرآلوده) مشاهده شد. درحالی‌که،

با مقایسه باکتری‌های مورد نظر بر اساس واحدهای عملکردی تاکسونومیک (OTU) مشخص شد که بین گروه‌های مختلف خاک‌های مورد بررسی، تفاوت قابل توجهی در فراوانی جوامع میکروبی وجود دارد. در نمونه‌های C2، C3 و C0 بیشترین باکتری‌های شناخته شده مربوط به خانواده باسیلوس، در نمونه‌های C1، D1 و C2 بیشترین فراوانی مربوط به خانواده کلاستریدا و در نمونه‌های S0، S3، S2، S1، D0 بیشترین تنوع مربوط به پروتئوباکتری‌ها بود که نشان دهنده وجود سودوموناس در این خاک‌ها بوده است.

بر اساس نتایج بدست آمده، مشخص شد که در خاک‌های گروه S (نمونه کنترل فاقد آفت‌کش)، پروتئوباکتری‌ها بیشترین جمعیت را به خود اختصاص داده‌اند. در حالی که در گروه C (نمونه خاک آلوده به کلریپریفوس) و D (نمونه خاک آلوده به دلتامترین) بیشترین تعداد گونه‌های مورد بررسی مربوط به فرمیکتس‌ها است. نکته حائز اهمیت در آنالیزهای مربوط به تنوع میکروبی، حضور گونه‌های اکتینوباکتر و باکتریوئیدها در گروه S بود که حاکی از نقش حشره‌کش‌ها در انتخاب جمعیت باکتریایی خاک است.

توانایی تجزیه کلریپریفوس و نیز مصرف پارانیتروفنل که نتیجه هیدرولیز آن به عنوان منبع کربن و نیتروژن توسط سویه سودوموناس است در پژوهشی به اثبات رسیده است (۲۷). علاوه بر سودوموناس سویه‌هایی از باسیلوس‌ها و آتروباکتری‌ها نیز قادر به هیدرولیز کلریپریفوس هستند (۲۸ و ۳۰). همانند نتایج پژوهش‌های فوق، در پژوهش حاضر نیز جنس باسیلوس به عنوان یک تجزیه‌کننده کلریپریفوس در خاک‌های آلوده شناخته شد. مطالعات بسیاری در این زمینه صورت گرفته است و نتایج بدست آمده نشان دهنده توانایی قابل توجه این جنس در حذف آفت‌کش‌هاست (۳۱ و ۳۳).

بر اساس نتایج توالی‌یابی نسل جدید، مشخص شد که جنس سودوموناس در نمونه D0 (خاک غیر شور آلوده به دلتامترین) از فراوانی بالاتری (۶۰٪) نسبت به نمونه C0 (خاک غیر شور

ترکیب جامعه میکروبی مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت. به این ترتیب، با نمونه‌گیری از خاک‌ها با شوری مختلف، اثر این ترکیبات (در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک) بر محیط مطالعه شد. علاوه بر پایش پیوسته تغییرات جمعیت قابل شمارش (در مدت ۲۳۱ روز)، جمعیت غیرقابل شمارش نیز به کمک روش توالی‌یابی نسل جدید بررسی شد.

نتایج به‌خوبی نشان داد که خواص فیزیکی-شیمیایی (شوری) خاک بر توانایی مقاومت میکروارگانیسم‌ها در برابر آلاینده‌های محیطی موثر است. بنابراین، بالاترین تعداد گونه‌ها در نمونه‌های خاک غیرآلوده و غیرشور مشاهده شد که با افزودن آفت‌کش به نمونه‌های خاک، به میزان چشمگیری فراوانی کاهش یافت. علاوه بر آن، گونه‌های فرمیکتس‌ها، پروتئوباکتری‌ها، باکتریوئیدها و اکتینوباکتری‌ها به عنوان گونه‌های مقاوم به آفت‌کش‌های دلتامترین و کلرپیریفوس شناسایی شدند. نتایج وابسته به کشت نیز با نتایج حاصل از توالی‌یابی نسل جدید هم‌خوانی داشت. نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر می‌تواند در فرایندهای زیست‌پالایی و مدیریت آفت‌کش‌ها در خاک راهگشا باشد.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را در این مقاله رعایت کرده‌اند.

تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از رساله دکتری بوده که به حمایت پژوهشگاه صنعت نفت به انجام رسیده است. نویسندگان این مقاله از تمامی پرسنل پژوهشگاه صنعت نفت به ویژه آقای دکتر کاظمی از واحد آنالیز پژوهشگاه صنعت نفت کمال تشکر و قدردانی را دارند.

تعارض در منافع

وجود ندارد.

پایین‌ترین تعداد سوبه‌ها در حضور دلتامترین (شوری ۱٪) و کلرپیریفوس (شوری ۰٪) مشاهده شد. نتایج به‌دست آمده با نتایج یانچی و همکاران (۴۰) و نیز رایمتس و همکاران (۴۱) در زمینه اثر آفت‌کش‌ها بر کاهش تنوع زیستی مطابقت داشت. مطالعات بسیاری در زمینه تأثیرات منفی آفت‌کش‌ها بر جمعیت میکروبی صورت گرفته است، اما متأسفانه هیچ‌یک تأثیر شوری محیط را به عنوان یک عامل موثر بر ساختار تنوع میکروبی و نیز پاکسازی آفت‌کش‌ها از محیط مورد توجه قرار نداده‌اند (۴۲ و ۴۵).

در تعیین توزیع گونه‌ها در خاک‌های مورد بررسی، در گروه‌های S0 و S1 باکتری‌های خانواده اکتینوباکتر، پرتئوباکتر و جماتیمونادس دیده شد که در تجزیه آفت‌کش بسیار موثرند. در همین زمینه، شریف-یزدی و همکاران در مطالعات خود موفق به شناسایی و جداسازی باکتری‌های فلاووباکتریوم، سودوموناس و میکروکوکوس از لجن فعال با توانایی پاکسازی مواد مضر از لجن فعال شدند که نقش سودوموناس در حذف زیستی نیز مشاهده شد (۴۶). همچنین، از کود گاوی، خاک‌های سیلابی و لجن صنعتی، ۲۶ سوبه باکتری تجزیه‌کننده آفت‌کش فسفره دای‌متوات جدا شد که متعلق به جنس‌های سودوموناس، کلبسیلا و باسیلوس بودند (۴۷).

همچنین، مطالعه جمعیت قابل شمارش در میکروکازم‌های مورد بررسی نشان از افت اولیه این جمعیت بود که به مرور با عادت کردن گونه‌های فعال به سم موجود، پس از حدود ۷۰ روز مجدداً تعداد میکروارگانیسم‌های فعال به میزان اولیه و حتی بالاتر از آن نیز افزایش داشت. علاوه بر آن، دلتامترین نسبت به کلرپیریفوس کشندگی و مهارکنندگی بالاتری را برای میکروارگانیسم‌های خاک مورد بررسی نشان داد. بالاترین سطح جمعیت قابل شمارش نیز در نمونه‌های غیر شور مشاهده شد.

نتیجه‌گیری

حشره‌کش‌ها و علف‌کش‌ها به طور متداول در صنایع کشاورزی کاربرد دارند. در پژوهش حاضر، تأثیرات آفت‌کش‌های ارگانوفسفره (کلرپیریفوس) و پایرتروئیدی (دلتامترین) بر

Reference

1. Hinojosa MG, Prieto AI, Gutiérrez-Praena D, Moreno FJ, Caméan AM, Jos A. In vitro assessment of the combination of cylindrospermopsin and the organophosphate chlorpyrifos on the human neuroblastoma SH-SY5Y cell line. *Ecotoxicology and environmental safety*. 2020;15:191:110-222.
2. Carr RL, Alugubelly N, de Leon K, Loyant L, Mohammed AN, Patterson ME, Ross MK, Rowbotham NE. Inhibition of fatty acid amide hydrolase by chlorpyrifos in juvenile rats results in altered exploratory and social behavior as adolescents. *Neurotoxicology*. 2020 ;1:77:127-36.
3. Abdi DE, Owen Jr JS, Brindley JC, Birnbaum AC, Wilson PC, Hinz FO, Reguera G, Lee JY, Cregg BM, Kort DR, Fernandez RT. Nutrient and pesticide remediation using a two-stage bioreactor-adsorptive system under two hydraulic retention times. *Water Research*. 2020 ;1:170:115311.
4. Bhat SA, Qadri H, Cui G, Li F. Remediation of pesticides through microbial and phytoremediation techniques. In *Fresh Water Pollution Dynamics and Remediation* 2020;1: 235-245
5. Ridano ME, Racca AC, Flores-Martín JB, Reyna L, Genti-Raimondi S, Panzetta-Dutari GM. Effect of Chlorpyrifos on human extravillous-like trophoblast cells. *Reproductive Toxicology*. 2019 ;1:90:118-25.
6. Han B, Lv Z, Zhang X, Lv Y, Li S, Wu P, Yang Q, Li J, Qu B, Zhang Z. Deltamethrin induces liver fibrosis in quails via activation of the TGF- β 1/Smad signaling pathway. *Environmental Pollution*. 2020 ;1:259:113870.
7. Christen V, Joho Y, Vogel M, Fent K. Transcriptional and physiological effects of the pyrethroid deltamethrin and the organophosphate dimethoate in the brain of honey bees (*Apis mellifera*). *Environmental pollution*. 2019 ;1:244:247-56.
8. Budarz JF, Cooper EM, Gardner C, Hodzic E, Ferguson PL, Gunsch CK, Wiesner MR. Chlorpyrifos degradation via photoreactive TiO₂ nanoparticles: assessing the impact of a multi-component degradation scenario. *Journal of hazardous materials*. 2019 ;15:372:61-8.
9. Zhan H, Huang Y, Lin Z, Bhatt P, Chen S. New insights into the microbial degradation and catalytic mechanism of synthetic pyrethroids. *Environmental Research*. 2020 ;1:182:109138.
10. Wang X, Song L, Li Z, Ni Z, Bao J, Zhang H. The remediation of chlorpyrifos-contaminated soil by immobilized white-rot fungi. *Journal of the Serbian Chemical Society*. 2020;85(7): 857-68.
11. Graça CA, Mendes MA, Teixeira AC, de Velosa AC. Anoxic degradation of chlorpyrifos by zerovalent monometallic and bimetallic particles in solution. *Chemosphere*. 2020 ;1:244-1254.

12. Wu Y, Li W, Yuan M, Liu X. The synthetic pyrethroid deltamethrin impairs zebrafish (*Danio rerio*) swim bladder development. *Science of The Total Environment*. 2020 ; 20:13-487.
13. ul Haq A, Saeed M, Usman M, Naqvi SA, Bokhari TH, Maqbool T, Ghaus H, Tahir T, Khalid H. Sorption of chlorpyrifos onto zinc oxide nanoparticles impregnated Pea peels (*Pisum sativum* L): Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies. *Environmental Technology & Innovation*. 2020;1:17-1005.
14. Kollah B, Singh B, Parihar M, Ahirwar U, Atoliya N, Dubey G, Patra A, Mohanty SR. Elevated CO₂, chlorpyrifos and biochar influence nitrification and microbial abundance in the rhizosphere of wheat cultivated in a tropical vertisol. *Rhizosphere*. 2019;1:10-1001.
15. Jaabiri K I, Jegede OO, Owojori OJ, Bouzid J, Gargouri R, Römbke J. Effects of deltamethrin, dimethoate, and chlorpyrifos on survival and reproduction of the collembolan *Folsomia candida* and the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* in two African and two European soils. *Integrated Environmental Assessment and Management*. 2018; 14(1), pp.92-104.
16. Supreeth M, Chandrashekar MA, Sachin N, Raju NS. Effect of chlorpyrifos on soil microbial diversity and its biotransformation by *Streptomyces* sp. HP-11. *3 Biotech*. 2016;6(2):1-6.
17. Akbar S, Sultan S. Soil bacteria showing a potential of chlorpyrifos degradation and plant growth enhancement. *brazilian journal of microbiology*. 2016;47:563-70.
18. Hua F, Yunlong YU, Xiaoqiang CH, Xiuguo WA, Xiaoe YA, Jingquan YU. Degradation of chlorpyrifos in laboratory soil and its impact on soil microbial functional diversity. *Journal of Environmental Sciences*. 2009 ; 21(3):380-6.
19. Fang H, Yu YL, Wang XG, Chu XQ, Pan XD, Yang XE. Effects of repeated applications of chlorpyrifos on its persistence and soil microbial functional diversity and development of its degradation capability. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*. 2008;81 (4):397-400.
20. Muñoz-Leoz B, Garbisu C, Antigüedad I, Alonso ML, Alonso RM, Ruiz-Romera E. Deltamethrin degradation and soil microbial activity in a riparian wetland soil. *Soil science*. 2009 ;1;174(4):220-8.
21. Widenfalk A, Svensson JM, Goedkoop W. Effects of the pesticides captan, deltamethrin, isoproturon, and pirimicarb on the microbial community of a freshwater sediment. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*. 2004;23(8):1920-7.
22. Dou R, Sun J, Deng F, Wang P, Zhou H, Wei Z, Chen M, He Z, Lai M, Ye T, Zhu L. Contamination of pyrethroids and atrazine in greenhouse and open-field agricultural soils in China. *Science of the Total Environment*. 2020 ;20:701-1349.
23. Lee WJ, Blair A, Hoppin JA, Lubin JH, Rusiecki JA, Sandler DP, Dosemeci M, Alavanja MC. Cancer incidence among pesticide applicators exposed to chlorpyrifos in the Agricultural Health Study. *Journal of the National Cancer Institute*. 2004 ;1:96(23):1781-9.

24. Anwar S, Liaquat F, Khan QM, Khalid ZM, Iqbal S. Biodegradation of chlorpyrifos and its hydrolysis product 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol by *Bacillus pumilus* strain C2A1. *Journal of Hazardous Materials*. 2009 ;30:168(1):400-5.
25. Rivera-Becerril F, van Tuinen D, Chatagnier O, Rouard N, Béguet J, Kuszala C, Soulas G, Gianinazzi-Pearson V, Martin-Laurent F. Impact of a pesticide cocktail (fenhexamid, folpel, deltamethrin) on the abundance of Glomeromycota in two agricultural soils. *Science of the Total Environment*. 2017 ;15:577:84-93.
26. Zainun MY, Simarani K. Metagenomics profiling for assessing microbial diversity in both active and closed landfills. *Science of the Total Environment*. 2018 ;1:616:269-78.
27. Jayasri Y, Naidu MD, Mallikarjuna M. Review article microbial degradation of chlorpyrifos. *Int J Recent Sci Res*. 2014;5(11):2043-7.
28. Chishti Z, Arshad M. Growth linked biodegradation of chlorpyrifos by *Agrobacterium* and *Enterobacter* spp. *International Journal of Agriculture & Biology*. 2013 ;1:15(1).
29. Aswathi A, Pandey A, Sukumaran RK. Rapid degradation of the organophosphate pesticide–Chlorpyrifos by a novel strain of *Pseudomonas nitroreducens* AR-3. *Bioresource technology*. 2019 ;1:292:122025.
30. Zhu J, Zhao Y, Qiu J. Isolation and application of a chlorpyrifos-degrading *Bacillus licheniformis* ZHU-1. *African Journal of Microbiology Research*. 2010 ;18:4(24):2716-9.
31. Aceves-Diez AE, Estrada-Castañeda KJ, Castañeda-Sandoval LM. Use of *Bacillus thuringiensis* supernatant from a fermentation process to improve bioremediation of chlorpyrifos in contaminated soils. *Journal of environmental management*. 2015 ;1:157:213-9.
32. Zhu J, Zhao YA, Ruan H. Comparative study on the biodegradation of chlorpyrifos-methyl by *Bacillus megaterium* CM-Z19 and *Pseudomonas syringae* CM-Z6. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2019;14:91.
33. Oladipo OG, Burt AF, Maboeta MS. Effect of *Bacillus cereus* on the ecotoxicity of metal-based fungicide spiked soils: Earthworm bioassay. *Ecotoxicology*. 2019;28(1):37-47.
34. Yang J, Feng Y, Zhan H, Liu J, Yang F, Zhang K, Zhang L, Chen S. Characterization of a pyrethroid-degrading *Pseudomonas fulva* strain P31 and biochemical degradation pathway of D-phenothrin. *Frontiers in microbiology*. 2018 ;16:9:1003.
35. Sato K. Effect of a pesticide pentachlorophenol on soil microflora. III. Growth rates as an index of pesticide resistance of bacterial groups isolated from soil. *Canadian journal of microbiology*. 1987 ;1:33(9):819-22.
36. Rafieyan S, Amoozegar MA, Shavandi M, Kazemi H, Bamorowat M. Evaluation of organophosphorus pesticide biodegradation by halophilic bacteria. *Biological Journal of Microorganism*. 2018 ;21:7(25):1-7.

37. Li W, Jin D, Shi C, Li F. Midgut bacteria in deltamethrin-resistant, deltamethrin-susceptible, and field-caught populations of *Plutella xylostella*, and phenomics of the predominant midgut bacterium *Enterococcus mundtii*. *Scientific reports*. 2017 ;16:7(1):1-3.
38. Bhatt P, Huang Y, Zhan H, Chen S. Insight into microbial applications for the biodegradation of pyrethroid insecticides. *Frontiers in Microbiology*. 2019:1778.
39. Bhatt P, Bhatt K, Huang Y, Lin Z, Chen S. Esterase is a powerful tool for the biodegradation of pyrethroid insecticides. *Chemosphere*. 2020 ;1:244:125507.
40. Yanji W, Songhe J, Wenhua P, Mingji J, Yunjiang L. Optimization of Chlorpyrifos Degradation Conditions for and Microbial Community Structure Analysis in a Constructed Wetland System. *InIOP Conference Series: Earth and Environmental Science 2019 ;1 (Vol. 330, No. 3, p. 032077)*. IOP Publishing.
41. Raimets R, Bontšutsnaja A, Bartkevics V, Pugajeva I, Kaart T, Puusepp L, Pihlik P, Keres I, Viinalass H, Mänd M, Karise R. Pesticide residues in beehive matrices are dependent on collection time and matrix type but independent of proportion of foraged oilseed rape and agricultural land in foraging territory. *Chemosphere*. 2020 ;1:238-1245.
42. Wang S, Zhang C, Lv Z, Huang H, Cao X, Song Z, Shao M. Degradation of 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol by a microbial consortium in dryland soil with anaerobic incubation. *Biodegradation*. 2019;30(2):161-71.
43. Essa SS, El-Saied EM, El-Tawil OS, Gamal IM, Abd El-Rahman SS. Nanoparticles of zinc oxide defeat chlorpyrifos-induced immunotoxic effects and histopathological alterations. *Veterinary World*. 2019;12(3):440.
44. Wahla AQ, Anwar S, Mueller JA, Arslan M, Iqbal S. Immobilization of metribuzin degrading bacterial consortium MB3R on biochar enhances bioremediation of potato vegetated soil and restores bacterial community structure. *Journal of hazardous materials*. 2020 ;15:390-1214.
45. Regar RK, Gaur VK, Bajaj A, Tambat S, Manickam N. Comparative microbiome analysis of two different long-term pesticide contaminated soils revealed the anthropogenic influence on functional potential of microbial communities. *Science of the Total Environment*. 2019 ;1:681:413-23.
46. Sharifi-Yazdi MK, Azimi C, Khalili MB. Study of the biological treatment of industrial waste water by the activated sludge unit. *Iranian Journal of Public Health*. 2001;30(3-4):87-90.
47. Vidali M. " Bioremediation. An overview", *Pure and Applied Chemistry*,2001; 73: 1163-1172.