مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره ۶، شماره ۱، بهار و تابستان ۹۶
صفحه ۱۷۳-۱۵۷

# جنبه‌های ایمنی رهاسازی میکروارگانیسم‌های نوترکیب در محیط‌های کشاورزی

# Biosafety aspects of deliberate release of recombinant microorganisms in the agricultural environments

هلن پورمظاهری[۱] و غلامرضا صالحی جوزانی[۲*]

**Helen Pourmazahe1ri[1] and Gholamreza Salehi Jouzani[2*]**

۱- کارشناسی ارشد دانشگاه تهران

۲- استاد پژوهش پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی (ABRII)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

1. MSc University of Tehran

2. Professor Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREO), Karaj, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: gsalehi@abrii.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۵/۱۲/۱۴ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۶/۱۴)

## چکیده

**میکروارگانیسم‌های نوترکیب یا مهندسی شده دارای پتانسیل ارائه خدمات بسیار ارزنده‌ای به بخش کشاورزی می‌باشند که از آن جمله می‌توان به امکان ایجاد کودهای زیستی و عوامل کنترل زیستی آفات و بیماری‌ها با کارایی بالاتر، تولید نهاده‌های دام و طیور (منابع آنزیم و پروبیوتیک‌ها) با کیفیت بیشتر، تولید غذاهای فراویژه و غنی شده و همچنین پاک سازی محیط‌های آلوده کشاورزی اشاره نمود. با توجه به پتانسیل بسیار بالا و مزایای قطعی این نوع موجودات برای بخش کشاورزی، رفع برخی ابهامات در خصوص آنها می‌تواند راه گسترش استفاده از آنها را باز کند. در روش‌های ارزیابی این نوع میکروارگانیسم‌ها، میزان زنده مانی و پایداری آن‌ها در محیط زیست، فراوانی جریان ژنی و انتقال افقی ژن از آن‌ها به سایر میکروارگانیسم‌های موجود در زیست بوم و محیط کشاورزی، تاثیرات احتمالی بر روی موجودات غیر هدف (مخصوصا میکروارگانیسم‌های مفید موجود در ریزوسفر)، و ایمنی غذایی آنها ارزیابی می‌شوند. علی‌رغم مطالعات بسیار زیاد انجام شده در زمینه گیاهان تراریخته، متاسفانه میزان دانش موجود در زمینه فواید و اثرات میکروارگانیسم‌های نوترکیب مخصوصا در محیط‌های کشاورزی بسیار کم است که این موضوع یکی از دلایل اصلی محدود بودن تجاری شدن آن‌ها است. این مقاله مروری کلی بر مزایا و بررسی اثرات احتمالی زیست محیطی میکروارگانیسم‌های نوترکیب کشاورزی با تاکید بر عوامل محرک رشد یا کودهای زیستی (PGPRs) و عوامل میکروبی کنترل بیولوژیک آفات و بیماری-های گیاهی دارد. آنچه مسلم است بررسی مزایا و اثرات زیست محیطی میکروارگانیسم‌های نوترکیب کشاورزی باید در مقایسه با اثرات مخرب سموم و کودهای شیمیایی بر محیط زیست و سلامت انسان که بطور وسیع در بخش کشاورزی استفاده می‌شوند و همچنین اثرات میکروارگانیسم‌های تیپ وحشی در محیط زیست صورت پذیرد.**

**واژه‌های کلیدی**

تنوع زیستی،
کودهای زیستی،
سموم زیستی،
میکروارگانیسم‌های نوترکیب

[ Downloaded from gebsj.ir on 2025-05-17 ]

[ DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.15.7 ]

## مقدمه

### ۱- اهمیت کودها و سموم زیستی در بخش کشاورزی

با رشد جمعیت جهانی، بشر چاره‌ای جز ابداع روش‌هایی برای افزایش تولید محصولات کشاورزی نداشته است. مهمترین راهکارهای افزایش تولید محصولات کشاورزی، استفاده از کودهای شیمیایی حاوی سه عنصر ازت، فسفر و پتاسیم و همچنین کنترل شیمیایی آفات و بیماری‌های گیاهی (حشرات، باکتری ها و قارچها ) بوده است که منجر به گسترش روز افزون استفاده از آن‌ها شده است. طبق پیش‌بینی‌های سازمان خوار و بار جهانی (فائو) در سال ۲۰۱۲، میزان تولید کودهای شیمیایی دارای رشد سالانه دو درصدی می‌باشد و در سال ۲۰۱۳ (۹۲) در سطح جهانی حدود ۱۸۵ میلیون تن (۱۱۲ میلیون تن کود ازته، ۴۴ میلیون تن کود فسفاته و ۲۹ میلیون تن کود پتاس) و در سال ۲۰۱۶ نیز به حدود ۱۹۴ میلیون تن خواهد رسید (FAO report.2012). مصرف سالانه کود شیمیایی در ایران نیز حدود ۳ میلیون تن می‌باشد (Asadi Rahmani *et al*.2012). کاربرد روزافزون کودهای شیمیایی باعث بروز خسارات جبران‌ناپذیر زیست‌محیطی، بهداشتی و اقتصادی شده است. کاربرد کودهای شیمیایی ازته به‌واسطه برجای ماندن آن‌ها در طبیعت، باعث آلودگی آب و خاک شده و از این طریق باعث ایجاد بیماری‌های مختلفی در انسان می‌شود. تحقیقات گسترده جهانی صورت گرفته در خصوص آلاینده‌های محیط زیست نشان داده است که کاربرد وسیع انواع سموم دفع آفات نباتی و کودهای شیمیایی در کشاورزی موجب خسارات جبران ناپذیری بر سلامت انسان، سایر موجودات زنده و همچنین محیط زیست می‌شود ( Ntzani*et al*.2013; Hernandez; *et al*.2013; Salehi Jouzani *et al*.,2008a,b, 2014; Solecki *et al*.,2014).

استفاده از میکروارگانیسم‌های خاکزی و همچنین کودهای آلی به منظور افزایش رشد و تولید گیاهان نیز از اوایل قرن بیستم میلادی ابتدا در آمریکا و روسیه و سپس در کشورهای دیگر آغاز شد، ولی به دلیل آثار سریع و آنی کودهای شیمیایی، سهولت در کاربرد و قیمت ارزان آن‌ها سبب شد که کودهای زیستی مورد استقبال قرار نگرفتند. اما در ۳۰ سال اخیر به دلیل آشکار شدن آثار سوءمصرف بی رویه کودهای شیمیایی و قیمت رو به تزاید آن‌ها مجددا استفاده از کودهای زیستی و آلی در کشاورزی مطرح شده است. کود زیستی عبارت از مواد نگهدارنده‌ای (جامد یا مایع) با انبوه یک یا چند ارگانیسم مفید خاکزی یا فرآورده متابولیک آن‌ها است که به منظور تامین عناصر غذایی گیاهان استفاده می‌شوند و باعث افزایش عملکرد گیاهان یا بهبود خواص فیزیکی و شیمیایی خاک می‌شود. کودهای زیستی شامل میکروارگانیسم‌های تثبیت کننده ازت، حل کننده فسفات و سایر میکرارگانیسم‌ها با خصوصیات تحریک رشد می‌باشند ( Asadi Rahmani *et al*.2012; Magarvadiya and Patel.2014; Bach.2014). به طور عمده سه راهکار برای رشد گیاه به شرح ذیل نسبت داده شده است. (الف) میکروارگانیسم‌هایی که از طریق در دسترس قراردادن عناصر غذایی مهم موجبات تحریک رشد گیاه را فراهم می‌کنند که برای مثال می‌توان به باکتری‌های تثبیت کننده نیتروژن و باکتری‌های حل کننده فسفات و یا تیوباسیلوس‌ها اشاره نمود. (ب) محرک‌های گیاهی مانند آزوسپریلیوم که فیتوهورمون‌ها را تولید و در دسترس گیاه قرار می‌دهند. (ج) عوامل کنترل زیستی (مانند تریکودرما، سودوموناس و باسیلوس) که گیاهان را در برابر پاتوژن‌های گیاهی محافظت می‌کنند ( Amarger.2002; Kumari *et al*.2013; Al Abboud *et al*.2014). این میکروارگانیسم‌ها می‌توانند مانند کودهای شیمیایی محلول پاشی و یا بصورت مایه تلقیح بطور مستقیم در خاک مصرف شوند و حتی بصورت پوشش بذری مورد استفاده قرار گیرند ( Chandler *et al*.2011). برخلاف روند کاهشی تولید و مصرف کودهای شیمیایی در کشور و همچنین رشد کند تولید آن‌ها در سطح جهانی (رشد سالانه ۲٪)، خوشبختانه روند تولید کودهای زیستی در سطح جهانی و کشور ایران رو به رشد بسیار خوبی می‌باشد و طبق براوردها رشد سالانه تولید و مصرف آن‌ها حدود ۱۵٪ می‌باشد. برای مثال طبق براوردها میزان تجارت آن‌ها در سطح جهانی در سال ۲۰۱۲ حدود ۴۴۰ میلیون دلار، در سال ۲۰۱۳ حدود ۵۰۰ میلیون دلار و در سال ۲۰۱۹ حدود یک میلیارد دلار خواهد بود. از این میزان حدود ۷۷/۵ ٪ مربوط به باکتری‌های تثبیت کننده ازت، ۱۴/۵ ٪ مربوط به باکتری‌های حل کننده فسفات و ۸٪ مربوط به سایر میکروارگانیسم‌های محرک رشد گیاه



[ Downloaded from gebsj.ir on 2025-05-17 ]

[ DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.15.7 ]

(PGPR) از قبیل تیوباسیلوس، میکوریزا و ... می‌باشد (Biofertilizers Market.2013).

از طرف دیگر یکی از مهمترین راهکارهای مناسب برای کاهش مصرف سموم شیمیایی و استفاده از آن‌ها در کنترل تلفیقی آفات کشاورزی (IPM)، کنترل زیستی (کنترل بیولوژیک) آفات کشاورزی می‌باشد. تولید بیوتکنولوژیک و استفاده از عوامل میکروبی کنترل زیستی آفات کشاورزی که دامنه اثر اختصاصی بر روی حشرات آفت هدف دارند، می‌تواند بطور معنی‌داری معضلات زیست محیطی و سلامتی مرتبط با سموم شیمیایی را رفع نماید (Salehi Jouzani *et al*.2008a,b). میکروارگانیسم‌هایی که جهت کنترل آفات به کار می‌روند (مانند باکتری‌ها، قارچ‌ها، ویروس‌ها و نماتدها) به طور طبیعی بر بندپایان و حیوانات اهلی و وحشی و نیز انسان‌ها اثری نداشته و انتخابی عمل می‌کنند. بعلاوه سمی نبوده، یا سم بسیار ناچیزی تولید می‌کنند و مراحل تولید و ثبت آنها بسیار ارزان‌تر و راحت‌تر ازآفت‌کش‌های شیمیایی است (Hajek 2004; Chandler *et al*.2011).خوشبختانه در طی چند دهه گذشته کنترل زیستی آفات کشاورزی به عنوان یکی از پارامترهای اصلی کنترل تلفیقی آفات در جهت کاهش مصرف سموم شیمیایی و کاربرد در کشاورزی ارگانیک در جهت توسعه پایدار دارای اهمیت بسیار می‌باشد. بطوریکه رشد جهانی تولید و مصرف سموم شیمیایی کند شده و به حدود رشد سالانه ۳ درصد رسیده است (در سال ۲۰۱۴ حدود ۴۸ میلیارد دلار)، در حالیکه رشد تولید و مصرف عوامل کنترل زیستی حدود ۱۶ درصد می‌باشد. بر اساس پیش بینی‌ها میزان بازار جهانی عوامل کنترل زیستی آفات در سال ۲۰۱۴ حدود ۳/۳ میلیارد دلار می‌باشد و در سال ۲۰۱۷ بیش از ۴ میلیارد دلار خواهد بود. این در حالیست که این میزان در سال ۲۰۰۹ حدود ۱/۶ میلیارد دلار بوده است (BCC report.2010; Velivelli *et al*.2014). آمار ارائه شده فوق در خصوص کودها و سموم بیولوژیک میکروبی، نشانگر رشد سریع و افزایش فرهنگ تولید و کاربرد این قبیل میکروارگانیسم‌های مفید در سطح جهانی می‌باشد. از طرف دیگر استفاده از راهکارهای جدید بیوتکنولوژی شامل مهندسی ژنتیک و مهندسی فرایندهای زیستی در راستای افزایش میزان کارایی این فراورده‌های میکروبی موجب تسریع گسترش هرچه بیشتر مصرف این قبیل فراورده‌های میکروبی در کشاورزی خواهد شد.

## ۲- میکروارگانیسم‌های نوترکیب و کاربرد آن‌ها در کشاورزی

توسعه فناوری‌های مهندسی ژنتیک و زیست شناسی مصنوعی (سنتتیک بیولوژی) در دو دهه اخیر و پتانسیل بالای میکروارگانیسم‌ها برای مهندسی ژنتیک در جهت افزایش کارایی آن‌ها منجر به ایجاد تحولات شگرف در ایجاد میکروارگانیسم‌های نوترکیب با اهداف صنعتی و پزشکی در دنیا شده است و به شکل تجاری در تولید محصولات مختلف استفاده شده‌اند (Bron and Kleerebezem.2011; Jang *et al*.2012; Juturu *et al*.2012; Keasling.2012; Sarantinopoulos.2014). میکروارگانیسم‌های نوترکیب حاوی ژن های جدیدی هستند که که به آن‌ها خصوصیات مفید با کارایی بیشتر در راستای اهداف کشاورزی و سلامت می‌دهد. از جمله کارایی‌ها و کاربردهای قابل انتظار برای میکروارگانیسم‌های نوترکیب در کشاورزی می‌توان به تولید میکروارگانیسم های نوترکیب با کارایی بالا برای کنترل آفات و بیماری‌ها (Bankhead *et al*.2004; Li *et al*.2012; Malmierca *et al*.2012; Hernandez-Rodriguez *et al*.2013; Kowsari *et al*.2013) و همچنین ایجاد کودهای زیستی با کارایی بالاتر (Bosworth*et al*.1994; Rodriguez *et al*.2000; Idriss*et al*.2002; Setten *et al*.2013)، تولید آنزیم‌های مختلف مورد کاربرد در صنایع غذایی و کشاورزی (Uusitalo *et al*.1991; Oliveira *et al*.2011; Olson *et al*.2012; Adrio and Demain.2014)، تولید آنتی بیوتیک‌ها و داروهای نوترکیب مورد استفاده در دامپزشکی (Parlane *et al*.2014; Rasala and Mayfield.2014)، گیرنده‌های زیستی به منظور ردیابی آلودگی خاک و آب (Belkin.2003)، زیست پالایی و کاهش آلاینده‌ها (Dutta *et al*.2003; Wackett.2014) مانند تصفیه فلزات سنگین خاک (با طراحی باکتری‌های خورنده پسماندهای سمی و از بین بردن آلودگی‌های شیمیایی رادیواکتیوی) (Amarger.2002; Kapoor and Rajagopal.2011) اشاره نمود. تخمین‌ها از سال ۲۰۰۹ دال بر این مطلب است که حدود ۴۰ درصد آنزیم‌های غذایی فروخته شده در بازار اروپا حاصل از تولیدات سویه‌های نوترکیب باکتریایی و قارچی بوده است. از این موارد می‌توان به



[ Downloaded from gebsj.ir on 2025-05-17 ]
[ DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.15.7 ]

آنزیم آسپارژیناز از سویه نوترکیب *Aspergillus niger*، آنزیم فسفولیپاز A2 از سویه نوترکیب *Trichoderma reesei*، آنزیم آمیلومالتاز از سویه نوترکیب *Bacillus amyloliquefaciens* و آنزیم فسفولیپاز C از سویه نوترکیب *Pseudomonas fluorescens* اشاره نمود (AMFEP.2015).

تاکنون از میکروارگانیسم‌های نوترکیب مختلفی در صنایع غذایی استفاده شده است. برای مثال می توان به میکروارگانیسم‌های نوترکیب تولید کننده مکمل‌های غذایی جهت غنی کردن روغن (Franklin *et al*.2011)، مخمر نان مهندسی شده به منظور ارتقاء صنعت نانوایی (Prieto *et al*.2006)، مخمرهای تولید الکل مهندسی و صنعتی شده در آمریکا و کانادا اشاره نمود. از جمله این‌ها می‌توان به موارد زیر اشاره نمود؛ با مهندسی ژن fatty acyl-ACP thioesterase، منجر به کوتاه شدن زنجیره کربنی، بالا رفتن درجه اشباعیت، کیفیت و کارایی روغن شده‌اند. با مهندسی و افزایش بیان ژن *ASP3* درمخمر *S. cerevisiae*، تولید آسپارژیناز II بیشتر می‌شود که این آنزیم توانایی کاتالیز آسپارژین به آسپارتیک اسید و به تبع آن کاهش تشکیل اکریلامید که ماده ای سرطان زا در حین پخت می‌باشد را دارد. ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز ایزوبوتانول و اتانول در مخمر *S. Cerevisiae* مهندسی شده‌اند و این سویه را در جهت افزایش تولید مهندسی کرده‌اند (FDA.2013). در آینده نیز میکروارگانیسم‌های نوترکیب (از قبیل پروبیوتیک‌های نوترکیب) را در محصولات لبنی مانند ماست و پنیر خواهیم داشت (Aguilera*et al*.2013).

در خصوص افزایش کارایی عوامل کنترل زیستی حشرات آفت از قبیل باکتری *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) از طریق مهندسی ژنتیک تاکنون مطالعات متعددی صورت گرفته که طی آن‌ها ژن-های کد کننده پروتئین‌های کریستالی و یا سایر توکسین‌ها به باکتری *Bt* منتقل و تظاهر آن‌ها افزایش یافته و یا اینکه برای اولین بار یک ژن خاص به سویه مد نظر منتقل شده است (چون هر سویه این باکتری تعداد خاصی از این قبیل ژن‌های *cry* را دارا می‌باشد) (Driss *et al*.2011; Li *et al*.2012). برای مثال دریس و همکاران در سال۲۰۱۱ با انتقال ژن کیتیناز به باکتری *Bt* توانستند میزان قابلیت حشره کشی این باکتری را تا ۵۰ درصد افزایش دهند (Driss *et al*.2011). لی و همکاران نیز یک ژن نوروتوکسین اختصاصی حشرات را به همراه ژن *cry1Ac* به یک سویه *Bt* انتقال دادند تا میزان حشره کشی آن را بالا ببرند (Li *et al*.2012). راهکار دیگر انتقال ژن‌های یک عامل بیولوژیک مثل *Bt* به سایر عوامل میکروبی می‌باشد. برای مثال هرناندز و همکاران (۲۰۱۳) ژن های *vip3A* و*cry1I* را از باکتری *Bt*جداسازی و به باکتری *Pseudomonas fluorescens* که یک عامل زیستی برای کنترل بیماری‌های گیاهی می‌باشد، منتقل کردند تا این باکتری بتواند خصوصیت حشره کشی نیز داشته باشد (Hernandez-Rodriguez *et al*.2013). نایموو و همکاران نیز یک ژن جدید (*cry9Aa*) را به *E. coli* انتقال دادند که منجر به ایجاد خاصیت حشره کشی بر علیه حشره *Spodoptera exigua* شد (Naimov *et al*.2014). در خصوص مهندسی ژنتیک عوامل آنتاگونیست بیماری‌های گیاهی در جهت افزایش کارایی و قابلیت کنترل پاتوژن‌های گیاهی نیز تاکنون مطالعات متعددی صورت گرفته است که از بین آن‌ها می‌توان به قارچ *Trichoderma sp.* (Malmierca *et al*.2012; Kowsari *et al*.2013) و باکتری-های *Streptomyces* (Clermont *et al*.2011)، *Bacillus subtilis* (Leclere *et al*.2005) و *Psuedomonas sp.* (Hernandez-Rodriguez *et al*.2013) اشاره نمود.

در خصوص افزایش کارایی عوامل میکروبی محرک رشد گیاهان (کودهای زیستی) از طریق مهندسی ژنتیک نیز مطالعات متعددی در طی چند سال گذشته صورت گرفته است. برای مثال می‌توان به باکتری‌های نوترکیب تثبیت کننده ازت (Rhizobium) با توانایی پالایش زیستی فلزات سنگین خاک (Ike *et al*.2007)، *Anabaena sp.* با قابلیت محرک رشدی و تثبیت ازت بالاتر (Chaurasia and Apte.2011)، و*Azospirillum* با قابلیت بالای تولید اکسین و قابلیت محرک رشدی بالاتر (Malhotra and Srivastava.2006; Baudoin *et al*.2010) اشاره نمود. نتایج تحقیق بر روی *Rhizobium legominosarum* نشان داد که درج ژن *vkt* با فعالیت بالای کاتالازی در این باکتری، منجر به افزایش فعالیت تثبیت نیتروژن گره‌های آن نسبت به باکتری‌های شاهد به میزان ۱/۷ تا ۲/۳ برابر گردیده است (Orikasa *et al*.2010). همچنین ژن *gcd* از باکتری *E.coli* در *Azotobacter vinelandii* کلون شد که نتیجه آن افزایش حلالیت فسفر و رشد گیاه سورگوم



[ Downloaded from gebsj.ir on 2025-05-17 ]

[ DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.15.7 ]

بود (Sashidhar and Podile.2009).

البته باید توجه نمود که علی رغم مطالعات و تحقیقات زیاد صورت گرفته در خصوص ایجاد میکروارگانیسم‌های نوترکیب با هدف کنترل زیستی آفات و بیماری‌ها و همچنین کود زیستی، هنوز تعداد قابل توجهی از این قبیل محصولات تجاری نشده‌اند. با این حال سویه‌های تثبیت کننده نیتروژن مهندسی شده هم در آمریکا و هم در استرالیا تجاری سازی شده‌اند (Gupta *et al*.2013). از جمله اولین سویه‌های تجاری سازی شده، سویه‌ای مهندسی شده از *Sinorhizobium meliloti* با نام RMBPC-2 که ژن *nifA* در آن درج که باعث افزایش تثبیت نیتروژن گردید؛ برای اولین بار در سال ۱۹۹۷ تجاری سازی که نتایج استفاده از آن افزایش معنی‌داری در عملکرد یونجه نشان داد (Bosworth *et al*.1994).

## ۳- چالش‌های تولید و رهاسازی میکروارگانیسم‌های نوترکیب در محیط‌های کشاورزی

علی‌رغم مطالعات زیاد صورت گرفته در ایجاد عوامل میکروبی نوترکیب کنترل زیستی آفات و بیماری‌ها و همچنین عوامل محرک رشد نوترکیب، هنوز تجاری سازی این نوع فراورده‌ها و رهاسازی آن‌ها در محیط‌های کشاورزی بطور وسیع انجام نشده است(Gupta *et al*.2013). یکی از دلایل این امر عدم وجود مطالعات گسترده در خصوص اثبات مزایا و همچنین عدم وجود مطالعات در زمینه بررسی اثرات متقابل مثبت و یا منفی احتمالی میکروارگانیسم‌های نوترکیب بر میکروارگانیسم‌های بومی موجود در ریزوسفرو فیلوسفر، و همچنین اثرات متقابل آن با خود گیاه می‌باشد. سوالاتی که در حال حاضر مطرح است این است که آیا این میکروارگانیسم‌ها دارای اثرات زیست محیطی احتمالی مثبت یا منفی می‌باشند؟. میکروارگانیسم‌های نوترکیب پس از رهاسازی در محیط زیست و تحت تاثیر شرایط و تنش‌های مختلف آن بقا پیدا می‌کنند؟ و شرایط محیطی چگونه می‌توانند فرایندهای فیزیولوژیکی و ژنتیکی میکروارگانیسم‌های نوترکیب را تغییر دهد؟ (Velkov.2001)، آیا تنش‌های محیطی می‌توانند باعث القا پاسخ‌های فیزیولوژیکی و ژنتیکی در جهت افزایش بقا و نمو میکروارگانیسم‌های تحت تنش شوند (Velkov.1999).از طرف دیگر، آیا تغییرات حاصل از مهندسی ژنتیک در میکروارگانیسم می‌تواند به‌عنوان عامل تنش عمل کند و یا اینکه موجب افزایش فراوانی جهش در میکروارگانیسم‌های نوترکیب شود؟ (Velkov.2001). ملاحظات در ارتباط با استفاده از این میکروارگانیسم‌های نوترکیب مانند گیاهان تراریخته (Salehi Jouzani.2012; Salehi Jouzani and Tohidfar.2013) عموما مربوط به بررسی مخاطرات احتمالی زیست‌محیطی رهاسازی این قبیل موجودات و همچنین ایمنی آنها برای سلامت انسان، دام و محصولات کشاورزی و همچنین مسائل اقتصادی، اخلاقی و حقوقی می‌باشند. با توجه به قدرت بالای میکروارگانیسم‌ها در تکثیر و تولید مثل سریع و همچنین تبادل بالای عناصر ژنتیکی، ملاحظات در خصوص این موجودات بیشتر از گیاهان و جانوران است. البته باید توجه نمود که این خصوصیات در میکروارگانیسم‌های وحشی نیز کاملا وجود دارد، و تاکنون اثرات سوئی از آنها در طبیعت مشاهده نشده است. تبادلات ژنتیکی بطور معمول بین میکروارگانیسم‌های وحشی رخ می‌دهد و این تغییرات به سمت ایجاد تعادل در جمعیت‌های میکروبی پیش می‌رود. با این حال، شناسایی و ارزیابی مخاطرات احتمالی میکروارگانیسم‌های نوترکیب از دو منظر شناسایی مخاطرات احتمالی و همچنین مدیریت آن‌ها در جهت استفاده ایمن از این نوع فراورده‌ها و همچنین حفظ محیط زیست وسلامت انسان و دام می‌تواند راه را برای گسترش استفاده از مزایای این نوع عوامل میکروبی مفید باز نماید (Aguilera *et al*.2013). در این راستا، استفاده از میکروارگانیسم‌های نوترکیب در بخش صنایع غذایی با توجه به اینکه در محیط‌های بسته صورت می‌گیرد، جمع آوری محصول و فراوری آن در شرایط کاملاً ایزوله و قابل کنترل دنبال می‌شود و بدلیل فراهم آوردن شرایط کشت ایزوله برای سویه‌های نوترکیب، وقوع هرگونه فرار ژن و ایجاد مقاومت ناخواسته را غیرممکن می‌سازد. لذا از این منظر در مقایسه با میکروارگانیسم‌های نوترکیب با هدف رهاسازی در محیط‌های کشاورزی، توسعه و گسترش این قبیل عوامل میکروبی می‌تواند مزایای میکروارگانیسم‌های نوترکیب را در بخش کشاورزی بیشتر به اثبات برساند و راه را برای گسترش سایر عوامل مثل کودها و سموم زیستی نوترکیب باز نماید. در خصوص میکروارگانیسم‌های



[ Downloaded from gebsj.ir on 2025-05-17 ]
[ DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.15.7 ]

نوترکیب مورد کاربرد در صنایع غذایی بطور معمول بر اساس دستورالعمل‌های کدکس بررسی دقیق مخاطرات احتمالی از نظر سمیت‌زایی، آلرژی‌زایی و سلامت غذایی انجام می‌گیرد. این بررسی‌ها بصورت مقایسه نمونه شاهد (میکروارگانیسم مادری) با نمونه میکروارگانیسم نوترکیب می‌باشد (Aguilera *et al.*,2013). بدین صورت که ترکیب شیمیایی (ترکیبات کلیدی) و ویژگی‌های فیزیکوتکنولوژیکی محصولات حاصل از هر گروه میکروارگانیسم از قبیل ترکیبات کلیدی مواد مغذی و غیر مغذی، اسیدهای آلی، الکل‌ها، ترکیبات طعم دهنده، غلظت، چگالی، حلالیت، ماندگاری و ... مطابق دستورالعمل‌های کدکس غذایی بررسی و مقایسه می‌شود. نتایج حاصل از آنالیز مقایسه‌ای به همراه خصوصیات مولکولی و فیزیولوژیکی میکروارگانیسم‌های نوترکیب و همچنین پروتئین یا پروتئین‌های جدید نوترکیب مورد بررسی قرار می‌گیرند (Codex Alimentarius,2013; OECD,2010).

نظر به پیچیدگی اثرات متقابل میکروارگانیسم‌هابا سایر موجودات حاضر در ریزوسفر و فیلوسفر گیاهان و همچنین کمی تعداد مطالعات علمی در خصوص ارزیابی ایمنی میکروارگانیسم‌های نوترکیب، لازم است درک عمیقی از پویایی جمعیت‌های هدف و غیرهدف در محیط زیست از جمله بیولوژی عوامل خسارت‌زا، میزبان و نحوه ارتباط آن دو و نیز اثرات غیرمستقیم عوامل میکروبی کنترل کننده آفات بر موجودات غیر هدف حاصل شود (Chandler *et al.*2011). شناخت میزان بقا و پایداری سویه‌های قارچی و باکتریایی تلقیح شده در مزرعه و تاثیرات انتشار آن‌ها در جوامع بومی میکروبی نیز دارای اهمیت فراوانی است. تلقیح در خاک ممکن است منجر به تغییر در ساختار جوامع میکروبی بومی شود، لذا بررسی پویایی جمعیت میکروب‌های معرفی شده به محیط زیست و ایمنی آن‌ها دارای اهمیت زیادی است. این تغییرات جمعیتی می‌تواند اثر مستقیم ناشی از رقابت تغذیه‌ای و تعاملات هم‌افزایی/آنتاگونیستی با جمعیت‌های میکروبی ساکن، و یا اثر غیر مستقیم ناشی از افزایش رشد ریشه و تراوشات آن باشد. لذا با توجه به موارد فوق لازم است استراتژی‌های تغییر ژنتیکی بر اساس نوع میکروارگانیسم، نوع گیاه هدف و همچنین نوع محیط زیست هدف مشخص و اجرا شوند تا بتوان به شکل اطمینان بخشی از مزایای عوامل میکروبی نوترکیب در بخش کشاورزی استفاده شود (Trabelsi and Mhamdi.2013).

## ۴- جنبه‌های زیست محیطی میکروارگانیسم‌های نوترکیب در محیط‌های کشاورزی

یکی از ارزیابی‌های مهم در نظر گرفته شده در قوانین و مقررات بین المللی ایمنی زیستی از قبیل پروتکل ایمنی زیستی کارتاهنا جهت توسعه میکروارگانیسم‌های نوترکیب، ارزیابی مخاطرات احتمالی زیست محیطی آنها است. این ارزیابی‌ها شامل ارزیابی میزان ماندگاری و زنده مانی میکروارگانیسم نوترکیب در محیط زیست، ارزیابی میزان احتمال انتقال افقی ژن از آن‌ها به سایر میکروارگانیسم‌های موجود در زیست بوم و محیط کشاورزی، ارزیابی میزان احتمال تاثیر بر روی موجودات غیرهدف (مخصوصات میکروارگانیسم‌های مفید موجود در ریزوسفر و فیلوسفر)، و ارزیابی احتمال جریان ژنی و امکان ایجاد ابر میکروب‌های مضر و یا ابرآفات است. در ارزیابی اثرات احتمالی‌میکروارگانیسم‌های نوترکیب در محیط طبیعی، مواردی که بطور عمومی در نظر گرفته می‌شوند شامل؛ ۱) این محصولات اثرات جانبی نداشته باشند. ۲) در صورت بروز اثرات بر محیط زیست، معنی دار نبوده و قابل جبران و برگشت پذیر باشند. این اثرات برسلامت انسان، حیوان و گیاه و نیز هوا، آب، کیفیت خاک، تنوع زیستی و دیگر موارد قابل بررسی است. ۳) در صورتیکه امکان بروز اثرات مضر جدی وجود دارد ولی امکان بروز آن با روش‌های علمی و مدیریتی ایمنی زیستی قابل حفاظت و کنترل می‌باشد، باید راهکارهای کنترلی و کاهش مخاطرات احتمالی بطور دقیق ارائه و اجرا شوند (Doblhoff-Dier *et al.*1999). در اهداف ایمنی زیستی، این موضوع بسیار قابل اهمیت است که پتانسیل میکروارگانیسم‌های نوترکیب برای ازدیاد و توسعه در محیط زیست قابل کنترل و کاهش باشد (Velkov.2001).در این بخش ارزیابی های مخاطرات احتمالی زیست محیطی اشاره شده مورد بحث قرار می‌گیرند.

### ۴-۱- زنده‌مانی میکروارگانیسم‌های نوترکیب و اثرات آن در محیط زیست

علاوه بر اینکه یک میکروارگانیسم باید دارای کارایی بالایی از



[ Downloaded from gebsj.ir on 2025-05-17 ]

[ DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.15.7 ]

نظر صفت هدف (مثلا کنترل عوامل پاتوژن گیاهی) باشد، لازم است این میکروارگانیسم قادر به زنده‌مانی و استقرار در شرایط رها شده برای مدت زمان معینی باشد و در زمان مذکور دارای پایداری ژنتیکی باشد تا بتواند اثر بخشی مناسبی داشته باشد. از ویژگی‌های لازم و مهم یک میکروارگانیسم نوترکیب، پایداری ژنتیکی در طی نسل‌ها و طی پروسه تولید بوده و نیز حضور و پایایی میکروارگانیسم نوترکیب در طبیعت می‌باشد (Lenski.1991; Lenski.1993). لذا موفقیت کاربرد میکروارگانیسم‌های نوترکیب، در گرو پایداری و ثبات ژنتیکی و میزان زنده‌مانی و استقرار آن در محیط زیست می‌باشد که با توجه به کمی میزان آگاهی و دانش انسان از اکولوژی میکروارگانیسم‌ها در محیط‌های کشاورزی و طبیعی (ریزوسفر و فیلوسفر)، طراحی میکروارگانیسم‌های نوترکیب با این خصوصیات را مشکل می‌سازد (Morrissey *et al*.2002; Prosser *et al*.2007).

میکروارگانیسم‌های معرفی شده به طبیعت بسته به ساختار فیزیولوژیک و ژنتیکی‌شان با فاکتورهای زنده و غیر زنده زیادی مواجه می‌شوند که بقا آن‌ها را به شکل معنی‌داری تحت تاثیر قرار می‌دهد. فاکتورهای موثر بر باکتری‌های معرفی شده به دو دسته تقسیم می شوند که برخی از آن‌ها فاکتورهای مثبت برای بقا می‌باشند؛ مثل وجود مواد معدنی، pH و رطوبت مناسب (Colwell *et al*.1985; Ophir and Gutnick.1994; Van Overbeek *et al*.1995)و دسته دیگر عوامل محدود کننده بقا مانند دوره‌های خشکی، حضور میکروارگانیسم‌های رقیب، شکار شدن توسط پروتوزوآ و تجزیه شدن توسط باکتریوفاژها هستند (Stephens *et al*.1987; Heijnen *et al*.1988; Smit *et al*.1996; Ashelford *et al*.2000; Johansen *et al*.2002). وجود ریشه گیاه در ریزوسفر خاک از فاکتورهای زنده و مفید محیط است. ریشه گیاهان مواد غذایی را برای میکروارگانیسم‌های اطراف خود فراهم می‌کنند. بسیاری از اعضا گونه‌های *Agrobacterium, Azospirillum, Azotobacter, Bacillus, Erwinia, Pseudomonas, Rhizobium* و *Xanthomonas* میکروارگانیسم‌هایی هستند که با ریزوسفر همزیستی و سازگاری دارند (Liu and Sinclair.1993; Bashan *et al*.1995; Lugtenberg *et al*.2001). چنین به نظر می‌رسد که باکتری‌های نوترکیب توانایی بقا در محیطی مشابه محیط طبیعی نوع وحشی خود را دارند. البته باید به این نکته توجه نمود که ممکن است بیان ژن جدید در آن‌ها، مقداری از انرژی میکروارگانیسم را مصرف کند و از شایستگی بقا آن‌ها در محیط طبیعی کاسته شود (Lenski. 1993). همچنین تغییرات ژنتیکی می‌تواند موجب ایجاد اختلال در فرایندهای بیوشمیایی ناشناخته‌ای درمیکروارگانیسم نوترکیب شده و منجر به ضعف و کاهش توان رقابتی سویه‌ها شود. تیمز ویلسون و همکاران (۲۰۰۴) در مطالعات خود مشاهده کردند که مهندسی ژنتیک *Pseudomonas fluorescens* برای تولید فنازین-۱-کربوکسیلیک اسید (PCA) باعث افزایش شایستگی بقا آن در سطح آزمایشگاه شد (Timms-Wilson *et al*.2004).تیمز ویلسون و همکاران در سال ۲۰۰۴ سویه نوترکیب *P. fluorescens* را تولید کردند و کارایی و مخاطرات زیست محیطی آن را بررسی نمودند. سویه وحشی گیاه را در برابر بوته میری ناشی از پاتوژن خاکزی *Pythium* حفاظت می‌نمود. سویه نوترکیب نه تنها در برابر پیتیوم اثر قوی‌تری نشان داد بلکه بر روی سایر پاتوژن‌ها مثل *Fusarium spp, Gaeumannomyces graminis var. tritici, Rhizoctonia solani, Phytophtora cinnamomi*، نیز اثرات کنترلی خوبی نشان داد. علاوه بر این سویه نوترکیب توانست بهتر از نوع وحشی در ریزوسفر و فیلوسفر گیاهان مختلف مانند نخود، گندم و چغندر قند استقرار داشته باشد و گیاه را کلونیزه نماید. این محققان دریافتند که بیشترین میزان تغییرات در تنوع زیستی فلور میکروبی ریزوسفر را عامل بوته میری ایجاد می‌کرد و باکتری نوترکیب نیز زنده‌مانی مشابهی مانند باکتری تیپ وحشی داشت و اثرات آن بر فلور میکروبی ریشه مانند تیپ وحشی بود. چندین مطالعه نیز به بررسی میزان زنده‌مانی میکروارگانیسم‌های نوترکیب و غیر-نوترکیب پرداخته‌اند که نتایج مشابهی بدست آورده اند (Viebahn *et al*.2003; Bankhead *et al*.2004; Gagliardi *et al*.2001). برای مثال بنکهد و همکاران هیچ تفاوتی در ریزوسفر گندم وقتی که *P. fluorescens* غیرنوترکیب و نوترکیب را بطور مجزا تلقیح کردند، مشاهده نکردند (Bankhead *et al*.2004). البته برخی تحقیقات دیگر برخلاف تحقیقات فوق نشان دادند که میکروارگانیسم‌های نوترکیب نسبت به تیپ وحشی کمتر زنده می‌مانند (Wang.1991; De Leij.1998; Da and Deng.2003).



[ Downloaded from gebsj.ir on 2025-05-17 ]
[ DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.15.7 ]

نتایج مطالعه لیج و همکاران نشان داد که ژن‌های نشانگر بیان شده در سویه نوترکیب اثر منفی معنی‌داری در زنده‌مانی آن‌ها در رقابت با سویه تیپ وحشی داشته است (De Leij.1998). لذا با توجه به مطالعات کم انجام شده و ضد و نقیض بودن نتایج، نیاز است تا مطالعات بیشتری در خصوص تاثیر یا عدم تاثیر نوترکیبی بر میزان ماندگاری میکروارگانیسم‌ها در شرایط طبیعی انجام شود. ضمن اینکه به احتمال زیاد این موضوع به نوع میکروارگانیسم، نوع ژن منتقل شده و همچنین شرایط محیطی ارتباط مستقیم دارد (Prosse *et al*.2007).

### ۲-۴- انتقال افقی ژن از میکروارگانیسم‌های نوترکیب به میکروب‌های ریزوسفر وایجاد ابرآفات

بطور کلی انتقال افقی ژن و مواد ژنتیکی بین باکتری‌های تیپ وحشی به یکی از سه روش تراریزش، هم‌یوغی و ترارسانی رخ می‌دهد که ممکن است برای نوع نوترکیب آن‌ها نیز رخ دهد (De Vries and Wackernagel.2002). انتقال افقی ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک از میکروارگانیسم‌های نوترکیب به گونه‌های ساکن در ریزوسفر می‌تواند منجر به گسترش مقاومت آنتی بیوتیکی به گونه‌های متعدد باکتریایی و ایجاد باکتری‌های بیماری‌زای مقاوم به آنتی‌بیوتیک شود. از این رو استفاده از ژن‌های مقاومت به آنتی-بیوتیک‌هایی که دارای کاربرد پزشکی و یا دامپزشکی نیستند واطمینان از ایمنی میکروارگانیسم‌های نوترکیب دارای اهمیت فراوانی است و می‌تواند به توسعه سریع کاربرد این قبیل میکروارگانیسم‌ها در کشاورزی کمک کند. بنابراین ماهیت توالی دی.ان.ای نوترکیب، ناقل دهنده‌ها و موجودات گیرنده و همچنین هر گونه مخاطرات احتمالی که موجودات زنده دیگر را تهدید می‌کند باید به طور دقیق بررسی شود. آمپی سیلین آنتی‌بیوتیکی متعلق به خانواده بتا- لاکتام است که کاربرد وسیعی در پزشکی دارد ولی به سرعت توسط ژن‌های مقاومت در باکتری‌ها بی‌اثر می‌شود. این احتمال به علت وجود پروموتر باکتریایی همراه با ژن مقاومت به آنتی بیوتیک قوت می‌یابد. طبق یافته‌های اخیر باکتری‌های موجود در خاک به طور طبیعی دارای این ژن می‌باشند، لذا علت عدم تشخیص منشاء حضور این ژن در باکتری‌های موجود در خاک می‌تواند پلی مورفیسم بالای این ژن باشد که احتمالا در اثر جهش نقطه‌ای و در طی تکامل ایجاد شده است. لذا بطور کلی پیشنهاد می‌شود در صورت نیاز به استفاده از ژن‌های مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها، از ژن‌هایی استفاده شود که آنتی بیوتیک متناظر آن در پزشکی و دامپزشکی کاربردی نداشته باشد. در مورد ایجاد ابر آفات نیز باید اشاره شود که سال‌هاست که فراورده‌های *Bt* به صورت حشره کش زیستی در برنامه‌های کنترل زیستی آفات بصورت ایمن و گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرد. تاکنون هیچ سمیت غیرمنتظره‌ای از این حشره کش‌ها گزارش نشده است. دلیل این امر اختصاصیت زیاد پروتیئن‌های *Bt* و از طرف دیگر ناپایداری آنها تحت اثر اشعه ماورای بنفش است. از طرف دیگر میزان کارایی و همچنین زنده مانی و پایداری این باکتری‌ها و پروتئین‌های آن‌ها به غلظت مورد استفاده، مدت زمان مصرف، شرایط محیط و نوع آفات هدف موجود در محیط و میزان تخریب زیستی سم بستگی دارد. انتقال طبیعی دی ان آ، از طریق جذب دی ان‌آی برهنه توسط سلول‌هایی موسوم به سلول‌های پذیرا صورت می‌گیرد (Reanney *et al*.1982) که جهت مبادله ژنتیکی میکروب‌های خاک از اهمیت زیادی برخوردار است. در روش ترانسفورماسیون، دی ان آی آزاد می‌تواند وارد خاک شده، با ذرات رس خاک پیوند تشکیل داده و توسط باکتری‌های دیگر جذب شده ونوترکیب شوند (Lorenz and Wackernagel.1994).

### ۳-۴- تغییر تنوع زیستی جمعیت میکروبی و تاثیر میکروارگانیسم‌های نوترکیب بر موجودات غیرهدف

با توجه به اینکه در زمان تلقیح میکروارگانیسم‌های نوترکیب در مزرعه، تراکم بالایی از میکروارگانیسم نوترکیب جهت تجمع سریع در ریزوسفر گیاه میزبان اضافه می‌شود، یک اختلال گذرا در تعادل جوامع میکروبی خاک روی می‌دهد. البته باید توجه داشت که این به هم‌ریختگی تعادل جمعیت‌های میکروبی برای میکروارگانیسم‌های تیپ وحشی مورد استفاده به عنوان کود زیستی و یا سموم کنترل زیستی نیز رخ می‌دهد و مختص میکروارگانیسم‌های نوترکیب نیست (Timms-Wilson *et al*.2004; Aguilera *et al*.2013). تغییرات در جمعیت و فلور میکروبی ممکن است اثرات نامطلوبی به‌همراه داشته باشد، که از آن جمله می‌توان به از دست رفتن گونه های مهم بومی، تولید متابولیت‌های سمی و نهایتا تاثیرات منفی بر رشد گیاهان اشاره



[ Downloaded from gebsj.ir on 2025-05-17 ]
[ DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.15.7 ]

کرد. با این حال، تغییر در ساختار جامعه باکتریایی ناشی از تلقیح میکروب‌های مهندسی شده، نیز مانند میکروارگانیسم‌های طبیعی تلقیح شده می‌باشد که می‌تواند بر قدرت انعطاف پذیری اکوسیستم در سطوح تنوع و تعاملات بین گیاه، خاک و موجودات زنده اثر بگذارد. از طرف دیگر، از دست رفتن گونه‌های باکتریایی خاص به دلیل فراوانی گونه‌های مختلف باکتریایی که دارای عملکرد مشابه با گونه‌های از دست رفته هستند، ممکن است باعث تغییر در رشد و نمو گیاهان نشود (Lenski.1993; Smit *et al*.1996).کارسر و همکاران در مطالعات خود دو سویه نوترکیب (به منظور پالایش خاک) و والد وحشی باکتری *P. fluorescens* را بطور جداگانه به توده خاک آزمایشی و فضای ریزوسفر تلقیح کردند. مشاهدات آن‌ها حاکی از این نکته بود که تفاوت معنی-داری بین اثر باکتری‌های نوترکیب و نوع وحشی بر ساختار و عملکرد جمعیت میکروبی موجود در خاک بالک وجود نداشت و از طرف دیگر نوع نوترکیب توانست به خوبی بیفنیل پلی‌کلرینه شده (PCB)را از محیط خاک پالایش نماید. نکته جالب توجه اینکه تاثیر باکتری‌های نوترکیب بر فعالیت و ساختار جامعه میکروبی در محیط ریزوسفر با اثر نوع وحشی باکتری متفاوت بود (Carcer *et al*.2007).

## ۴-۴- اثرات کودهای زیستی نوترکیب بر تنوع زیستی و موجودات غیر هدف

میکروارگانیسم‌های مختلفی که دارای اثر محرکی رشدی برای گیاهان هستند در کشاورزی به عنوان مایه تلقیح مورد استفاده قرار می‌گیرند. از این عوامل میکروبی مفید می توان به ریزوبیوم‌ها، آزوسپریلیوم، قارچ مایکوریزا و عوامل بیوکنترلی مختلف اشاره نمود. اثر ریزوبیوم‌ها در رشد محصول، عملکرد، و جذب مواد غذایی با مکانیسم‌های مختلف گزارش شده است. این باکتری‌ها قادر به تثبیت ازت بوده و همچنین از طریق در دسترس قرار دادن مواد مغذی دیگر مانند فسفر و آهن، هورمون‌های گیاهی، به رشد گیاهان و همچنین سایر میکروارگانیسم‌ها کمک می‌کنند و از طرفی بیماری‌های باکتریایی و قارچی را نیز کنترل می‌کنند و حتی در کنترل آفات نیز کمک می‌کنند (Antoun and Prevost.2005; Saharan and Nehra.2011). در مطالعه‌ای تغییرات جمعیت‌ها و فلور میکروبی ریزوسفر یونجه که با سویه نوترکیب *Rhizobium meloliti* نژاد M403 (سویه نوترکیب حاوی یک نسخه اضافی از ژن پرولین دهیدروژناز با قابلیت افزایش یافته رقابت برای اشغال گره ریشه ) و یا نژاد M401 (سویه کنترلی حامل پلاسمید مشابه و بدون ژن مذکور) تلقیح شده بودند مورد بررسی قرار گرفتند. بدین منظور، روش مختلف غیر مبتنی بر محیط کشت (متاژنومیکس) شامل چند شکلی طول قطعات برش یافته (Restriction Fragment Length Polymorphism) و انگشت نگاری با الکتروفورز ژل شیب دار درجه حرارت (Temperature-Gradient Gel Electrophoresis Fingerprints)برای بررسی تغییرات فلور میکروبی استفاده شد. تجزیه و تحلیل RFLP نشان داد که تلقیح سویه نوترکیب به خاک منجر به افزایش ماندگاری گاما-پروتئوباکترها در ریزوسفر یونجه شده است (Van Dillewijn *et al*.2002). همچنین الگوهای بدست آمده از الکتروفورز TGGE نتایج قبلی را تایید نمود. در تحقیق دیگر که توسط لین و همکارانش صورت گرفت، سویه نوترکیب*Alcaligenes faecalis* حاوی ژن تنظیم کننده *nifA* در مزرعه برنج مورد استفاده قرار گرفت. حضور باکتری منجر به افزایش ۱۵ الی ۲۰ درصدی عملکرد محصول شد. در بررسی تکمیلی با DGGE مشخص شد که سویه نوترکیب با تعداد کلونی $۱۰^{۷}$ در هر گرم خاک زنده مانده و حضور باکتری نوترکیب علاوه بر افزایش عملکرد و دارا بودن ماندگاری بالا، تفاوت معنی‌داری در مقایسه با تیپ وحشی باکتری از نظر اثر بر فلور میکروبی ریزوسفر ندارد و لذا بدلیل مزایای فوق و عدم وجود مخاطرات زیست محیطی می‌تواند کاندیدای خوبی برای کاربردهای تجاری باشد (Lin.2000). تحقیقات دیگر بر روی کودهای زیستی نوترکیب نیز نشان داده‌اند که این عوامل میکروبی مفید بر روی موجودات غیر هدف اثر منفی معنی‌داری ندارند (Van Dillewijn.2002; Da and Deng. 2003).

## ۵-۴- اثرات سویه‌های بیوکنترلی نوترکیب بر روی جمعیت میکروبی خاک

بسیاری از محصولات ریزوباکتریایی بصورت تجاری برای کنترل زیستی بیمارگرهای گیاهی در بازار عرضه شده‌اند (Berg.2009).



[ Downloaded from gebsj.ir on 2025-05-17 ]
[ DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.15.7 ]

تعدادی از میکروارگانیسم‌ها مانند قارچ *T. harzianum* (Mohiddin *et al*.2010)، *P. fluorescens* (Peighami-Ashnaei *et al*.2009)، و *B. subtilis* (Dawar *et al*.2010)، با خصوصیت آنتاگونیستی و تولید مواد ضد میکروبی قادرند بیمارگرهای مختلف از گونه‌های قارچ فوزاریوم، پیتیوم، رایزوکتونیا، اسکلروتیوم و غیره را کنترل نمایند و از طرفی با تولید مواد محرک رشد موجب افزایش در رشد و عملکرد گیاه شوند. همچنین ثابت شده است که استفاده از *B. subtilis* (Khan *et al*.2001)، *Pochonia chlamydosporia* (Khan.2008) و *P. fluorescens* (Pal *et al*.2000)، به‌طور موثری قادر به کنترل نماتدهای بیمارگر گیاهی هستند. متاسفانه مطالعه کمی بر روی بررسی اثرات احتمالی عوامل بیوکنترلی نوترکیب روی محیط زیست انجام شده است (Girland *et al*.2001; Viebahn.2006). دلانی و همکاران در مقایسه سویه *P. fluorescens* تیپ وحشی تولید کننده DAPG (2,4-diacetylphloroglucinol) که دارای خاصیت ضد باکتریایی است و از رشد قارچ پیتیوم جلوگیری می‌کند، با سویه نوترکیب آن مهندسی شده که میزان بالاتری از DAPG را تولید می‌کند، نشان دادند که جمعیت هر دو سویه بعد از چند روز به شکل معنی‌داری کاهش می‌یابد ولی اثر بیوکنترلی سویه نوترکیب به شکل معنی‌داری بالاتر بود (Delany.2001). اثر سودوموناس‌های نوترکیب روی موجودات غیر هدف توسط گلاندورف و همکاران طی دو سال بررسی شد. آن‌ها نشان دادند که اثرات سویه نوترکیب بر جوامع میکروبی تفاوت معنی‌داری با تیپ وحشی باکتری ندارد ولی قابلیت بیوکنترلی سویه نوترکیب بر علیه قارچ‌های بیمارگر بالاتر بود که نشان از عملکرد صحیح بیوکنترلی سودوموناس نوترکیب بوده است (Glandorf.2001). طی مطالعات دیگر برای بررسی اثر طولانی مدت این عامل بیوکنترل، آزمایش دیگری برای چهار سال انجام شد و باز هم همان نتایج قبلی بدست آمد (Viebahn.2005; Viebahn.2003) در نتیجه نتایج فوق، در حال حاضر این سویه *P. fluorescens* به همراه چندین سویه دیگر شامل *Serratia plymuthica* و *P. trivialis* بعنوان عوامل بیوکنترل با کارایی بالا و بدون اثرات و مخاطرات زیست محیطی بر اکوسیستم ریزوسفر و موجودات غیر هدف معرفی شده‌اند (Scherwinski *et al*.2008).

## ۵- نحوه ردیابی میکروارگانیسم‌های نوترکیب

روش شناسایی و ردیابی سویه‌های زنده مانده، میزان ماندگاری و اثر آنها بر اکوسیستم بسیار مهم می‌باشد که با دو روش مبتنی بر کشت و غیر مبتنی بر کشت قابل تشخیص است. در اکثر مطالعات،GMM معرفی شده به خاک بصورت غیر قابل کشت در می‌آید که تنها با روش‌های مولکولی غیر وابسته به کشت قابل شناسایی‌اند (England.1995). این روش ها شامل الکتروفورز شیب دناتوره کننده (DGGE)، آنالیز برشی دی ان ای ریبوزومی تکثیر شده (ARDRA)، پلی مورفیسم قطعات برش یافته انتهایی (T-RFLP) و پلی مورفیسم کنفورماسیون تک رشته (SSCP) می باشند که اطلاعات جامع‌تری نسبت به روش‌های مبتنی بر کشت به ما می‌دهند. ویبان و همکاران با بررسی پروفایل DGGE دو خاک زراعی گندم تلقیح شده با سودوموناس *P. putida* غیر-نوترکیب و نوترکیب نشان دادند که تفاوت آشکاری از اثر تیمار این سویه‌های باکتریایی مشاهده نشد (Viebahn.2005). یکی از مشکلات مهم در این نوع از مطالعات نحوه نمونه‌گیری است. تعداد تکرارها، حجم نمونه، اینکه روش نمونه‌گیری تصادفی است و یا در فواصل منظم است در نتایج نهایی بسیار تاثیر گذار است. بیشتر محققین برای بررسی اثرات زیست محیطی میکروارگانیسم-های نوترکیب از خاک ریزوسفر استفاده می‌کنند. اما کار کردن با فلور میکروبی ریزوسفر نیز دارای حساسیت‌های خاص خود می-باشد و نیاز به دقت زیادی دارد تا توده خاک مورد مطالعه پاسخ جامع و قابل اعتمادی دهد. از طرف دیگر باید توجه نمود که این مطالعات باید سعی شود تا در زمان طولانی چند ساله انجام و پایش شوند تا بتوان اثرات احتمالی را بطور دقیق‌تر و قابل اعتمادتر بدست آورد. علاوه بر مشکلات نمونه گیری و تنوع و تکرار نمونه‌ها، دسترسی به روش‌های استخراج دی ان ای و آر ان ای متاژنومی از زیست‌گاه‌های مختلف نیز از عوامل محدود کننده هستند (Rastogi and Sani.2011).روش توالی یابی نیز می‌تواند بر کیفیت و نوع اطلاعات فلور میکروبی موثر باشد، البته باید توجه نمود که تکنیک‌های توالی‌یابی پر بازده (High-Throughput Sequencing) مثل نسل‌های پیشرفته توالی یابی ژنوم اطلاعات بیشتر و دقیق‌تری به ما می‌دهند (Caporaso *et al*.2011; Han *et al*.2012)



[ Downloaded from gebsj.ir on 2025-05-17 ]

[ DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.15.7 ]

**۶- روش های ارزیابی مخاطرات احتمالی عوامل میکروبی نوترکیب**

بطور کلی روش علمی ارزیابی مخاطرات احتمالی موجودات نوترکیب مبتنی بر دو اصل است که شامل مورد به مورد بودن و مبتنی بر مستندات علمی بودن می باشد. اصل مورد به مورد بدین معنی است که در صورت تایید یا عدم تایید یک ژنوتیپ نوترکیب میکروارگانیسم به معنی تایید یا عدم تایید ژنوتیپ دیگر آن گونه که حاوی همان ژن است، نمی باشد. لذا برای هر ژنوتیپ (رویداد) لازم است ارزیابی مخاطرات مستقل انجام شود. علاوه بر این گزارش ارزیابی مخاطرات احتمالی باید بر اساس مستندات و روش های علمی باشد. لذا گزارشات فرضی و یا تخیلی در خصوص مخاطرات احتمالی به هیچ وجه مورد قبول تصمیم گیران نیست.

روش‌های علمی ارزیابی اثرات مثبت و یا مخاطرات احتمالی میکروارگانیسم‌های مورد استفاده در صنایع غذایی متفاوت از میکروارگانیسم‌های مورد استفاده در کنترل زیستی و کودهای زیستی می‌باشد. خلاصه مراحل ارزیابی میکروارگانیسم های نوترکیب صنایع غذایی به شرح زیر است.

۱- ارزیابی‌های میکروبیولوژیکی و ژنتیکی: در مطالعه میکروارگانیسم‌های نوترکیب، باید خصوصیات ژنتیکی و فیزیولوژیکی موجود جدید مطالعه و نسبت به والد آن مورد مقایسه قرار گیرد. در این راستا، بررسی ثبات ژنتیکی و تمرکز بر جنبه‌های مربوط به ایمنی شامل حضور عناصر متحرک، احتمال انتقال افقی ژن، سمیت غذایی و بیماری‌زایی و همچنین احتمال حساسیت زا بودن دارای اهمیت است.

۲- ارزیابی‌ها در فرایند تولید: فرآیند تولید فراورده های زیستی تا مرحله قبل از فرمولاسیون، از اجزای مهم موثر در کیفیت نهایی محصول می‌باشد. بنابراین، نوع فرآیندهای مورد استفاده برای تولید و خالص‌سازی باید بطور دقیق انتخاب و استفاده شوند. بسته به نوع محصول ممکن است در محصول نهایی ژن نوترکیب وجود داشته باشد یا نداشته باشد. برای مثال در روغن های خالص شده میزان حضور ژن نوترکیب بسیار کم است.از برای شناسایی تراریخته بودن یا نبودن میکروارگانیسم های موجود در فراورده می توان از روش‌های مبتنی بر PCR یا روش های سرولوژیکی مبتنی بر آنتی بادی-آنتی ژن استفاده کرد. نکته‌ای که در محصولات غذایی حاصل از میکروارگانیسم‌های نوترکیب اهمیت دارد، این است که در حین ارزیابی مخاطرات احتمالی، ایمنی غذایی کلیه ژن‌های نوترکیب موجود در فراورده شامل ژن های انتخابگر (مثل مقاومت به آنتی بیوتیک) و همچنین ژن هدف که ممکن است تولید کننده آنزیم یا پروتئین های غذایی خاص باشد مورد ارزیابی قرار گیرد.

۳- ارزیابی محصول نهایی: در این مرحله لازم است ترکیب، خواص فیزیکی و تکنولوژیکی مواد غذایی مشتق شده از میکروارگانیسم‌های نوترکیب با مواد غذایی مشتق شده از میکروارگانیسم‌های سنتی مورد مقایسه قرار گیرند. در این حالت از روش شباهت و برابری کلی (Substantial Equivalence) استفاده می شود. در این روش، متابولیت‌ها و پروتئین‌های مهم موجود در موجود نوترکیب با موجود والد مقایسه می‌شود و اگر از نظر این متابولیت‌های مهم یکسان باشند، فرض بر این گرفته می شود که موجود نوترکیب با موجود والد یکی است. مهمترین خصوصیاتی که در محصول نهایی مورد ارزیابی قرار می‌گیرند شامل سمیت زایی، آلرژی زایی و سلامت غذایی محصولات غذایی حاصل از میکروارگانیسم نوترکیب هستند و پس از انجام کلیه بررسی‌های مذکور و گرفتن مجوز تولید انبوه، محصول نهایی وارد بازار می‌شود (Aguilera *et al*.2013).

مراحل ارزیابی در زمینه کودها و سموم زیستی نیز شامل موارد زیر است؛

۱- فرایند اولیه ارزیابی مخاطرات احتمالی میکروارگانیسم‌های نوترکیب بعنوان عوامل بیوکنترلی یا کودهای زیستی.

۲- طبقه‌بندی این میکروارگانیسم‌ها بر اساس سطح گروه خطر آنها که به چهار گروه ۱ تا ۴ با توجه به درجه خطر آن‌ها برای حیوان و انسان می‌باشد.

۳- به‌منظور ارزیابی بیشتر ایمنی زیستی یک عامل میکروبی جدید، سمیت آن را می‌توان با استفاده از آزمون سمیت و اثرات زیست محیطی آن را با بررسی تعداد کلنی‌های موجود در ریزوسفر قبل و بعد از تلقیح، بررسی زنده‌مانی و حضور، نرخ



[ Downloaded from gebsj.ir on 2025-05-17 ]
[ DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.15.7 ]

حضور و مقایسه جمعیت میکروبی قبل و بعد از تلقیح، بررسی میزان رشد و بیوماس گیاه و به‌ویژه در مورد عوامل بیوکنترلی بررسی شاخص بیماری مورد ارزیابی قرار می‌گیرند و در صورت داشتن کارایی لازمه، فرموله شده و قابل تجاری‌سازی می‌باشد (Selvakumar *et al*.2014). انجام مطالعات دقیق و ارائه راهکارهای مناسب ارزیابی و مدیریت مخاطرات احتمالی میکروارگانیسم‌های نوترکیب می‌تواند راه استفاده وسیع از این قبیل موجودات را در محیط‌های کشاورزی هموار سازد.

## نتیجه‌گیری

در جهان امروزی در کنار مشکل جوامع بشری برای تأمین غذا و تولید غذای بیشتر، معضلات مهم دیگری مثل تغییرات آب و هوایی و مشکلات زیست محیطی و کاهش ذخایر ژنتیکی نیز وجود دارند که یکی از دلایل آن‌ها استفاده بی‌رویه از فراورده‌های شیمیایی در بخش کشاورزی (از قبیل سموم و کودهای شیمیایی و ....) است. استفاده از عوامل زیستی مثل کودها و سموم زیستی در جهت کاهش مصرف این ترکیبات خطرناک می‌تواند نقش بسیار تاثیرگذاری در حفظ محیط زیست و مزارع کشاورزی داشته باشد. در کنار آن افزایش کارایی این عوامل زیستی با استفاده از فناوری‌های زیستی جدید مثل مهندسی ژنتیک نیز می‌تواند اثرگذاری آن‌ها را افزایش دهد. با این‌حال انتقال ژن‌های جدید به این عوامل زیستی و رهاسازی آن‌ها در محیط‌های کشاورزی می‌تواند با مخاطرات احتمالی زیست محیطی خاصی همراه باشد. لذا با توجه به دستیابی و گسترش فناوری‌های جدید مولکولی برای ردیابی و بررسی اثرات این قبیل میکروارگانیسم‌های نوترکیب در طبیعت، لازم است اثرات احتمالی بطور دقیق بررسی شوند تا بتوان بطور ایمن و کارا از مزایای قطعی این موجودات در بخش کشاورزی استفاده نمود. با توجه به کم بودن تعداد مطالعات صورت گرفته و متفاوت بودن نوع میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه، نمونه‌های مطالعاتی قبلی اکثرا یا اثری نداشتند یا اثرات متفاوتی نشان دادند. لذا لازم است با توجه به استانداردهای ارزیابی مخاطرات احتمالی میکروارگانیسم‌های نوترکیب، ارزیابی مخاطرات احتمالی به صورت مورد به مورد برای هر میکروارگانیسم با توجه به هدف و نوع محیط مورد استفاده و به صورت کاملا علمی انجام پذیرد و در صورتیکه امکان بروز مخاطرات خاصی برای آن میکروارگانیسم نوترکیب وجود داشت، راهکارهای علمی و مدیریتی جلوگیری و یا کاهش آن مخاطرات ارائه شوند تا بتوان از مزایای زیست محیطی و اقتصادی این قبیل فراوده‌های زیستی بهره‌برداری کافی را داشته باشیم.

## منابع


**Adrio JL, Demain AL. 2014**. Microbial enzymes: Tools for biotechnological processes. Biomolecules 4:117-139.

**Aguilera J, Gomes , Olaru I. 2013**. Principles for the risk assessment of genetically modified microorganisms and their food products in the European Union. International Journal of Food Microbiology 67:2–7.

**Al Abboud MA, Ghany TA, Alawlaqi MM. 2014.** Role of biofertilizers in agriculture: a brief review MYCOPATH. 11:95-101.

**Amarger N. 2002.** Genetically modified bacteria in agriculture. Biochimie 84:1061–1072.

**AMFEP. 2015.** Association of manufacturers and formulators of enzyme products. List of commercial enzymes. Available at http://www.amfep.org/content/list-enzymes.

**Antoun H, Prevost D. 2005.** Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. In: Siddiqui, Z.A. (Ed.), PGPR: Biocontrol and Biofertilization. Springer, Dordrecht, 1-38.

**Asadi rahmani H, Khavazi K, Asgharzadeh A, Rejali F, Afshari m. 2012.** Biofertilizer in Iran: Opportunities and challenges. Iranian Journal of Soil And Waters Sciences 26:77-87. (In Farsi with English abstract).

**Ashelford KE, Norris SJ, Fry JC, Bailey MJ, Day MJ. 2000.** Seasonal population dynamics and interactions of competing bacteriophages and their host in the rhizosphere. Applied and Environmental




[ Downloaded from gebsj.ir on 2025-05-17 ]

[ DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.15.7 ]

Microbiology 66:4193–4199.

**Bach I. 2014.** Microbial biofertilizers for improved crop availability of phosphorus from soil and waste (MiCroP), Research Report. University of Copenhagen, Denmark.

**Bankhead S, Landa BB, Lutton E, Weller DM, McSpadden Gardener BB. 2004**. Minimal changes in the rhizobacterial population structure following root colonization by wild type and transgenic biocontrol strains. FEMS Microbiology Ecology 49:307–318

**Bashan Y, Puente ME, Rodriguez-Mendoza MN, Toledo G, Holguin G, Ferrera-Cerrato R, Pedrin S. 1995.** Survival of *Azospirillum brasilense* in the bulk soil and rhizosphere of 23 soil types. Applied and Environmental Microbiology 61:1938–1945.

**Baudoin E, Lerner A, Mirza MS, El Zemrany H, Prigent-Combaret C, Jurkevich E, Moenne-Loccoz Y. 2010.** Effects of *Azospirillum brasilense* with genetically modified auxin biosynthesis gene *ipdC* upon the diversity of the indigenous microbiota of the wheat rhizosphere. Research in microbiology 161:219-226.

**BCC Research Report. 2010.** Biopesticides: The Global Market. Report No: CHM029C. Wellesley, Massachusetts.

**Belkin S. 2003.** Microbial whole cell sensing systems of environmental pollutants. Current Opinion in Microbiology 6:206–212.

**Berg G. 2009.** Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. Applied Microbiology and Biotechnology 84:11–18

**Biofertilizers Market. 2013-2017.** Global industry analysis, size, share, growth, Trends and Forecast. Available at http://www.marketresearchreports.biz. Albany, Canada.

**Bosworth AH, Williams MK, Albrecht KA, Kwiatkowski R, Beynon J, Hankinson TR, Triplett EW. 1994.** Alfalfa yield response to inoculation with recombinant strains of *Rhizobium meliloti* with an extra copy of *dctABD* and/or modified *nifA* expression. Applied and environmental microbiology 60:3815-3832.

**Bron PA, Kleerebezem M. 2011.** Engineering lactic acid bacteria for increased industrial functionality. Bioengineered bugs 2:80-87.

**Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA. 2011.** Global patterns of 16SrRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 108:4516−4522.

**Carcer DA, Martin M, Mackova M, Macek T, Karlson U, Rivilla R. 2007.** The introduction of genetically modified microorganisms designed for rhizoremediation induces changes on native bacteria in the rhizosphere but not in the surrounding soil. The ISME Journal 1:215–223.

**Chandler D, Bailey AS, Tatchell GM, Davidson G, Greaves J, Grant WP. 2011.** The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences 366:1987-1998.

**Chaurasia AK, Apte SK. 2011.** Improved eco-friendly recombinant Anabaena sp. strain PCC7120 with enhanced nitrogen biofertilizer potential. Applied and environmental microbiology 77:395-399.

**Clermont N, Lerat S, Beaulieu C. 2011.** Genome shuffling enhances biocontrol abilities of Streptomyces strains against two potato pathogens. Journal of applied microbiology 111:671-682.

**Codex Alimentarius. 2013.** Guideline for the conduct of food safety assessment of foods produced using recombinant-DNA microorganisms. Available at: http://www. codexalimentarius. net/download/standards. Rome, Italy.

**Colwell RR, Brayton PR, Grimes DJ, Roszak DB, Huq SA, Palmer LM. 1985**. Viable but non culturable *Vibriocholerae* and related pathogen in the environment: implications for release of genetically engineered microorganisms. Nature Biotechnology 3:817–820.

**Da HN, Deng SP. 2003.** Survival and persistence of genetically modified *Sinorhizobium meliloti* in soil. Applied Soil Ecology 22: 1−14

**Dawar S, Wahab S, Tariq M, Zaki MJ. 2010.** Application of Bacillus species in the control of root diseases of crop plants. Archives of Phytopathology and Plant Protection 43:412–418.

**De Leij FAAM Thomas CE, Bailey MJ, Whipps JM, Lynch JM. 1998.** Effect of insertion site and metabolic load on the environmental fitness of a genetically modified *Pseudomonas fluorescens* isolate. Applied and environmental microbiology 64: 2634–2638.

**De Vries J, Wackernagel W. 2002.** Integration of foreign DNA during natural transformation of *Acinetobacter* sp. By homology-facilitated illegitimate recombination. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99:2094-2099.

**Delany IR, Walsh UF, Ross I, Fenton AM, Corkery DM, OGara F. 2001.** Enhancing the biocontrol efficacy of *Pseudomonas fluorescens* F113 by altering the regulation and production of 2,4-diacetylphloroglucinol – improved Pseudomonas biocontrol inoculants. Plant Soil 232:195–205.

**Doblhoff-Dier O, Bahmayer H, Bennet A, Brunius G, Burki K, Cantley M, Collins C, Crooy P, Elmqvist A, Frontali-Botti C, Havenaar R, Haymerle H, Lelieveld H, Lex M, Mahler JL, Martinez L, Mosgaard C, Olsen L, Pazlarova J, Ruddan F, Sarvas M, Stepankova H, Tzotzos G, Wagner K, Werner R. 1999.** Values in risk assessment for the environmental application of microorganisms. Trends Biotechnol Safe biotechnology 9:17307–311.

**Driss F, Rouis S, Azzouz H, Tounsi S, Zouari N, Jaoua S. 2011.** Integration of a recombinant chitinase into *Bacillus thuringiensis* parasporal insecticidal crystal. Current microbiology 62:281-288.

**Dutta SK, Hollowell GP, Hashem FM, Kuykendall LD. 2003.** Enhanced bioremediation of soil containing 2,4-dinitrotoluene by a genetically modified *Sinorhizobium meliloti*. Soil Biol.Biochem 35:667–675.

**England LS, Lee H, Trevors JT. 1995.** Recombinant and wild-type *Pseudomonas aureofaciens* strains introduced into soil microcosms: effect on decomposition of cellulose straw. Molecular Ecology 4:221–230.

[ Downloaded from gebsj.ir on 2025-05-17 ]

[ DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.15.7 ]

**FAO report. 2012.** Current world fertilizer trends and outlook to 2016. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Available at: ftp://ftp.fao.org/ag/agp/docs/cwfto16.pdf. Rome, Italy.

**FDA. 2013.** Food and Drug Administration Center for food Safety and Applied Nutrition (CFSAN) Office of Food Additive Safety Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN000120. Available online at http://www.fda.gov/Food/Food Ingredients Packaging. Maryland, USA.

**Franklin S, Somanchi A, Wee J, Rudenko G, Moseley JL, Rakitsky W. 2011**. Food compositions comprising tailored oils. US patent application No 13/118,369.

**Gagliardi JV, Buyer JS, Angle JS, Russek-Cohen E. 2001.** Structural and functional analysis of whole-soil microbial communities for risk and efficacy testing following microbial inoculation of wheat roots in diverse soil. Soil Biol. Biochem 33: 25–40.

**Girlanda MS, Perotto S, Moenne-Loccoz Y, Bergero R, Lazzari A, Defago G, Bonfante P, Luppi AM. 2001.**Impact of biocontrol *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and a genetically modified derivative on diversity of culturable fungi in the cucumber rhizosphere. Appl. Environ. Microbiol 67:1851–1864.

**Glandorf DCM, Verheggen P, Janssen T, Joritsma J, Thomashow LS, Leeflang P, Smit E, Wernars K, Lauereijs E, Thomas-Oates JE, Bakker PAHM, van Loon LC. 2001**. Effect of *Pseudomonas putida* WCS358r, genetically modified with the *phz* biosynthetic locus, on the fungal rhizosphere of microflora of field-grown wheat as determined by 18S rDNA analysis. Appl. Environ. Microbiol 67:3371–3378.

**Gupta V, Schmoll M, Mazutti M, Maki M, Tuohy M. 2013.** Handbook of applications of microbial engineering. CRC press, Florida, United States, 100-150

**Hajek A. 2004.** Book review of natural enemies; an introduction to biological control. Cambridge University Press. Cambridge, UK, 112-244.

**Han I, Lee K, Han J, Doan T, Kim S, Park J. 2012.** Improved detection of microbial risk of releasing genetically modified bacteria in soil by using massive sequencing and antibiotic resistance selection. Journal of Hazardous Material 227:172−178.

**Heijnen CE, van Elsas JD, Kuikman PJ, van Veen JA. 1988.** Dynamics of *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii introduced into soil; the effect of bentonite clay on predation by protozoa. Soil Biol. Biochem 20:483–488.

**Hernandez AF, Parron T, Tsatsakis AM, Requena M, Alarcon R, Lopez-Guarnido O. 2013.** Toxic effects of pesticide mixtures at a molecular level: their relevance to human health. Toxicology 307:136-145.

**Hernandez-Rodriguez CS, Ruiz de Escudero I, Asensio AC, Ferre J, Caballero P. 2013.** Encapsulation of the *Bacillus thuringiensis* secretable toxins Vip3Aa and Cry1Ia in *Pseudomonas fluorescens.* Biological Control 66:159-165.

**Idriss EE, Makarewicz O, Farouk A, Rosner K, Greiner R, Bochow H, Borriss R. 2002.** Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect. Microbiology 148:2097-2109.

**Ike A, Sriprang R, Ono H, Murooka Y, Yamashita M. 2007.** Bioremediation of cadmium contaminated soil using symbiosis between leguminous plant and recombinant rhizobia with the *MTL4* and the *PCS* genes. Chemosphere 66:670-1676.

**Jang YS, Park JM, Choi S, Choi YJ, Seung DY, Cho JH, Lee SY. 2012.** Engineering of microorganisms for the production of biofuels and perspectives based on systems metabolic engineering approaches. Biotechnology advances 30:989-1000.

**Johansen JE, Binnerup SJ, Lebolle KB, Masher F, Sorensen J, Keel C. 2002.** Impact of biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0 on rhizosphere bacteria isolated from barley (Hordeum vulgare L.) with special reference to Cytophag a-like bacteria. J. Appl. Microbiol 93:1065–1074.

**Juturu V, Wu JC. 2012.** Microbial xylanases: engineering, production and industrial applications. Biotechnology advances 30:1219-1227.

**Kapoor M, Rajagopal R. 2011.** Enzymatic bioremediation of organophosphorus insecticides by recombinant organophosphorous hydrolase. International Biodeterioration and Biodegradation 65:896-901.

**Keasling JD. 2012**. Synthetic biology and the development of tools for metabolic engineering. Metabolic engineering 14:189-195.

**Khan MR, Khan N, Khan SM. 2001.** Evaluation of agricultural materials as substrate for mass culture of fungal biocontrol agents of fusarial wilt and root knot nematode diseases. Annals of Applied Biology 22:50−51.

**Khan MR. 2008.** Handbook of Plant Nematodes-Methodology, Morphology, Systematics, Biology and Ecology. Science Publishers, Enfield, USA, 205-360.

**Kowsari M, Zamani M, Motallebi M, Joorabchi E. 2013.** Transformation of *trichoderma harzianum* t8 with *gfp* gene to facilitate its monitoring in soil and use of sem to study interaction of *t. harzianum* with *rhizoctoniasolani* sclerotia. Iran. J. Plant Path 49:153-156.

**Kumari A, Choudhary M, Baloda S. 2013.** Biofertilizers and their application in flower crops-a review. Annals of Agri Bio Research 18:195-205.

**Leclere V, Bechet M, Adam A, Guez JS, Wathelet B, Ongena M, Jacques P. 2005**. Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities. Applied and environmental microbiology 71:4577-4584.

**Lenski RE. 1991.** Quantifying fitness and gene stability in microorganisms. Biotechnology 15: 173–192.

**Lenski RE. 1993.** Evaluating the fate of genetically modified microorganisms in the environment: Are they inherently less fit? Experientia 49:201-209.

**Li WP, Xia LQ, Ding XZ, Lv Y, Luo YS, Hu SB, Yan F. 2012.** Expression and characterization of a recombinant Cry1Ac crystal protein fused with an insect-specific neurotoxin ω-ACTX-Hv1a in *Bacillus thuringiensis.* Gene 498:323-327.

**Lin M, Smalla K, Heuer H, van Elsas JD. 2000.** Effect of an *Alcaligenes faecalis* inoculant on bacterial communities in flooded soil microcosms planted with rice seedlings.



[ Downloaded from gebsj.ir on 2025-05-17 ]

[ DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.15.7 ]

Appl. Soil. Ecol 15:211–225.

**Liu ZL, Sinclair JB. 1993.** Colonization of soybean roots by *Bacillus megaterium* B153-2-2. Soil Biol. Biochem 25:849–855.

**Lorenz MG, Wackernagel W. 1994.** Bacterial gene transfers by natural genetic transformation in the environment. Microbiology Review 58: 563–602.

**Lugtenberg BJJ, Dekkers L, Bloemberg GV. 2001.**Molecular determinants of rhizosphere colonization by Pseudomonas. Ann. Rev. Phytopathol 39:461–490.

**Magarvadiya DK, Patel VT. 2014.** Knowledge and attitude of farmers regarding biofertilizers. Gujarat Journal of Extension Education 25: 138-149.

**Malhotra M, Srivastava S. 2006.** Targeted engineering of *Azospirillum brasilense* SM with indole acetamide pathway for indoleacetic acid over-expression. Canadian journal of microbiology 52:1078-1084.

**Malmierca MG, Cardoza RE, Alexander NJ, McCormick SP, Hermosa R, Monte E, Gutierrez S. 2012.** Involvement of *Trichoderma trichothecenes* in the biocontrol activity and induction of plant defense-related genes. Applied and environmental microbiology 78:4856-4868.

**Mohiddin FA, Khan MR, Khan SM. 2010.** Why Trichoderma is considered super hero (super fungus) against the evil parasites? Plant Pathology Journal 9:1–11.

**Morrissey JP, Walsh UF, ODonnell A, Moenne-Loccoz Y, OGara F. 2002.** Exploitation of genetically modified inoculants for industrial ecology applications. Antonie Van Leeuwenhoek 81:599-606.

**Naimov S, Nedyalkova R, Staykov N, Weemen-Hendriks M, Minkov I, de Maagd RA. 2014.**mA novel *Cry9Aa* with increased toxicity for Spodoptera exigua (Hubner). Journal of invertebrate pathology115:99-101.

**Ntzani EE, Chondrogiorgi M, Ntritsos, Evangelou E, Tzoulaki I. 2013.** Literature review on epidemiological studies linking exposure to pesticides and health effects. EFSA supporting publication 10: 197-497.

**Oliveira C, Guimaraes PM, Domingues L. 2011.** Recombinant microbial systems for improved β-galactosidase production and biotechnological applications. Biotechnology advances 29:600-609.

**Olson DG, McBride JE, Joe Shaw A, Lynd LR. 2012.**Recent progress in consolidated bioprocessing. Current opinion in Biotechnology 23: 396-405.

**Ophir T, Gutnick DL. 1994.** A role for exo polysacharides in the protection of microorganisms from desiccation. Appl. Environ. Microbiol 60:740–745.

**Orikasa Y, Nodasaka Y, Ohyama T, Okuyama H, Ichise N, Yumoto I, Morita N, Wei M, Ohwada T. 2010.** Enhancement of the nitrogen fixation efficiency of genetically-engineered *Rhizobium* with high catalase activity. J Biosci Bioeng 110 (4): 397-402

**Pal KK, Tilak KVR, Saxena AK, Dey R, Singh CS. 2000.** Antifungal characteristics of a fluorescent Pseudomonas strain involved in the biological control of *Rhizoctonia solani*. Microbiological Research 155: 233−242.

**Parlane NA, Rehm BH, Wedlock DN, Buddle BM. 2014.** Novel particulate vaccines utilizing polyester nanoparticles (bio-beads) for protection against *Mycobacterium bovis* infection—A review. Veterinary immunology and immunopathology 158:8-13.

**Peighami-Ashnaei S, Sharifi-Tehrani A, Ahmadzadeh M, Behboudi K. 2009.** Interaction of different media on production and biocontrol efficacy of *Pseudomonas fluorescens* P-35 and *Bacillus subtilis* B-3 against grey mould of apple. Journal of Plant Pathology 91:65–70.

**Prieto JA, Aguilera J, Randez-Gil F. 2006.** Genetic engineering of baker's yeast: challenges and outlook. Food Biotechnology: Second Edition, Revised and Expanded. CRC Press, Boca Raton 245–279.

**Prosser JI, Bohannan BJM, Curtis TP, Ellis RJ, Firestone MK, Freckleton RP, Green JL, Green JE, Killham K, Lennon JJ, Osborn AM, Solan M, van der Gast CJ, Young JPW. 2007.** The role of ecological theory in microbial ecology. Nat. Rev. Microbiol 5:384–392.

**Rasala BA, and Mayfield SP. 2014.** Photosynthetic biomanufacturing in green algae; production of recombinant proteins for industrial, nutritional, and medical uses. Photosynthesis research 123: 227-239.

**Rastogi G, Sani RK. 2011**. Handbook of molecular techniques to assess microbial community structure, function, and dynamics in the environment. Microbes and Microbial Technology, Springer, New York, 29–57.

**Reanney DC, Roberts WP, Kelly WJ. 1982.** Handbook of genetic interactions among microbial communities. Microbial interactions and communities. Academic Press, Toronto, Canada 1: 287–322.

**Rodriguez H, Gonzalez T, Selman G. 2000.** Expression of a mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbicola* in two rhizobacterial strains. Journal of biotechnology 84:155-161.

**Saharan BS, Nehra V. 2011**. Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. Life Sciences and Medicine Research 21:1–30.

**Salehi Jouzani Gh and Tohidfar M. 2013.** Plant molecular farming: future prospects and biosafety challenges. Biosafety 2:136.

**Salehi Jouzani Gh, Moaven E, Morsali H. 2014.** Optimization of a wettable powder formulation for two native *Bacillus thuringiensis* strains, Biological Control of Pest and Plant Diseases 3: 1-68 (In Farsi with English abstract).

**Salehi Jouzani Gh, Pourjan Abad A, Seifinejad A, Marzban R, Kariman K, Maleki B. 2008a.** Distribution and diversity of dipteran-specific cry and *cyt* genes in native *Bacillus thuringiensis* strains obtained from different ecosystems of Iran. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 35:83-94.

**Salehi Jouzani Gh, Seifinejad A, Saeedizadeh A, Nazarian A, Yousefloo M, Soheilivand S, Mousivand M, Jahangiri R, Yazdani M, Maali Amiri R, Akbari S. 2008b.** Molecular detection of nematicidal crystalliferous *Bacillus thuringiensis* strains of Iran and evaluation of their toxicity on free living and plant parasitic nematodes. Canadian Journal of Microbiology 54:812–817.

**Salehi Jouzani Gh. 2012**. Risk Assessment of GM Crops; Challenges in Regulations and Science. Biosafety 1:113.



[ Downloaded from gebsj.ir on 2025-05-17 ]

[ DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.15.7 ]

**Sarantinopoulos P. 2014.** Evolutionary engineering: A powerful tool for improving industrially relevant properties of engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains for cellulosic ethanol production. In: Proceeding of 143rd Annual Meeting and Exhibition congress. San Diego Convention Center, California, USA, 200-205.

**Sashidhar B and Podile A. 2009.** Transgenic expression of glucose dehydrogenase in *Azotobacter vinelandii* enhances mineral phosphate solubilization and growth of sorghum seedlings. Microb Biotechnol 2: 521–529.

**Scherwinski K, Grosch R, Berg G. 2008.** Effect of bacterial antagonists on lettuce: active biocontrol of *Rhizoctonia solani* and negligible, short-term effects on non-target microorganisms. FEMS Microbiology Ecology 64:106–116.

**Selvakumar G, Panneerselvam P, Ganeshamurthy AN. 2014.** Biosafety of Novel Bioinoculants. Journal of Biofertilizers and Biopesticides 5: 1.

**Setten L, Soto G, Mozzicafreddo M, Fox R, Lisi C, Cuccioloni M, Ayub ND. 2013.** Engineering *pseudomona sprotegens* Pf-5 for nitrogen fixation and its application to improve plant growth under nitrogen-deficient conditions. PloS one 8: 137-149.

**Smit E, Wolters AC, Lee H, Trevors JT, van Elsas JD. 1996.** Interactions between a genetically marked *Pseudomonas fluorescens* strain and bacteriophage R2f in soil: effects of nutrients, alginate encapsulation and the wheat rhizosphere. Microb. Ecol 31:125–140.

**Snow AA, Andow DA, Gepts P, Hallerman EM, Power A, Tiedje JM. 2005.** Genetically engineered organisms and the environment: current status and recommendations. Ecological Applications15:377–404.

**Solecki R, Stein B, Frische T, Matezki S, Wogram J, Streloke M. 2014.** Paradigm shift in the risk assessment of cumulative effects of pesticide mixtures and multiple residues to humans and wildlife: German proposal for a new approach. Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheitn 9:329-331.

**Stephens PM, OSullivan M, OGara F. 1987.** Effect of bacteriophage on colonization of sugar beet roots by *Pseudomonas fluorescent* spp. Applied and Environmental Microbiology 53:1164–1167.

**Timms-Wilson TM, Kilshaw K, Bailey MJ. 2004.** Risk assessment for engineered bacteria usedin biocontrol of fungal disease in agricultural crops. Plant Soil 266:57–67.

**Trabelsi D, Mhamdi R. 2013**. Microbial Inoculants and Their Impact on Soil Microbial Communities: A Review. BioMed Research International 2013:1-11.

**Uusitalo JM, Helena Nevalainen KM, Harkki AM, Knowles JK, Penttila ME. 1991.**Enzyme production by recombinant *Trichoderma reesei* strains. Journal of biotechnology 17:35-49.

**Van Dillewijn P, Villadas PJ, Toro N. 2002.** Effect of a *Sinorhizobium meliloti* strain with a modified *putA* gene on the rhizosphere microbial community of alfalfa. Applied and Environmental Microbiology 68:4201–4208.

**Van OverbeekLS, Eberl L, Giskov M, Molin S, van Elsas JD. 1995.** Survival of and induced stress resistance in carbon-starved *Pseudomonas fluorescens* cells residing in soil. Applied and Environmental Microbiology 61:4202–4208.

**Velivelli S, De Vos P, Kromann P, Declerck S, Prestwich B. 2014.** Biological control agents: from field to market, problems, and challenges. Trends in biotechnology 32:493-496.

**Velkov VV. 1999.** How environmental factors regulate mutagenesis and gene transfer in microorganisms. Journal of Biosciences 24:529−559.

**Velkov VV. 2001.**Stress-induced evolution and the biosafety of genetically modified microorganisms released into the environment. J. Biosci. Journal of Biosciences 26:667–683.

**Viebahn M, Doornbos R, Wernars K, van Loon LC, Smit E, Bakker PAHM. 2005.** Ascomycete communities in the rhizosphere of field-grown wheat are not affected by introductions of genetically modified *Pseudomonas putida* WCS358r. Environ. Microbiol 7: 1775–1785.

**Viebahn M, Glandorf DCM, Ouwens TWM, Smit E, Leeflang P, Wernars K, Thomashow LS, van Loon LC, Bakker PAHM. 2003.** Repeated introduction of genetically modified *Pseudomonas putida* WCS358 without intensified effects on the indigenous microflora of field-grown wheat. Applied Environment and Microbiology 69:3110–3118.

**Viebahn M, Wernars K, Smit E, van Loon LC, DeSantis TZ, Andersen GL, Bakker PAHM. 2006.** Microbial diversity in wheat rhizosphere as affected by genetically modified *Pseudomonas putida* WCS358r. Multitrophic Interactions in Soil and Integrated Control. IOBC 29: 167–172.

**Wackett LP. 2014.** Bioremediation Strategies Derived from Enzyme Studies. In Annual Meeting and Exhibition. In: Proceeding of 143rd Annual Meeting and Exhibition congress. San Diego Convention Center, California, USA, 114-119.

**Wang Z, Crawford DL, Magnuson TS, Bleakley BH, Hertel G. 1991**. Effects of bacterial lignin peroxidase on organic carbon mineralization in soil using recombinant Streptomyces strains. Canadian Journal of Microbiology 37:287–294.

[ Downloaded from gebsj.ir on 2025-05-17 ]

[ DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.15.7 ]

# Biosafety aspects of deliberate release of recombinant microorganisms in the agricultural environments

**Helen Pourmazahe1ri[1] and Gholamreza Salehi Jouzani[2*]**

1. MSc University of Tehran

2. Professor Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREO), Karaj, Iran.

*Corresponding Author: gsalehi@abrii.ac.ir

## Abstract

Recombinant or genetically modified microorganisms (GMMs) have high potential to provide valuable services to the agriculture sector. For example, it is possible to produce GM microbial biopesticides and biofertilizers with higher efficiencies, high quality animal feed supplements (enzyme sources and probiotics), functional and enriched foods, and also bioremediation of polluted agricultural environments. Regarding the high potential and proven advantages of these kinds of microorganisms, reduction of the concerns about their risks will open the way for their commercialization in the near future. During risk assessment of GMMs, some characteristics, including the level of durability, gene flow and possible horizontal gene flow to other microbial flora in the environment, possible effects on non-target organisms - especially useful microorganisms in the rhizosphere – and, finally, human health and food safety concerns, must be evaluated. Although, numerous studies have been dedicated to the environmental risk assessment of GM plants, the knowledge about gained is unfortunately still insufficient, causing their large scale production and commercialization to be very slow. This paper reviews possible benefits of GMMs and also their possible environmental effects related to divers agricultural environments with emphasis on GM PGPRs (biofertilizers) and GM microbial agents used as biopesticides for control of plant pests and diseases. Finally, it will be argued that the benefits and environmental effects of GMMs should be compared with the negative effects of chemical fertilizers and pesticides which are widely used in agriculture sector, and also with the potential effects of wild type microorganisms.

**Keywords:** Biodiversity; Biofertilizers; Biopesticides; Genetically Modified Microorgansims (GMMs)

[ Downloaded from gebsj.ir on 2025-05-17 ]

[ DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.15.7 ]