

## جداسازی باکتریهای دارای آنزیم ارگانوفسفوروس اسید انهیدراز و شناسایی سویه دارای بیشترین فعالیت هیدرولازی

رحیم سروری زنجان<sup>۱</sup> سید محسن میر اسماعیلی<sup>۲</sup> علی محمد لطیفی<sup>۳</sup> ابراهیم ولی پور<sup>۴</sup>

### چکیده

**سابقه و هدف:** در ایران آفت کش‌هایی از نوع ارگانوفسفوره از قبیل کلروپیریفوز و دیازینون در کشاورزی استفاده وسیعی دارد. این ترکیبات موجب غیر فعال شدن آنزیم کولین استراز شده و مانع انتقال پیام عصبی می‌شود. این مسمومیت در انسان موجب بیماری و حتی مرگ می‌شود. بنابراین در این مطالعه از مناطق مختلف آلوده به ارگانوفسفوره سویه‌های مختلف باکتریایی جداسازی شد و سویه‌ای با بیشترین توانایی در هیدرولیز این ترکیبات انتخاب گردید تا با هدف رفع آلودگی‌های محیط از این ترکیبات مضر، مورد استفاده قرار گیرد.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه از پساب کارخانجات شیمیایی و خاک‌های کشاورزی آلوده نمونه‌برداری شد و نمونه‌ها به وسیله محیط کشت نمکی معدنی غنی شده با کلروپیریفوز و دیازینون، چندین سویه باکتریایی جداسازی شدند. این سویه‌ها دارای آنزیم ارگانوفسفوره انهیدراز بوده و می‌توانستند از دیازینون و کلروپیریفوز به عنوان منبع کربن و فسفر استفاده نمایند. یکی از این سویه‌ها انتخاب شد و قدرت تجزیه‌کنندگی آن از طریق کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) مورد بررسی قرار گرفت. سپس این سویه به روش برگی مورد شناسایی بیشتر قرار گرفت.

**یافته‌ها:** از پساب و خاک کشاورزی، ده سویه باکتریایی جداسازی شدند که این سویه‌ها از دیازینون و کلروپیریفوز به عنوان منبع کربن و فسفر استفاده می‌نمودند. یکی از این سویه‌ها که سریعتر و بهتر از بقیه می‌توانست رشد کند و توانایی تجزیه بالایی داشت (Imam Hossein University 4) IHU نامگذاری گردید و براساس ویژگی‌های بیوشیمیایی و میکروسکوپی این سویه به عنوان سویه‌ای از پseudomonas ها معرفی شد.

**استنتاج:** با توجه به این یافته‌ها سویه باکتریایی جداسازی شده آفت کش‌های ارگانوفسفوره را به عنوان منبع کربن و فسفر مصرف می‌کند. مصرف این ترکیبات از طریق میکروارگانیسم‌ها پدیده مهمی است زیرا از این طریق، ترکیبات سمی حذف شده و آلودگی محیط برطرف می‌شود. نتیجه این مطالعه نشان می‌دهد که این سویه می‌تواند جهت رفع آلودگی ناشی از آفت کش‌های ارگانوفسفوره مورد استفاده قرار بگیرد.

**واژه‌های کلیدی:** دیازینون، کلروپیریفوس، آنزیم ارگانوفسفوروس اسید انهیدراز، رفع آلودگی

### مقدمه

ترکیبات ارگانوفسفوره از مواد شیمیایی بسیار سمی است و به عنوان آفت کش‌ها، حشره‌کش‌ها و عوامل شیمیایی جنگی مورد استفاده قرار می‌گیرند این ترکیبات سبب غیر فعال شدن آنزیم استیل کولین استراز شده و

E-mail : r\_sorouri@yahoo.com

**مؤلف مسئول:** دکتر رحیم سروری زنجان - زنجان، بلوار آزادی، ستاد مرکزی دانشگاه علوم پزشکی زنجان

۱. دکترای میکروبیولوژی پزشکی استادیار دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج) و دانشگاه علوم پزشکی زنجان ۳. مربی و دانشجو دکتری بیوتکنولوژی دانشگاه امام حسین (ع)

۲. کارشناس ارشد بیوتکنولوژی - مرکز ناباروری شهید صدوقی یزد ۴. کارشناس ارشد بیوتکنولوژی مربی دانشگاه علوم پزشکی زنجان

تاریخ دریافت: ۸۷/۱/۲۵ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۸۷/۲/۹ تاریخ تصویب: ۸۷/۱۱/۹

انتقال پیام عصبی را مختل می کنند. ترکیبات ارگانوفسفوره (Organophosphorous Pesticides) برای انسان هم سمی بوده و موجب ایجاد مسمومیت های عصبی و فلج شدن و یا حتی سبب مرگ می شود (۱).

این نوع ترکیبات به ویژه کلروپیریفوز و دیازینون در ایران بخصوص در استان های شمالی و شمال غرب کشور نیز مانند سایر کشورهای آسیایی به عنوان آفت کش کاربرد وسیعی دارد. بیشتر ابزارهای شیمیایی و فیزیکی از قبیل حرارت، سوپراکسیداز، دی اکسید کربن و غیره که برای رفع آلودگی ناشی از ترکیبات ارگانوفسفوره به کار می روند، نقایص و مشکلات زیادی دارند، زیرا این روش ها اغلب سمی، حساسیت زا، خورنده و غیر اختصاصی بوده و به محیط اطراف آسیب می رسانند. بنابراین برای هیدرولیز و شکستن این ترکیبات سمی به یک تکنولوژی سالم و بی خطر نیاز است. یکی از تکنولوژی های مفید و بی خطر استفاده از روش های بیولوژیکی و آنزیم، جهت رفع آلودگی است. آنزیم ارگانوفسفوره آنهیدراز (OPAA)<sup>۱</sup> موجود در باکتری پسودوموناس دیمینوتا یا فلاوباکتریوم یکی از مهمترین آنزیم هایی است که جهت مطالعه فعالیت آنها علیه عوامل عصبی و آفت کش ها مورد توجه محققین قرار گرفته است (۶ تا ۲۶). آنزیم OPAA قابلیت تحمل PH بالا را دارد و نیز توانایی تجزیه طیف وسیعی از آفت کش های ارگانوفسفاتی را دارد. بر اساس مطالعات تحقیقاتی مختلف، تجزیه خنثی کردن آلودگی های مربوط به ترکیبات ارگانوفسفوره توسط باکتری ها بسیار مطلوب است (۵، ۷). پس از شکست کلروپیریفوز و دیازینون، این ترکیبات به دو جزء تبدیل می شود که یکی از اجزاء آن بنام ۳ و ۵ و ۶- تری کلروپیریدینول (TCP)، به عنوان بیومارکر استفاده می شود زیرا فقط چند مورد از میکروارگانیسم های مصرف کننده این ترکیبات گزارش شده است (۸).

علاوه بر پتانسیل بسیار موثر این آنزیم ها در رفع آلودگی عوامل عصبی و آفت کش ها در سطوح خارجی یا مسیرهای آبی، کاربرد این آنزیم ها در پزشکی نیز مورد توجه قرار گرفته است. یک گروه اسرائیلی نشان دادند که آنزیم OPAA به دست آمده از سودوموناس توانایی حفاظت از موش در برابر ۶ تا ۷ میکروگرم تزریق وریدی پاراکسون و دی ایزوپروپیل فروئورفسفات (DFP) (که از ترکیبات بسیار سمی ارگانوفسفوره هستند) را دارد. لازم به ذکر است که این مقدار تزریق چندین برابر مقدار کشنده (به ترتیب ۳/۸ تا ۷/۳ و ۲/۹) این مواد است (۹، ۸).

در این پژوهش با نمونه برداری از مناطق مختلف کشور که به این نوع ترکیبات از جمله کلروپیریفوز و دیازینون آلوده بودند، چند سویه از باکتری های بومی حاوی آنزیم OPAA جداسازی و هویت یک سویه برتر آن مشخص شد.

هدف از این تحقیق جداسازی و معرفی یک سویه بومی برتر با توانایی تولید آنزیم ارگانوفسفوروس اسید آنهیدراز جهت حذف بیولوژیکی<sup>۲</sup> ارگانوفسفات ها است. به عبارت دیگر این تحقیق در پی یافتن آنزیمی است که بتواند ساختار فعال عوامل ارگانوفسفات ها را خنثی نماید و بدین وسیله از تاثیرات مخرب زیست محیطی و مخاطرات مرگبار عوامل شیمیایی مذکور ممانعت کند. کاربرد فرآورده ناشی از این تحقیق می تواند بسیار وسیع باشد؛ مثلاً در زدودن آلاینش ناشی از حشره کش ها، آفت کش ها، بقایای عوامل شیمیایی بجا مانده از حمله دشمن و مصارف دیگر. امروزه با استفاده از روش های پیشرفته بیوتکنولوژی، نانو بیو و مهندسی آنزیم گام هایی در راستای تولید واکسن و آنتی سرم های اختصاصی علیه این عوامل بسیار خطرناک برداشته شده است. تحقیق حاضر می تواند به عنوان یک اقدام پایه ای در حصول نتایج مطلوب اشاره شده در کشورمان مفید باشد.

1. Organophosphorous acid anhydraz  
2. Bioremediation

## مواد و روش ها

ترکیبات ارگانوفسفوره استفاده شده:

آفتکش های کلروپیریفوز و دیازینون مورد نیاز با درجه خلوص (۹۵ درصد) بوسیله کارخانه تولید فرآورده های شیمیایی ایران، با شماره ثبت ۱۲۷ تهیه شد و مورد استفاده قرار گرفت.

تهیه محیط کشت:

محیط نمکی معدنی (MSM)<sup>۱</sup> حاوی کلروپیریفوز و دیازینون برای جداسازی باکتری ها مورد استفاده قرار گرفت (۱۱،۱۰).

جداسازی سویه های باکتریایی حاوی آنزیم OPAA:

از مناطق مختلف کشور از قبیل مزارع کشاورزی استان آذربایجان شرقی و پساب کارخانجات سم سازی در جاده ساوه و شهرک صنعتی قزوین نمونه برداری شد و مقدار ۱۰ گرم از نمونه های حاکی و ۱۵ میلی لیتر از نمونه های آبی به ارلن های ۲۵۰ میلی لیتری حاوی محیط کشت MSM اضافه شد و در شیکرانکوباتور به مدت ۷۲ ساعت در دور ۲۶۰ rpm و دمای ۲۷ درجه سانتی گراد اتوگذاری شد. سپس

نمونه ها در محیط کشت MSM حاوی ۲۵۰ mg کلروپیریفوز و دیازینون تلقیح شدند و پس از آن هر دو هفته یکبار به ترتیب در غلظت های ۴۰، ۶۰، ۱۰۰، ۱۴۰، ۱۸۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر زیر کشت شدند که در نهایت چند سویه باکتریایی که می توانستند در محیط کشت حاوی این ترکیبات رشد کنند جداسازی شدند. این سویه ها در غلظت ۱۴۰ میلی گرم بر لیتر رشد بهتری داشتند. سپس سویه برتر از بین این سویه های مختلف انتخاب شده و به روش برگگی<sup>۲</sup> تعیین هویت شدند (۱۳،۱۲).

مطالعه میزان و قدرت تجزیه کنندگی سویه انتخاب شده:

ابتدا سویه مورد نظر در محیط MSM که در آن کلروپیریفوز و دیازینون تنها منبع کربن و فسفر بود کشت داده شد و میزان کاهش کلروپیریفوز در زمان های مختلف بوسیله کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) مورد بررسی قرار گرفت (۶،۱۵،۱۴). مشخصات دستگاه (HPLC مدل 1100 Cecil)، شرایط و میزان تزریق و همچنین طول موج مورد مطالعه برای هر یک از ترکیبات در جدول شماره ۱ آمده است.

جدول شماره ۱: مشخصات دستگاه HPLC برای شناسایی و تعیین مقدار آفت کش ها

| شرایط HPLC      | دیازینون                                          | کلروپیریفوس                                       | ۳ و ۶-تری کلرو ۲-پیریدینول (TCP)                  |
|-----------------|---------------------------------------------------|---------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| ستون            | C18 (۲۵cm × ۴/۶mm)                                | C18 (۲۵cm × ۴/۶mm)                                | C18 (۲۵cm × ۴/۶mm)                                |
| دمای ستون       | ۳۰°C                                              | ۳۰°C                                              | ۳۰°C                                              |
| سرعت جریان ستون | ۱/۵ ml/Min                                        | ۱/۵ ml/Min                                        | ۱/۵ ml/Min                                        |
| طول موج         | ۲۴۶ nm                                            | ۲۸۰ nm                                            | ۳۲۰ nm                                            |
| حساسیت دتکتور   | ۰/۰۵                                              | ۰/۰۲                                              | ۰/۰۲                                              |
| حجم تزریق       | ۵μl                                               | ۵μl                                               | ۴μl                                               |
| فاز متحرک       | استونیتریل (۸۰٪) و آب (۱۹/۵٪) و استیک اسید (۰/۵٪) | استونیتریل (۸۰٪) و آب (۱۹/۵٪) و استیک اسید (۰/۵٪) | استونیتریل (۸۰٪) و آب (۱۹/۵٪) و استیک اسید (۰/۵٪) |

1. Mineral Salts Medium
2. Bergey's manual

## نتایج

جداسازی سویه های باکتریایی تجزیه کننده دیازینون و کلروپیریفوز:

۱۰ کلونی مختلف توانستند در محیط MSM حاوی کلروپیریفوز و دیازینون رشد کنند. این کلونی ها به صورت  $G_{15}E$ ،  $G_{13}C$ ،  $G_6A$ ،  $G_{12}B$ ،  $G_{19}C$ ،  $IHU_4$ ،  $S_{11}C$ ،  $Y_6B$ ،  $S_8D$ ،  $S_7$  نامگذاری شدند سپس رشد این سویه ها در محیط MSM با ترکیبات مختلف بررسی شد (جدول شماره ۲). سویه  $IHU_4$  که از پساب کارخانه تولید فرآورده های بیوشیمیایی در جاده ساوه جداسازی شده بود، بهتر از بقیه می توانست از این ترکیبات سمی به عنوان منبع کربن و فسفر استفاده کرده و رشد کند؛ بنابراین این سویه جهت بررسی بیشتر انتخاب شد.

شناسایی سویه جداسازی شده ( $IHU_4$ ):

ریختزایی و خصوصیات بیوشیمیایی و رشد این سویه بررسی شد. مشخص شد که این سویه بر اساس رده بندی به روش برگگی مربوط به پseudomonas ها می باشد (جدول شماره ۳).

جدول شماره ۳: ویژگی های سویه جداسازی شده

| ردیف | تست مورد مطالعه         | نتیجه                           |
|------|-------------------------|---------------------------------|
| ۱    | شکل و رنگ گرم           | باسیل گرم منفی                  |
| ۲    | رشد بر روی نوترینت آگار | کلونی گرم رنگ و دارای حاشیه صاف |
| ۳    | رشد بر روی مک کانکی     | مثبت                            |
| ۴    | تست تحرک                | مثبت                            |
| ۵    | تست OF                  | O+ و F-                         |
| ۶    | تست TSI                 | مثبت                            |
| ۷    | تست اکسیداز             | مثبت                            |
| ۸    | تست کاتالاز             | مثبت                            |

بررسی رشد سویه  $IHU_4$  در محیط MSM که دارای ترکیبات مختلفی به عنوان منبع کربن و فسفر می باشد: با مطالعه رشد سویه  $IHU_4$  در محیط MSM که در آن گلوکز به عنوان منبع کربن و دیازینون یا کلروپیریفوز به عنوان تنها منبع فسفر بود، مشخص کرد که این سویه در محیط کشت حاوی کلروپیریفوز و دیازینون می تواند به رشد خود ادامه دهد در حالی که در محیط کشت فاقد کلروپیریفوز و دیازینون ادامه رشد و تکثیر در اوایل منحنی متوقف می شود (نمودار شماره ۱).

جدول شماره ۲: سویه های جداسازی شده در محیط های MSM با ترکیبات مختلف

| نام سویه  | $IHU_4$       | $G_{19}C$ | $G_{12}B$ | $G_6A$   | $G_{13}C$       | $G_{15}E$ | $S_7$           | $S_8D$          | $Y_6B$   | $S_{11}C$ |
|-----------|---------------|-----------|-----------|----------|-----------------|-----------|-----------------|-----------------|----------|-----------|
| نوع منبع* | عالم رشد      | عالم رشد  | عالم رشد  | عالم رشد | عالم رشد        | عالم رشد  | عالم رشد        | عالم رشد        | عالم رشد | عالم رشد  |
| ۱         | عالم رشد      | عالم رشد  | عالم رشد  | عالم رشد | عالم رشد        | عالم رشد  | عالم رشد        | عالم رشد        | عالم رشد | عالم رشد  |
| ۲         | رشد بسیار خوب | رشد خوب   | رشد خوب   | رشد خوب  | رشد نسبتاً خوب  | رشد خوب   | رشد نسبتاً خوب  | رشد نسبتاً خوب  | رشد خوب  | رشد خوب   |
| ۳         | رشد بسیار خوب | رشد خوب   | رشد خوب   | رشد خوب  | رشد نسبتاً خوب  | رشد خوب   | رشد نسبتاً خوب  | رشد نسبتاً خوب  | رشد خوب  | رشد خوب   |
| ۴         | رشد بسیار خوب | رشد ضعیف  | رشد ضعیف  | رشد ضعیف | رشد نسبتاً ضعیف | رشد ضعیف  | رشد نسبتاً ضعیف | رشد نسبتاً ضعیف | رشد ضعیف | رشد ضعیف  |
| ۵         | رشد بسیار خوب | رشد ضعیف  | رشد ضعیف  | رشد ضعیف | رشد نسبتاً ضعیف | رشد ضعیف  | رشد نسبتاً ضعیف | رشد نسبتاً ضعیف | رشد ضعیف | رشد ضعیف  |
| ۶         | عالم رشد      | عالم رشد  | عالم رشد  | عالم رشد | عالم رشد        | عالم رشد  | عالم رشد        | عالم رشد        | عالم رشد | عالم رشد  |

\* ردیف ۱: رشد سویه ها در محیط کشت MSM که در آن گلوکز کربن مورد نیاز را تامین می کند ولی هیچ فسفری در محیط وجود نداشت. ردیف ۲: رشد سویه ها در محیط کشت MSM که در آن گلوکز کربن مورد نیاز و کلروپیریفوز فسفر مورد نیاز برای رشد را تامین می کرد. ردیف ۳: رشد سویه ها در محیط کشت MSM که در آن گلوکز کربن مورد نیاز و دیازینون فسفر مورد نیاز برای رشد را تامین می کرد. ردیف ۴: رشد سویه ها در محیط کشت MSM که در آن کلروپیریفوز به عنوان تنها منبع کربن و فسفر بود. ردیف ۵: رشد سویه ها در محیط کشت MSM که در آن دیازینون به عنوان تنها منبع کربن و فسفر بود. ردیف ۶: رشد سویه ها در محیط کشت MSM که هیچ کربن و فسفری در آن وجود نداشت.

بوسیله کلر فرم استخراج شده و با استفاده از HPLC اندازه گیری شد.

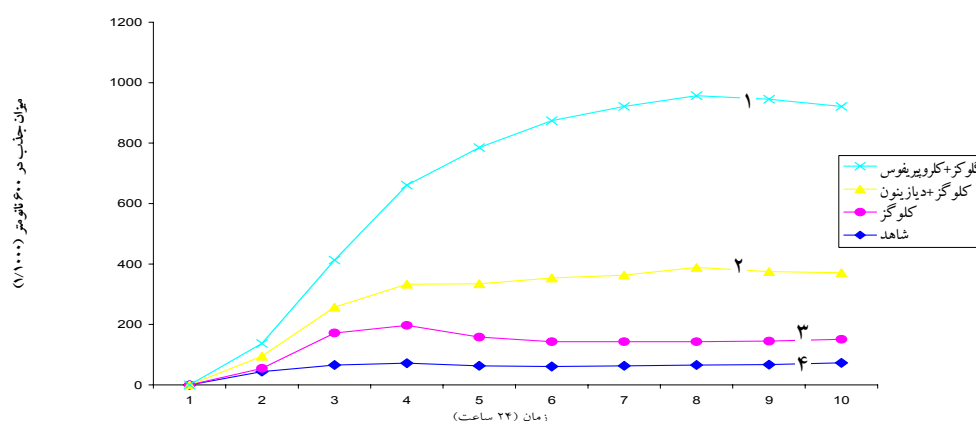
همانطوری که در نمودارهای شماره ۴ و ۵ مشخص شده است، میزان کلروپیریفوز و دیازینون در محیط کشتی که در آن باکتری رشد کرده است، نسبت به محیط کشت شاهد که هیچگونه باکتری در این مدت به آن اضافه نشده بود کاهش قابل توجهی دارد.

همزمان با کاهش میزان کلروپیریفوز در طول این ۱۵ روز در محیطهای کشت فوق میزان متابولیت TCP حاصل از تجزیه کلروپیریفوز نیز افزایش می یابد (نمودار شماره ۶).

سپس رشد این سویه در محیط کشت MSM که در آن کلروپیریفوز و دیازینون به عنوان تنها منبع کربن و فسفر بود به صورت جداگانه مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که باکتری در محیط کشت حاوی کلروپیریفوز و دیازینون می تواند رشد کند ولی در محیط فاقد این ترکیبات بعد از مدت خیلی کمی رشد متوقف می شود (نمودار ۳ و ۲).

بررسی میزان مصرف و کاهش کلروپیریفوز و دیازینون توسط سویه  $IHU_4$

میزان کلروپیریفوز و دیازینون باقی مانده در محیط کشتی که سویه به مدت ۱۵ روز در آن رشد کرده بود



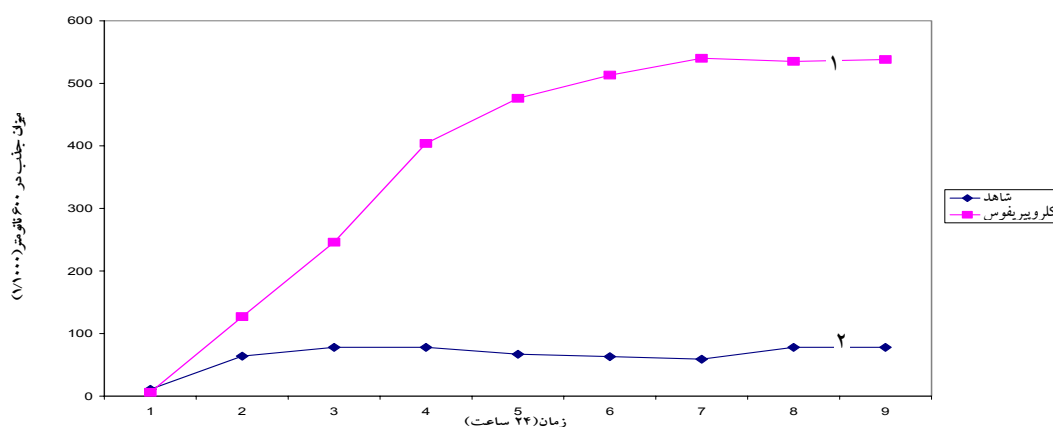
**نمودار شماره ۱:** رشد باکتری  $IHU_4$  در محیط MSM که در آن دیازینون یا کلروپیریفوز به عنوان تنها منبع فسفر بود.

منحنی شماره ۱: رشد سویه  $IHU_4$  در محیط کشت MSM که در آن گلوکز کربن مورد نیاز و کلروپیریفوز فسفر مورد نیاز برای رشد را تامین می کرد.

منحنی شماره ۲: رشد سویه  $IHU_4$  در محیط کشت MSM که در آن گلوکز کربن مورد نیاز و دیازینون فسفر مورد نیاز برای رشد را تامین می کرد.

منحنی شماره ۳: رشد سویه  $IHU_4$  در محیط کشت MSM که در آن گلوکز کربن مورد نیاز را تامین می کند ولی در محیط هیچ فسفری وجود نداشت.

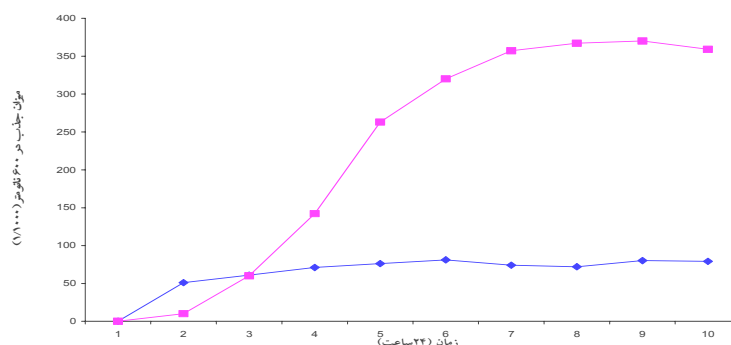
منحنی شماره ۴: رشد سویه  $IHU_4$  در محیط کشت MSM که در آن هیچ کربن و فسفری وجود نداشت.



**نمودار شماره ۲:** رشد باکتری  $IHU_4$  در محیط MSM که در آن کلروپیریفوز به عنوان تنها منبع کربن و فسفر بود.

منحنی شماره ۱: رشد سویه  $IHU_4$  در محیط کشت MSM که در آن کلروپیریفوز به عنوان تنها منبع کربن و فسفر بود.

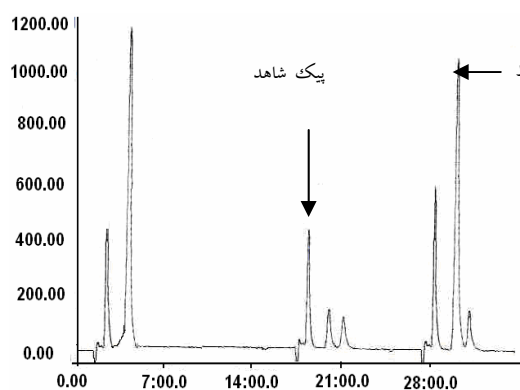
منحنی شماره ۲: رشد سویه  $IHU_4$  در محیط کشت MSM که در آن هیچ کربن و فسفری وجود نداشت.



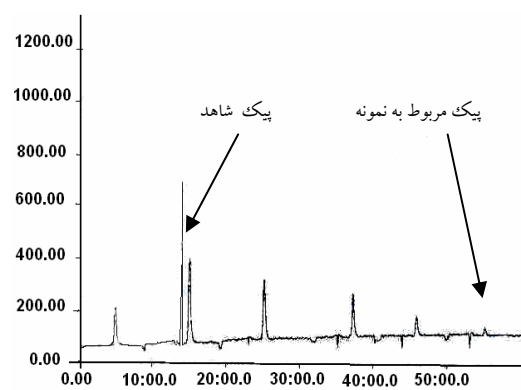
**نمودار شماره ۳:** رشد باکتری IHU4 در محیط MSM که در آن دیازینون به عنوان تنها منبع کربن و فسفر بود.

منحنی شماره ۱: رشد سویه IHU4 در محیط کشت MSM در که در آن دیازینون به عنوان تنها منبع کربن و فسفر بود.

منحنی شماره ۲: رشد سویه IHU4 در محیط کشت MSM که در آن هیچ کربن و فسفری وجود نداشت.



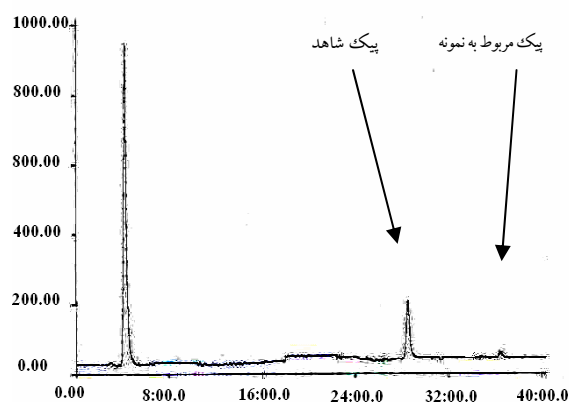
**نمودار شماره ۶:** میزان افزایش TCP در محیط کشت MSM حاوی کلروپیریفوز



**نمودار شماره ۴:** اندازه گیری میزان کلروپیریفوز باقی مانده در محیط های کشت MSM که به ترتیب ۲، ۵، ۱۰ و ۱۵ روز در آن رشد کرده بود.

## بحث

مطالعه سینتیک رشد باکتری خود شاهدهی توانایی باکتری در رفع آلودگی است. این مطالعات توسط سایرین محققین که موفق به جداسازی میکروارگانیسم های دیگر شده اند، به انجام رسیده است (۱۵، ۱۳، ۸). بنابراین جهت مطالعه رشد باکتری در محیط دارای ترکیب ارگانوفسفوره و مصرف دیازینون و کلروپیریفوز به عنوان منبع کربن یا فسفر و یا هر دو، نمودار رشد باکتری در هریک از محیط های طراحی شده قبلی، تهیه شد. از آنجایی که باکتری در صورتی می تواند دیازینون و یا کلروپیریفوز را به عنوان منبع فسفر استفاده کند که



**نمودار شماره ۵:** اندازه گیری میزان دیازینون باقی مانده در محیط کشت MSM که سویه IHU4 به مدت ۱۵ روز در آن رشد کرده بود.

کلروپیریفوس را هم به عنوان منبع کربن و هم به عنوان منبع فسفر استفاده کند. در ایران نیز تا کنون در خصوص سویه‌ای که بتواند آفت کش را هم به عنوان منبع کربن و هم منبع فسفر تواما و یا مجزا استفاده کند، گزارشی منتشر نشده است. پseudomonas ها گروه وسیع و هتروژنی از باکتری‌ها می‌باشند که تعدادی از آنها در خاک زندگی می‌کنند. این جنس از باکتری‌ها دارای مسیرهای کاتابولیتی فوق‌العاده گسترده هستند؛ مثلاً سویه‌ای از این جنس نام *P. cepacia* توانایی مصرف بیش از ۱۰۰ سوسترای مختلف را به عنوان منبع کربن، نیتروژن یا گوگرد دارد (۱۶،۱۵،۱۰). سویه برتر جداسازی شده در این تحقیق نیز از جنس پseudomonas ها می‌باشد.

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که باکتری مورد نظر دارای آنزیم ارگانوفسفوروس اسید انهیدراز است که آن را قادر می‌سازد تا با شکست ترکیبات خطرناکی چون ارگانوفسفورها (نظیر دیازینون و کلروپیریفوس) از آنها به عنوان منابع کربن و فسفر استفاده نماید. پس از این سویه می‌توان برای رفع آلودگی ناشی از سموم ارگانوفسفورها در محیط استفاده نمود.

دارای آنزیم ارگانوفسفوروس اسید انهیدراز باشد تا بتواند پیوند P-O را شکسته و فسفر را آزاد کند و از آن به عنوان منبع انرژی، جهت تکثیر و ادامه فعالیت‌های فیزیولوژیک و کاربردهای دیگر استفاده کند، پس سویه‌های جداسازی شده دارای آنزیم ارگانوفسفوروس اسید انهیدراز بودند (۱۶،۱۳،۱۱،۵).

بر اثر شکست پیوند P-O در کلروپیریفوس ماده‌ای تولید می‌شود که به جز دو تا سه سویه باکتریایی بقیه توانایی مصرف آن را ندارند. این ماده ۳ و ۵ و ۶-تری کلرو ۲-پیریدینول (TCP) نام دارد که خاصیت سمی برای انسان ندارد. بنابراین میزان افزایش و تولید این متابولیت و همچنین کاهش میزان دیازینون و کلروپیریفوس توسط سویه جداسازی شده نشان دهنده وجود آنزیم ارگانوفسفوروس اسید انهیدراز می‌باشد، که سنجش از طریق HPLC این مسئله را ثابت می‌کند (۱۵،۱۴،۸،۶).

گزارشات اندکی مبنی بر استفاده قوام باکتری از ترکیبات ارگانوفسفره هم به عنوان منبع کربن و هم به عنوان منبع فسفر منتشر شده است. ولی سویه جداسازی شده در این تحقیق می‌توانست دیازینون و یا

## References

1. John E, Casida and Gary B, Organophosphate Toxicology: Safety Aspects of Nonacetylcholinesterase Secondary Targets Chem. Res Toxicol 2004; 17: 983-992.
2. Bhadhade B.J, Sarnaik S.S, and Kanekar P.P, Bioremediation of an industrial effluent containing monocrotophos. Curr Microbiol 2002; 45: 346-349.
3. El-Deeb B.A, Soltan S.M, Ali A.M, Ali K.A. Detoxication of herbicide diuron by Pseudomonas sp. Folia Microbiol (Praha) 2000; 45: 211-216.
4. Donarski WJ, Dumas DP, Heitmeyer DP, Lewis VE, Raushe FM. Structure-activity relationships in the hydrolysis of substrates by the phosphotriesterase from Pseudomonas diminuta. Biochemistry 1986; 28:4650-4655.
5. Maria K, Graciela C, Zauscher F. Biodegradation of two commercial herbicides (Gramoxone and Matancha) by the bacteri Pseudomonas putida. J Env Biotech 2002; 5: 0717-3458.
6. Cheng T.C, DeFrank J.J. Enzymatic Detoxification of Organophosphorus Compounds. U.S. Patent 2000; 6: 080-566.
7. Chiang T, Dean MC, McDaniel CS. A fruit fly bioassay with phosphotriesterase for detection of certain organophosphorus insecticide

- residues. *Bull Environ Contam Toxicol* 1985; 34: 809-814.
8. Brajesh K, Singh Allan, Walker J, Alun W, Morgan, Denis J, Biodegradation of Chlorpyrifos by Enterobacter Strain B-14 and Its Use in Bioremediation of Contaminated Soils. *APPLIED AND Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 4855-4863.
9. Raveh L, Segall Y, Leader H, Rothschild N, Levanon D, Henis Y, Ashani Y. Protection against tabun toxicity in mice by prophylaxis with an enzyme hydrolyzing organophosphate esters. *Biochem Pharm* 1992; 44: 397-400.
10. Dagley S. Biochemistry of aromatic hydrocarbons degradation in Pseudomonads. *Bacteria* 1986; 10: 527-534.
11. Lee S.G, Yoon B.D, Park Y.H, Oh H.M, Isolation of a novel pentachlorophenol-degrading bacterium, *Pseudomonas* sp. Bu 34. *Applied Microbiol* 1998; 85: 1-8.
12. Singh B.K, Walker A, Morgan J.A.W, Wright D.J. Effects of soil pH on the biodegradation of chlorpyrifos and isolation of a chlorpyrifos-degrading bacterium. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69: 5198-5206.
13. Karpouzas D.G, Morgan J.A, Walker A. Isolation and characterization of 23 carbofuran-degrading bacteria from soils from distant geographical areas. *Lett Appl Microbiol* 2000; 31: 353-358.
14. Douglas M. Munnecke, Enzymatic Hydrolysis of Organophosphate Insecticides, a Possible Pesticide Disposal Method. *App Environ Microbiol* 1976; 32: 7-13.
15. Liu B, McConnell LL, Torrents A. Hydrolysis of chlorpyrifos in natural waters of the Chesapeake Bay. *Chemosphere* 2001; 44: 1315-1323.
16. Smith-Greeier L.L, Adkins A, Isolation and Characterization of soil microorganisms capable of utilizing the herbicide dichloro-p-methyl as a sole source of carbon and energy. *Can J Microbiol* 1996; 42: 221-226.