

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

رحیم سروری زنجانی^۱ سید محسن میر اسماعیلی^۲ علی محمد لطیفی^۳ ابراهیم ولی پور^۴

چکیده

سابقه و هدف: در ایران آفت کش‌هایی از نوع ارگانوفسفوروس 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 ارگانوفسفوروس 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 نمونه برداری شد و نمونه‌ها به وسیله محیط کشت نمکی معدنی غنی شده با کلروپیریفوز و دیازینون، چندین سویه باکتریایی جداسازی شدند. این سویه‌ها دارای آنزیم ارگانوفسفوروس 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 پسودوموناس‌ها معرفی شد.

استنتاج: با توجه به این یافته‌ها سویه باکتریایی جداسازی شده آفت کش‌های ارگانوفسفوروس 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 ارگانوفسفوروس مورد استفاده قرار بگیرد.

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

مقدمه

ترکیبات ارگانوفسفوروس 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 زنجانی - 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 می‌کنند. ترکیبات ارگانوفسفوره (Organophosphorous Pesticides) برای انسان هم‌سمی بوده و موجب ایجاد مسمومیت‌های عصبی و فلج شدن و یا حتی سبب مرگ می‌شود (۱).

این نوع ترکیبات به‌ویژه کلروپیریفوز و دیازینون در ایران بخصوص در استان‌های شمالی و شمال غرب کشور نیز مانند سایر کشورهای آسیایی به عنوان آفت‌کش کاربرد وسیعی دارد. بیشتر ابزارهای شیمیایی و فیزیکی از قبیل حرارت، سوپراکسیداز، دی‌اکسیدکربن و غیره که برای رفع آلودگی ناشی از ترکیبات ارگانوفسفوره به کار می‌روند، نقایص و مشکلات زیادی دارند، زیرا این روش‌ها اغلب سمی، حساسیت‌زا، خورنده و غیراختصاصی بوده و به محیط اطراف آسیب می‌رساند. بنابراین برای هیدرولیز و شکستن این ترکیبات سمی به یک تکنولوژی سالم و بی‌خطر نیاز است. یکی از تکنولوژی‌های مفید و بی‌خطر استفاده از روش‌های بیولوژیکی و آنزیم، جهت رفع آلودگی است. آنزیم ارگانوفسفوره انهدراز (OPAA)^۱ موجود در باکتری *پسودوموناس دیمینوتا* یا فلاوباکتریوم یکی از مهمترین آنزیم‌هایی است که جهت مطالعه فعالیت آنها علیه عوامل عصبی و آفت‌کش‌ها مورد توجه محققین قرار گرفته است (۲ تا ۶). آنزیم OPAA قابلیت تحمل PH بالا را دارد و نیز توانایی تجزیه طیف وسیعی از آفت‌کش‌های ارگانوفسفوری را دارد. بر اساس مطالعات تحقیقاتی مختلف، تجزیه و خنثی کردن آلودگی‌های مربوط به ترکیبات ارگانوفسفوره توسط باکتری‌ها بسیار مطلوب است (۵، ۷). پس از شکست کلروپیریفوز و دیازینون، این ترکیبات به دو جزء تبدیل می‌شود که یکی از اجزاء آن بنام ۳ و ۵ و ۶- تری کلروپیریدینول (TCP)، به عنوان بیومارکر استفاده می‌شود زیرا فقط چند مورد از میکروارگانیسم‌های مصرف‌کننده این ترکیبات گزارش شده است (۸).

علاوه بر پتانسیل بسیار موثر این آنزیم‌ها در رفع آلودگی عوامل عصبی و آفت‌کش‌ها در سطوح خارجی یا مسیرهای آبی، کاربرد این آنزیم‌ها 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 دی‌ایزوپروپیل 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 نمونه‌برداری از مناطق مختلف کشور که به این نوع ترکیبات از جمله کلروپیریفوز و دیازینون آلوده بودند، چند سویه از باکتری‌های 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 ارگانوفسفوره‌س اسید انهدراز جهت حذف بیولوژیکی^۲ ارگانوفسفورات است. به عبارت دیگر این تحقیق در پی یافتن آنزیمی است که بتواند ساختار فعال عوامل ارگانوفسفورات 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 می‌تواند بسیار وسیع باشد؛ مثلاً در زدودن آلاینش ناشی از حشره‌کش‌ها، آفت‌کش‌ها، بقایای عوامل شیمیایی بجا مانده از حمله دشمن و مصارف دیگر. امروزه با استفاده از روش‌های پیشرفته بیوتکنولوژی، نانو بیو و مهندسی آنزیم گام‌هایی در راستای تولید واکسن و آنتی‌سرم‌های اختصاصی علیه این عوامل بسیار خطرناک برداشته شده است. تحقیق حاضر می‌تواند به عنوان یک اقدام پایه‌ای در حصول نتایج مطلوب اشاره شده در کشورمان مفید باشد.

1. Organophosphorous acid anhydrase
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)^۱ 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^۲ 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 Cecil 1100)، 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 دکتور	۰/۰۵	۰/۰۲	۰/۰۲
حجم تزریق	۵μl	۵μl	۴μl
فاز متحرک	استونیتربیل (۸۰٪) و آب (۱۹/۵٪) و استیک اسید (۰/۵٪)	استونیتربیل (۸۰٪) و آب (۱۹/۵٪) و استیک اسید (۰/۵٪)	استونیتربیل (۸۰٪) و آب (۱۹/۵٪) و استیک اسید (۰/۵٪)

1. Mineral Salts Medium
2. Bergeys 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 IHU_4 ، $G_{19}C$ ، $G_{12}B$ ، G_6A ، $G_{13}C$ ، $G_{15}E$ ، $S_{11}C$ ، Y_7B ، 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 پسودوموناس 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 نوترنت 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_7B	$S_{11}C$
۱	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم 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	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم 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.

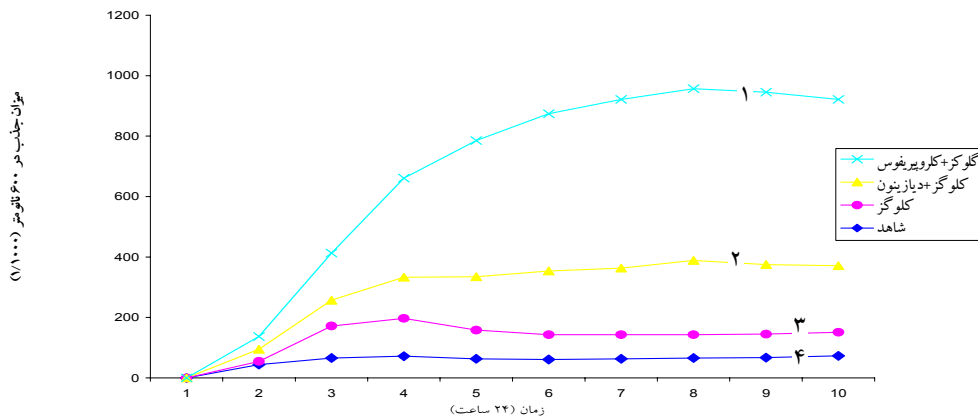
همانطوری که در نمودارهای شماره ۴ و ۵ مشخص شده است، میزان کلروپیریفوز و دیازینون در محیط کشتی که در آن باکتری رشد کرده است، نسبت به محیط کشت شاهد که هیچگونه باکتری در این مدت به آن اضافه نشده بود کاهش قابل توجهی دارد.

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



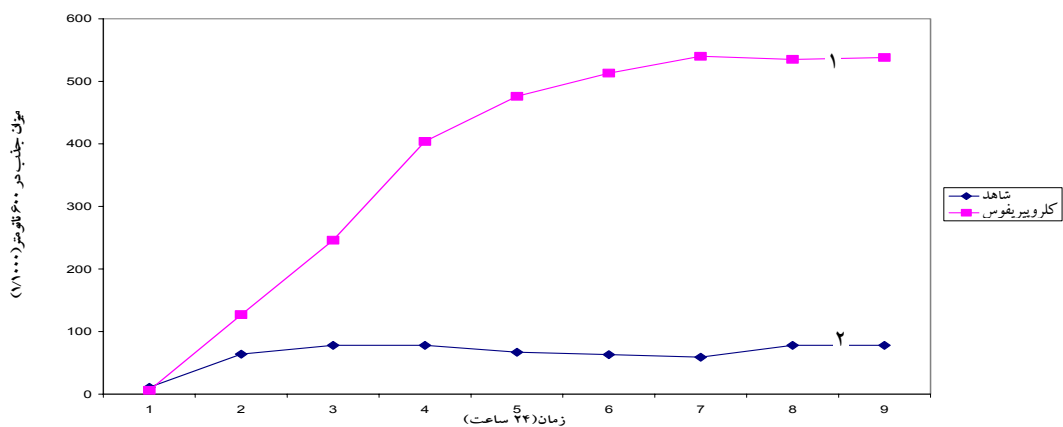
نمودار شماره ۱: رشد باکتری IHU_4 در محیط MSM که در آن دیازینون یا کلروپیریفوز به عنوان تنها منبع فسفر بود.

منحنی شماره ۱: رشد سویه IHU_4 در محیط کشت MSM که در آن گلوکز کربن مورد نیاز و کلروپیریفوز فسفر مورد نیاز 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 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.

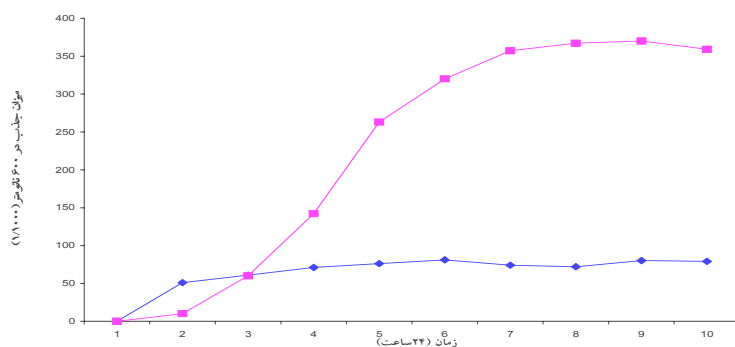
منحنی شماره ۴: رشد سویه IHU_4 در محیط کشت MSM که در آن هیچ کربن و فسفری وجود نداشت.



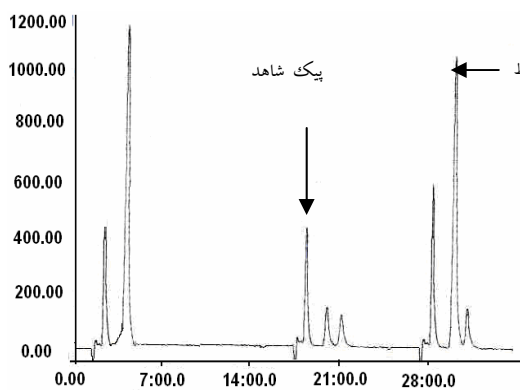
نمودار شماره ۲: رشد باکتری IHU_4 در محیط MSM که در آن کلروپیریفوز به عنوان تنها منبع کربن و فسفر بود.

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

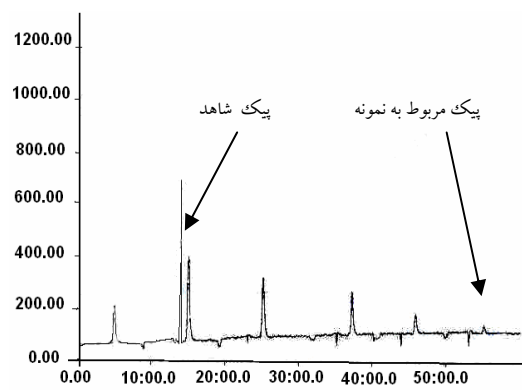
منحنی شماره ۲: رشد سویه IHU_4 در محیط کشت MSM که در آن هیچ کربن و فسفری وجود نداشت.



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.



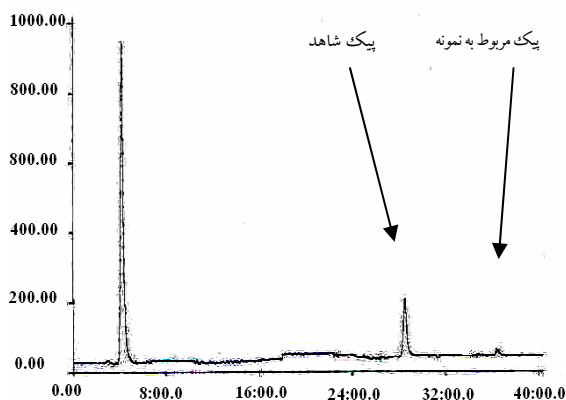
نمودار شماره ۶: میزان افزایش TCP در محیط کشت MSM حاوی کلروپیریفوز



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 میکروارگانوسم های دیگر شده اند، به انجام رسیده است (۱۵، ۱۳۸). 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 هر یک 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 تواماً و یا مجزاً 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 بنام P.cepacia توانایی مصرف بیش از ۱۰۰ سوبسترای مختلف را به عنوان منبع کربن، نیتروژن یا گوگرد دارد (۱۶،۱۵،۱۰). سویه برتر جداسازی شده در این تحقیق نیز از جنس pseudomonas ها می‌باشد.

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که باکتری مورد نظر دارای آنزیم ارگانوفسفوروس اسید انهدراز 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 انهدراز 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 انهدراز 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 انهدراز 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.