المعالجة الحيوية لبقايا المبيدات الحشرية بوساطة *Pseudomonas aeruginosa* .

عدنان نعمة عبد الرضا هادي رحمن رشيد الطائي أنوار علي كاظم

*أستاذ - قسم علوم الحياة – كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة ديالى .
**أستاذ مساعد - قسم علوم الحياة – كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة ديالى .
*مدرس مساعد - قسم علوم الحياة – كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة ديالى .

المستخلص

تضمنت الدراسة عزل وتشخيص السلالات البكتيرية المقاومة لمبيدي(lambde- cyhalothrin، fenvalerate)وتم العزل من ترب زراعية مختلفة في مدينة بعقوبة، وأظهرت النتائج بأن غالبية العزلات تعود إلى الزوائف الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* إذ شخصت بوساطة إجراء الاختبارات الزرعية،والفحوصات المجهرية ،والكيموحياتية ،وبعدها طبعت هذه العزلة على وسط الأملاح السائل الحاوي على المبيد إذ أظهرت نتائج قياس التركيز المتبقي بوساطة تقنية الكروموتوكرافيا السائل تحت الضغطHPLCالعالي بأن الزوائف الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* ذات قدرة على التكيف، والنمو بتركيزين 200،250 مكغم/ مل من المبيدين.

وكذلك تمت دراسة المحتوى البلازميدي للعزلة المحلية لزوائف الزنجارية ، وبينت النتائج احتواءها على حزمة بلازميدية واحدة كبيرة ، أجريت عملية تحييد الدنا البلازميدي بإستخدام مادة Acridin orange إذ نجحت هذه المادة في تحييد الحزم البلازميدية عند تركيز 1024 مكغم / مل من خلال فقدانها للحزمة البلازميدية ،وبعدها طبعت هذه العزلة على تركيز 200مكغم/مل من lambde- cyhalothrin ثم قيس تركيز المبيد المزرعة بوساطة جهاز HPLC أظهرت النتائج بأن النسبة المئوية لتركيز المتبقي من lambde- cyhalothrin في الأسبوع الأخير100% ، ومن هذا نستنتج بأن الجينات الرئيسة للتكسير المبيدات تقع على البلازميدات.

الكلمات المفتاحية: مبيدات زراعية ، *Pseudomonas aeruginosa* ، Bioremediation .

المقدمة

أسهمت المبيدات الزراعية إلى حد كبير في زيادة الإنتاج الزراعي وتلبية حاجات الإنسانية المتزايدة من المواد الغذائية، لكن يؤدي سوء الاستخدام غير الأمن للمبيدات إلى أضرار واسعة النطاق على صحة الإنسان والبيئة إذ تعد واحدة من أكثر الأسباب شيوعا للتسمم في أنحاء العالم جميعاً (U.S.EPA ،1999) وان الاستعمال المفرط لها يسبب ظهور المقاومة من قبل الآفات، وكذلك ظهور بقاياها في المحاصيل والتربة ، وأثبتت العديد من التقارير ومنها منظمة حماية البيئة بأن المبيدات هي سبب الإصابة بالعديد من السرطانات(Helfrich وآخرون ، 2009).

تاريخ استلام البحث 19 / 9 / 2013 .

تاريخ قبول النشر 13 / 11/ 2013 .

بسبب هذه المشاكل وبسبب القلق البيئي المرتبط مع تراكم هذه المبيدات في المحاصيل الغذائية، ومصادر المياه، جاءت الأهمية لمعالجة المواقع الملوثة بهذه الملوثات، وهناك العديد من الطرائق المختلفة للمعالجة بضمنها المعالجة الكيميائية، والفيزيائية التي واجهت العديد من الانتقادات بسبب المشاكل الكبيرة التي تسببها كإنتاج الحوامض، والقواعد، والإشعاعات السامة فضلا عن أن هذه الطرائق غير اقتصادية وغير كفوءة ، ولا تتناسب والمساحات الكبيرة(Nyakundi وآخرون،2010) لذلك كانت الحاجة لتطوير طرائق كفوءة وآمنة واقتصادية لمعالجة هذه الملوثات وهي الطرق البايولوجية التي تتضمن استخدام الأحياء المجهرية (البكتريا أو الفطريات) المتوافرة طبيعياً او المقدمة لتحطيم أو تكسير المبيدات أو سميتها (Magan ،2005).

عندما تتعرض الأحياء المجهرية لمثل هذه المركبات فإنها سوف تطور ميكانيكيات للتكيف مع هذه الظروف ، وان تطور هذه الميكانيكيات يكون ضرورياً وأساسا وهذا يتمثل بالتحطيم البايولوجيBiodegradation، إذ إن التحطيم سيكون أما بوساطة الإنزيمات المسوؤلة عن تكسير مواد طبيعية ،وهذه الإنزيمات تستحث استجابة للمواد كيميائية طبيعية، لكن القسم الآخر من المركبات يحتاج إلى وقت الاستحثاث الإنزيمات ،وان هذا الوقت يعكس طول فترة Lag أو فترة التطبع للكائن (Davis وآخرون،1980)

أستخدم في دراسة التكسير البايولوجي مزارع نقية من جنس الزوائف الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* وهي من أكثر البكتريا السالبة للصبغة كرام شيوعا في التربة والتي لا تحتاج إلى متطلبات غذائية خاصة للنمو إذ تمتاز بقابليتها الكبيرة على التطبع ، واستهلاك مدى من المركبات الكاربونية كالتي تحتوي على الحلقات الاروماتية ،وبذلك تلعب دوراً مهماً في تحطيم المركبات الطبيعية، والصناعية التي تقاوم التكسير بوساطة أحياء مجهرية أخرى (Robert وآخرون،1997) .

هذه القابلية في اغلب الأحيان تكون بوساطة الإنزيمات التي تشفر لها البلازميدات حيث أن البلازميد هو عبارة عن تركيب حلقي يتكون من خيطين حلزونيين من الـ DNA البكتيري ويعد من العناصر الوراثية خارج الكروموسومية والبلازميدات لها القابلية على التضاعف الذاتي بدون الاعتماد على كروموسوم المضيف لاحتوائها على منشأ تضاعف يدعى Replicon ، كذلك يتميز البلازميد بأنه مستقر وراثياً ويحتوي على جينات من (300-1) جين ويوجد في بدائية النواة Prokaryotes مثل البكتريا وكذلك في حقيقية النواة Eukaryotes مثل الخمائر والفطريات وتكون الجينات المحمولة على البلازميد غير ضرورية لحياة وتكاثر الخلية البكتيرية(Lu وآخرون، 1999 ؛ Prescott وآخرون، 2005) .

إن البكتريا الفاقدة للبلازميد تكون طبيعية في وظائفها ولكن إذا ما وجدت فأنها تمنح صفات إضافية تمكنها من العيش تحت ظروف استثنائية ، لذلك هناك العديد من الوظائف التي تقوم بها البلازميدات وبحسب نوع البلازميد منه مقاومة المعادن الثقيلة وبوصفه عاملاً للضراوة، والبقاء ،والتطبع البيئي، ووظائف التأييض التي تسمح باستهلاك مغذيات مختلفة كالتحطيم البايولوجي للمواد السامة ،والهيدروكاربونات العضوية، والمبيدات ويمكن للخلايا البكتيرية ان تفقد البلازميدات تلقائيا، ولكن بترددات واطئة وهذه الظاهرة تسمى بالتحييد التلقائي spontaneously وبالإمكان زيادة تردد

فقدان البلازميدات عند تعرض الخلايا إلى مركبات تحشر نفسها بين قواعد DNA وبشكل خاص الاكردينات مثل الاكردين البرتقالي Acridine Orange ،وبروميد الاثيديوم Ethidium bromide ،أو استخدام مواد أخرى مثل SDS(Sodium dodecyl sulfate) (Mickelsen وآخرون،1985)، ألا أن الغالبية العظمى من البلازميدات تكون مستقرة بدرجة كبيرة والتي تتطلب استعمال عوامل محيدة Curing Agents لغرض زيادة تردد الانعزال التقائي ،أو العوامل الكيميائية.

وتمت دراسة المحتوى البلازميدي للعزلة الأكثر كفاءة في عملية تحليل المبيدات وإجراء عملية طرد البلازميدات للعزلات المختارة Curing plasmid process،واستخدمت تقنية الكروماتوغرافي السائل عالية الأداء High Performance Liquid Chromatography (HPLC) لدراسة قابلية العزلات على التحطيم البايلوجي إذ تعدُّ من الطرق الحديثة للتحليل والمعتمدة عالمياً إذ أنها تتميز بإمكانية التحديد الكمي والكيفي في الوقت نفسه وإمكانية تحليل أكثر من مركب ضمن العينة الواحدة ،وكذلك الكشف الكمي حتى تراكيز تصل إلى ppm (جزء من مليون) (Scott، 2003)ولأهمية هذا الموضوع فقد جاءت الدراسة بهدف الحصول على عزلات محلية مفككة للمبيدات الزراعية المتبقية

المواد وطرائق البحث

العزل وتشخيص العزلات البكتيرية

. اشتملت مصادر عزل البكتريا من ترب زراعية مستخدمة للمبيدات في مدينة بعقوبة إذ حضر عالق التربة بأخذ غم من التربة ويذوب في 100 مل من Normal Saline (حُضر المحلول الملحي الفسلجي بإذابة 0.85غم من كلوريد الصوديوم في 90 مل ماء مقطر، ثم أكمل الحجم إلى 100مل)، ثم مزج بالمازج Vortex ولمدة عشر دقائق ثم رشح بوساطة أوراق ترشيح No Watman 0.1وأستخدم وسط M9 لعزل البكتريا المحللة للمبيدات المتكونة من : K2HPO4 كبريتات البوتاسيوم الحامضية (6)غم، فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين KH2PO4 (3) غم ، NaCL (0.5غم) ،NH4CL (1)غم لكل لتر من الماء المقطر وتم ضبط الأس الهيدروجيني على 7.2ثم تعقيمه بالموصدة عند درجة حرارة 121م° لمدة15 دقيقة وبضغط (15باوند/ انج^2)،وبعد التعقيم تم إضافة محلول كبريتات المغنيسيوم(1 M) مولاري بمقدار2 مل و0.1 مل من محلول كلوريد الكالسيوم(1M) المعقم بالترشيح ،وتضاف بعدها المبيدات البيروثيدية (fenvalerate, cyhalothrin-cyhalothrin)المعقمة بالترشيح بشكل منفصل لكل وسط وبتركيزين مختلفين (200) و(250)مكغم /مل (Saqib ،2004) ،وبعدها اخذ1 مل من الراشح وزرع في وسط 100 مل الحاوي على المبيد ويحضن بدرجة حرارة 37م° في الحاضنة الهزازة بسرعة 80 دورة /دقيقة ولمدة ثلاثة أسابيع.

شُخصت العزلات البكتيرية و شخصت المستعمرات مبدئياً اعتماداً (Holt وآخرون،2004)على الصفات المظهرية ،وتضمنت شكل المستعمرات، ولونها، وقوامها، ورائحتها، وحجمها على وسط أكار الماكونكي وبحسب تفاعلها مع صبغة كرام ، واستخدمت لتشخيص العزلات أيضا الاختبارات البايوكيميائية المختلفة كالأكسدة ،والاختزال، والحركة ،والنمو على وسط الماكونكي ،واستهلاك السترات والاندول وفوكس بروسكاور و مثيل الأحمر وتخمر السكريات واليوريا.

قياس التركيز المتبقي باستخدام جهاز HPLC

قيست التراكيز المتبقية من المبيدات بعد كل أسبوع من الحضن وكما يأتي : اختيار الطور المتحرك : أُستخدم الطور المتحرك المؤلف من المزيج الآتي hexane:dichloromethane:propanol) وبنسب قدرها 96.8:3:0.2 v/v على التوالي لمدة ساعتين.

فصل الطور العضوي تم فصله بوساطة قمع فصل وبعدها المحلول الناتج تم ترشيحه بوساطة أوراق ترشيح Whatman بحجم 0.5 لإزالة الألياف والمواد الأخرى غير الذائبة اخذ 100 مل من كل عينة واستخلاصها ب 50 مل من الطور المتحرك. المحلول العياري للمبيدين (lambde-cyhalothrin , fenvalerate) تم فصلهما بوساطة عمود FLC(Fast Liquid Chromatographic) تحت ظروف مثالية وبعدها أخذ20 مايكروليتر من المحلول المرشح المائي ويحقن بعمود HPLC ،تم ملاحظة النتائج بوساطة كاشف الأشعة الفوق البنفسجية على الطول الموجي 236 نانومير ، وتم حساب التراكيز المتبقية وموازنة النتائج مع المواد القياسية لكل مبيد وذلك باستخدام القانون الآتي :

تركيز العينة المحقونة = مساحة حزمة النموذج × تركيز القياس× عدد مرات التخفيف

مساحة حزمة القياس

استخلاص والترحيل الدنا البلازميدي Extraction DNA Plasmid

تم استخلاص الدنا البلازميدي اعتمادا على تعليمات الشركة المجهزة (Promega U.S.A)بأستخدام المواد والمحاليل المجهزة لهذا الغرض إذ نقل 600 مايكروليتر من المزروع البكتيري إلى أنبوبة ابندروف (1.5مل) أضيف 100 مايكروليتر من الدارئ المحلل للخلايا Cell Lysis Buffer ، ومزج الخليط عن طريق قلب الأنبوبة 6 مرات وأضيف 350 مايكروليتر من محلول التعادل المبرد(-4 C°8) Cold Neutralization Solution ومزجت المحتويات بالقلب مرات عدة ونبذ المزيج بوساطة المنبذة الصغيرة بسرعة 1300 دورة / دقيقة لمدة 3 دقائق.

نقل الراشح تقريباً 900 مايكروليتر إلى عمود تنقية Pure Yield Minicolumn وأهملت الحبيبة اللزجة المتكونة، وضع عمود التنقية داخل أنبوبة الجمع Collection Tube ونبذ المزيج بسرعة 1300 دورة / دقيقة لمدة 15 ثانية تم إزالة الراسب المتكون في أنبوبة الجمع ، وإرجاع عمود التنقية داخلها.
أضيف 200 مايكروليتر من محلول Endotoxin Removal Wash الى عمود التنقية Minicolumn ونبذ المزيج بسرعة 1300 دورة/ دقيقة لمدة 15ثانية اضيف 400 مايكروليتر من محلول Column Wash Solution إلى عمود التنقية Mincolumn ونبذ المزيج بسرعة 1300 دورة / دقيقة بالمنبذة الصغيرة لمدة 30 ثانية.

نقل عمود التنقية Minicolumn إلى أنبوبة إبندروف نظيفة سعة 1.5 مل ، ثم أضيف 30 مايكروليتر من محلول Elution Buffer مباشرة إلى أنبوبة عمود التنقية وترك المزيج لمدة دقيقة واحدة بدرجة حرارة الغرفة .
وحفظ الدنا البلازميدي المستخلص بدرجة -20درجة مئوية° أجريت عملية الترحيل الكهربائي لفصل خليط الدنا المستخلص وفحصه إذ تم الترحيل تحت فرق جهد قدرة 75 فولت/سم وبمعدل مرور للتيار 20 ملي أمبير ولمدة 90 دقيقة وبعدها تم فحص الهلام بوساطة جهاز UV-Transilluminator بطول موجي مقداره 336 نانوميتر ثم صور بوساطة الكاميرا (Oconnell ،1984) .

تحييد الدنا البلازميدي Curing of Plasmid DNA

تم تحييد البلازميد لبكتريا الزوائف الزنجارية بأستخدم مادة الاكردين البرتقالي Acridin orange بوصفها مادة محيدة وبالاعتماد على (Trevors، 1986) ، حيث حُضر محلول خزين للمادة الاكردين البرتقالي بتركيز 1000 مكغم/مل وحُضرت تخافيف مختلفة من هذا المحلول الخزين للحصول على التراكيز (1024، 2000، 2500 ، 3000 ،512 ،256،128،64،32،16مكغم/مل)، لُقحت الأنابيب الحاوية على هذه التراكيز بـ (0.1) مل من البكتيريا المنماة في المرق المغذي بعمر18 ساعة حضنت الأنابيب بدرجة 37م° ولمدة 24 ساعة ، بعدها سجل التركيز المؤثر على نمو البكتريا .
تم تحديد التركيز المثبط الأدنى للمادة المحيّدة من خلال تحديد اقل تركيز له عمل على تثبيط نمو البكتيريا وبعدها عملت تخافيف عشرية للأنبوب الحاوي على أعلى تركيز للعامل المحيد الذي عنده استمرت البكتيريا بالنمو(يسمى هذا الأنبوب Subminimal inhibitory concentration)
زرع(0.1) مل من أنابيب التخفيف (10^{-4}) الى (10^{-8})إلى على وسط الأكار المغذي وحضنت بدرجة حرارة 37م° ولمدة 24 ساعة وتم التحري عن فقدان الحزم البلازميدية بإلاعتماد على تعليمات الشركة المجهزة Promega USA.
تم اختبار العزلات الفاقدة للبلازميد من خلال تنميتها على وسط المبيد السائلM9 والحضن لمدة ثلاثة أسابيع وبعدها قياس التركيز المتبقي .

النتائج والمناقشة

شُخصت المستعمرات بالاعتماد على خصائصها المظهرية إذ ظهرت العزلات على أنها خلايا عصوية قصيرة سالبة للصبغة كرام غير مكونة للسبورات ومكونة لمستعمرات كبيرة شاحبة اللون عند تنميتها على وسط أكار الماكونكي لأنها غير مخمرة للسكر اللاكتوز ،وتفرز صبغة خضراء مزرقة عند تنميتها على وسط الأكار المغذي الصلب وعلى وسط أنتاج الصبغات King media،وتمتاز بأن لها القدرة على النمو في درجات حرارية مختلفة، أما الاختبارات البايوكيميائية فأظهرت نتائج سالبة فيما يخص فحص الاندول وفوكس بروسكاور والمثيل الأحمر والنشا والسترات وموجبة لفحص اليوريا وتمييع الجيلاتين والاكسدة والكاتاليز والحركة وغير مكونة للسبورات إذ أظهرت هذه الفحوصات بأن هذه العزلات تابعة لجنس الزوائف الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* وقد تم استخدام طريقة الفصل الكروماتوغرافي العالي الأداء في حساب التركيز المتبقي للمبيدات.

جدول 1. يوضح النسب المئوية للتراكيز المتبقية بعد 21 يوما لمبيدين وفي تجربتين .

	تركيز المبيد	النسبة المئوية للتركيز المتبقي في التجربة الأولى	النسبة المئوية للتركيز المتبقي في التجربة الثانية
L	200 µg / ml	2.86	3.9
L	250 µg / ml	12.4	2.84
F	200 µg / m	2.63	3.57
F	250 µg / ml	23.8	2.22

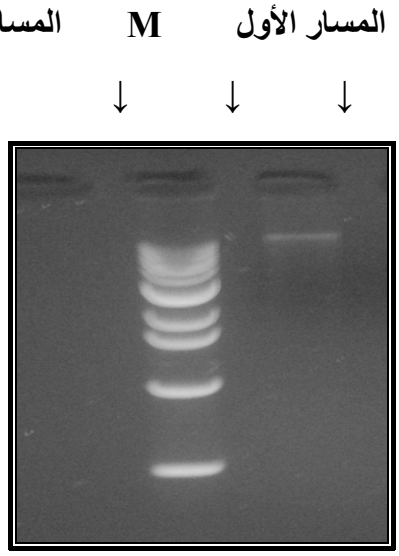
Lambde-Cyhalothrin=L F Fenvalerate.

وجد من خلال النتائج إن السلالة البكتيرية *P. aeruginosa* ذات كفاءة في التكسير البايولوجي للمبيدات البروثيدية (fenvalerate,lambde-cyhalothrin) بتركيز 200،250 مكغم / مل وبذلك إمكانية استخدامها في المعالجة الحيوية Bioremedation للملوثات.إذ تتفق هذه النتائج مع العديد من الدراسات والبحوث التي أكدت قدرة الأحياء المجهرية (بكتريا وفطريات) على استهلاك مدى واسع من المبيدات وفي أكثر الحالات قابليتها على استهلاك مركب واحد أو أكثر بوصفها مصدراً للكاربون والطاقة (Magan، 2005؛ Hayase وآخرون ،1989 ؛ Abrusciوآخرون،2011)وقد تم استخدام مزارع نقية من جنس الزوائف الزنجارية لكن هناك العديد من الدراسات التي تؤكد إن استخدام ائتلافات بكتيرية مؤثرة في التكسير البايولوجي موازنة بالمزارع النقية إذ تسهم هذه الائتلافات مع بعضها البعض في إزالة سمية الملوثات إذ تقوم احد الأنواع بالتحليل الجزئي للمركب وتقوم الأنواع الأخرى باستخدام المواد الايضية الناتجة عنه بوصفه مصدراً للكاربون والطاقة(Clark،1979؛ Deslpa،2003).

استخدم في هذه الدراسة الوسط السائل الحاوي على الأملاح إذ بيّنت الدراسات أن استخدام الوسط السائل له دور مؤثر في استهلاك المبيدات، وعلى أي حال فإن الظروف البيئية في التربة تختلف بدرجة كبيرة عن المزرعة المطبعة في الوسط السائل (Hernandez وآخرون، 2010 ؛ Boopathy ، 2000)

لم يتم إضافة أي مواد مغذية خارجية للوسط لكن يمكن أن يكون إضافة مثل هذه المواد يسبب زيادة مفاجئة في النشاط المايكروبي رغم أنّ الزيادة في النشاطات المايكروبية الكلية لوحدها قد لا تنتج عنها حالا زيادة ايض الملوثات(Gouma ،2009) .

تم إجراء تجربة تحييد الدنا البلازميدي Plasmids curing في محاولة لربط المحتوى البلازميدي بقدرة بكتريا الزوائف الزنجارية على تحليل المبيدات والتطبع عليها،واستخدامها بوصفه مصدراً للكاربون والطاقة إذ تم استخدام مادة Acridine orange بوصفها مادة محيّدة إذ فقدت عزلاتها الحزمة البلازميدية عند التركيز 1024 مكغم/مل، وتم اختبار قدرتها على استهلاك المبيد من خلال تنميته في وسط M9 الحاوي على المبيد وبعدها تم قياس التركيز المتبقي للمبيد باستخدام جهازHPLC إذ بينت النتائج أحتواء العزلة المحلية *P. aeruginosa* على بلازميد كبير الحجم نسبياً إذ يحمل هذا البلازميد صفة تكسير المبيدات ويوضح الشكل (1) المحتوى البلازميدي *P. aeruginosa* قبل عملية التحيّد وبعدها ، والجدول رقم (2) يوضح التركيز المتبقي للمبيد Lambde-Cyhalothrin في التجربة الثانية للعزلة المحيّدة حيث بينت النتائج عدم قدرة البكتريا على التكسير بعد أجراء عملية التحييد مما يؤكد بأن هذه الصفة محمولة بلازميديا(Sevastsyanovich،2008؛ Fisherوآخرون،1982؛Serdar وآخرون،1978).



شكل 1. المحتوى البلازميدي *P.aeruginosa* قبل عملية التحيّد وبعدها ، تركيز الهلام 0.7%، 75 فولت / سم لمدة 90 دقيقة .

المسار الأول : يمثل المحتوى البلازميدي للعزلة *P.aeruginosa* غيرالمحيّدة

M: يمثل الدليل الحجمي (1000 bp) .

المسار الثاني:يمثل المحتوى البلازميدي للعزلة *P.aeruginosa* المحيّدة .

جدول 2. يوضح التركيز المتبقي للمبيد Lambde-Cyhalothrin في التجربة الثانية للعزلة المحيدة

تسلسل الأسابيع	تركيز المبيد	النسبة المئوية للتركيز المتبقي
1	**200 µg / ml**	100

الاستنتاجات

1-وجد إن السلالة البكتيرية *P. aeruginosa* ذات كفاءة في التكسير البايولوجي للمبيدات البروثيدية fenvalerate,lambde-cyhalothrin بتركيز 200،250 مكغم / مل وبذلك إمكانية استخدامها في المعالجة الحيوية Bioremedation للملوثات.

2-احتواء العزلة المحلية *P.aeruginosa* على بلازميد كبير الحجم نسبياً إذ يحمل هذا البلازميد صفة تكسير المبيدات المستخدمة بوصفه مصدراً للكاربون والطاقة وهذا ما اظهرته نتائج قياس التركيز المتبقي للعزلة المحيدة. إن مادة Acridin orange عامل محيد جيد لبكتريا *P.aeruginosa*.

المصادر

ALbrusci , C . J . L. Pablos , T. Corrales , J. Lopez- Marin , I .Marin and . F.Catalina. 2011. Biodegradation of photodegraded mulching films based on polyethylenesand stearates of calcium and iron as prooxidant . *International bio deterioration and Biodegradation*. 65 : 451 – 459.

Boopathy, R. 2000. Bioremediation of explosives contaminated soil. *International Biodeterioration and Biodegradation* .46 29-36.

Clark , R . R . E . S . Chian , and R . A . Griffin . 1979 . Degradation of polychlorinated biphenyls by Mixed Microbial cultures.*Applied and Environmental Microbiology*. Vol 37 (4) : 680-685.

Davis , B . D . R .Dulbeco , . N Eisen and H.S. Ginsberg .1980. Microbiology . third edition .United Stated.

Deslpa, S. 2003. Studies on the degradation of insecticide Endosulfan by indigenous bacterial strains .*Doctoral Research*.

Fisher, P. R. Appletion and J.M. Pemberton.1978. Isolation and Characterization of the Pesticide-Degrading Plasmid pJP1 from *Alcaligenes paradoxus Jourmal of Bacteriology*. Vol. 135(3): 798-804.

Hayase , N . K . Taira , and K .Furukawa .1989. *Pseudomonas putida* kF *715* b *phABCD* oprn encoding biphenyl and polychlorinated biphenyl degradation cloning , analysis , and expression in soil bacteria . *Journal of bacteriology*, Vol .172 (2): 1160 -1164 .

Helfrich, L. A. D. L. Weigmann, P.Hipkins and E. R. Stinson 2009. Pesticides and Aquatic Animals: A Guide to Reducing Impacts on Aquatic Systems. *Virginia Cooperative Extension*.*Virginia State University*.

Hernandez,M.L. and E.Sanchez- Salinas.2010.Biodegradat- ion of the. Organophosphate pesticides tetrachlorvinphos by Bacteria isolation from agricultural soil in Mexico. *Rev. Int. Contam.*

Holt,J.G. N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.A. Staley, and S.T.Williams.2004. Bergy s Manual Of Derminative Bacteriology. (9th) ed.

Gouma,S. 2009. Biodegrdation of Mixtures of pesticides by bacteria and White rot. Thesis of Doctor of Philosophy Crnfield University School of Health.

Lu , Y . N.G. Love , and C.P. Grady . 1999. Microscopic methods for distinguishing among three ceil types in Tol plasmid – Carring *pseudo monas putida* cultures . Vol. 173.: 195 – 201.

Magan, N. 2005.Use of Fungi in Bioremediation of pesticides . Applied Mycology Group Institute of Bioscience and Technology Cranfield University.

Mickelsen, P.A. J.J. Plorde, K.P. Gordon, C.Hargisis and J.Muclure. 1985. Instability of antibiotics resistance in a strain of Staphylococcus epidermidis isolated from an outbreak of prosthetic valve endocarditis. *J. Infect. Dis*. Vol152: 50–58.

Nyakundi,W.O G. Magoma, J.Ochora, and A. B. Nyende 2010.Biodegradation of diazinon and methomyl pesticides by white rot fungi from selected horticultural farms in rift valley and central provinces Kenya. University of Agriculture and Technology, Nairobi, Kenya: 639-653

Prescott, L. M. J. P. Harley, and D. A. Klein .2005. Microbiology. 6th ed. McGraw. Hill companies Inc. New York.

Robert , E . P .Anderson and E . W. Nester . 1997. Microbiology (Human perspective) .Second edition. Published by Brown (William C.) Co ,U.S.1 -848.

Saqib,Z.A. 2004.Studies on insecticides degrading bacteria .Thesis to department of Zoology , University of Punjab, Lahore.

Scott, R.P. W. 2003. Liquid Chromatography. *Chrom-Ed Book Series. law and International Treaties.* 1-102.

Serdar, C.M، D.T .Gaibson, K.M. Munnecke, and J.H. Lancaster. 1982.Plasmid involvement in parathion hydrolysis by *Pseudomonas diminuta'*, *Appl. Environ. Microbiol*، Vol. 44:246-249.

Sevastsyanovich ,Y .R, R.Krasowiak. L. E., Bingle, A.S. Haines, S.L. Sokolov, I.A. Kosheleva, A.A. Leuchuk, M.A Titok and K.Smalla,2008. Diversity Of IncP-9 plasmids of *Pseudomonas .Microbiology*, 154: 2929–2941.

Trevorse, J.T. 1986 . Plasmid curing in bacteria . FEMS. Microbiol . Rev . Vol(32) : 149–157.

U.S EPA .1999. recognition and management of pesticide poisoning . fifth edition . *U.S. Environmental Protection Agency*. Washington.

BIOREMEDIATION OF PESTICIDE RESIDUES BY *Pseudomonas aeruginosa*.

Adnan Neama Al- Azawy Hadi Rahman Rasheed Anwar Ali Khadam

*Dept. of Biology – College of Pure Sciences – Univ. of Diyala.

ABSTRACT

The study was included isolation and identification of bacterial strains resistant of pyrethoid pesticides (lambde-cyhalothrin, fenvalerate)from agricultural soils in Baquba city. The results appeared that the most of bacteria strain are *Pseudomonas aeruginosa* .All bacterial isolates were identified by the biochemical, cultural and microbial characteristic and then isolated adapted to mineral salt media containing pesticides .The research findings of residue concentration by use HPLC technique that *Pseudomonas aeruginosa* was adapted and growth to concentration Viz. 250µg/ml , 200 µg /ml of (lambde-cyhalothrin, fenvalerate).

The plasmid content of the local isolates was studied and the results showed isolates contain single large plasmid Band, curing was conducted by use of Acridin orange. The plasmids were lost at concentration 1024µg/ml and then isolated adapted to concentration 200µg/ml lambde-cyhalothrin thereafter the culture was assessed by HPLC and results showed the rate of residue concentration in last week was 100% ,it was concluded that the major gene for pesticides degradation was located on plasmid.

Key words: Pesticide , *Pseudomonas aeruginosa* , Bioremediation