

بررسی عملکرد میکروارگانیزم خاکزی مولد آنزیم ارگانوفسفات هیدرولاز در سم زدایی ترکیبات ارگانوفسفره (دیازینون) و ارزیابی خواص کینتیکی آن

محمد حاجی ابوالحسنی^{۱*} و عباس صاحب‌قدم لطفی^۲



^۱ ایران، تهران، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، پژوهشکده فناوریهای شیمیایی

^۲ ایران، تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه بیوشیمی بالینی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۰۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۲/۲۴

چکیده

ترکیبات ارگانوفسفره نظیر دیازینون بدلیل ویژگیهای منحصر بفرد خود بطور وسیعی بعنوان آفت کش و حشره کش در کشاورزی مورد استفاده قرار می‌گیرند. آنزیم ارگانوفسفات هیدرولاز (OPH) بطور موثری طیف وسیعی از ترکیبات استری ارگانوفسفاتها را هیدرولیز می‌نماید. در این تحقیق با استفاده از دو تکنیک غنی سازی محیط کشت و حداکثر تکرار در وقت سازی، میکروارگانیزم تجزیه کننده دیازینون از نمونه های تیمار شده بادیاژینون (مزارع شالیکاری)، جداسازی و بانجام تستهای مورفولوژیکی و بیوشیمیایی شناسایی شد. سپس آنزیم از سویه باکتریایی استخراج و بترتیب با استفاده از سوب دهی با سولفات آمونیوم و کروماتوگرافی تعویض یونی تخلیص گردید. خلوص آنزیم با استفاده از الکتروفورز SDS-PAGE تایید و وزن مولکولی آن نیز توسط مارکر پروتئینی مشخص و خواص کینتیکی آن بررسی گردید. با استفاده از تکنیک غنی سازی محیط کشت و افزایش عامل تجزیه زیستی نمونه های تیمار شده بادیاژینون، زمان هیدرولیز آنزیمی با کاهش قابل توجهی به کمتر از ۱۰ ساعت تقلیل یافت. متابولیت اصلی حاصل از هیدرولیز آنزیمی دیازینون، ۲-ایزو پروپیل-۶-متیل-۴-هیدروکسی پیریمیدین (IMHP) با استفاده از دو تکنیک کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) و اسپکتروفتومتری شناسایی گردید. IMHP در مقایسه بادیاژینون سمیت کمتری دارد. آنزیم OPH به میزان ۵۷/۴۸ مرتبه، با فعالیت ویژه ۱۶/۴۴ واحد در میلیگرم پروتئین از محلول عصاره آنزیمی و بازده ۱۱/۴ درصد و وزن مولکولی تقریبی ۴۰KD خلص سازی شد. دما و pH بهینه برای ماکزیمم فعالیت آنزیم بترتیب برابر ۳۷°C و ۸/۵ بود. علاوه بر این غلظت سوبسترا تا ۰/۰۵M و یونهای فلزی Ca^{+2} ، Co^{+2} بترتیب ۱۱۹ و ۱۰۶ درصد تاثیر مثبت بر فعالیت آنزیم داشتند. پارامترهای ثابت میکائلیس (K_m) و حداکثر سرعت آنزیم (V_{max}) برای دیازینون بعنوان سوبسترای واکنش بترتیب برابر با $434/2 \mu M$ و $107/3 \mu M$ در دقیقه محاسبه گردید. نتیجه اینکه آنزیم OPH با فعالیت تدریجی و موثر خود علاوه بر سم زدایی، می‌تواند نقشی کلیدی در آزادسازی فسفات برای تولید کود زیستی ایفاء کند.

واژه های کلیدی: آنزیم ارگانوفسفات هیدرولاز، دیازینون، ۲-ایزو پروپیل-۶-متیل-۴-هیدروکسی پیریمیدین (IMHP)، هیدرولیز آنزیمی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۵۷۴۱۶۲۷۰-۰۲۱، پست الکترونیکی: abolhasani@irost.ir

مقدمه

بطور وسیعی در کشاورزی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۲۲، ۳، ۴۴)، اما اثرات ناشی از ماندگاری آنها در محصولات کشاورزی خطرات بزرگی برای سلامت انسان و سایر موجودات زنده و نیز تعادل اکوسیستم پدید می‌آورند که

ترکیبات ارگانوفسفره مثل پاراتیون، دیازینون، پاراکسان از جمله مواد شیمیایی شناخته شده ای هستند که بدلیل ویژگیهای منحصر بفرد خود (سمیت بالا برای آفات و عملکرد سیستماتیک آنها)، بعنوان آفت کش و حشره کش

X-ray حاکی از آن است که دارای موتیف $(\alpha\beta)$ -barrel بوده و جایگاه فعال آنزیم بوسیله یک دسته شش تایی اسید آمینه هیستیدین احاطه گردیده و یونهای دو ظرفیتی Zn موجود در آن، یک مرکز دو هسته‌ای فلزی را تشکیل می‌دهند که با یک پل هیدروکسیلی بیکدیگر مرتبط می‌باشند (۱۷،۲۷). سوبستراهای اختصاصی این آنزیم نسبتاً گسترده می‌باشد، بطوریکه اکسیژنهای فسفوریل آن می‌توانند با گوگرد و یا دو گروه اتوکسی آن با گروههای متیل، پروپیل یا فنیل جایگزین شوند. در این واکنش هیدرولازی، گروه ترک کننده می‌تواند شامل فنلها یا آلکیل‌های دارای تیول یا فلوراید باشد (۲۶،۳۱،۳۰،۲۰،۹).

از طرفی دیازینون (o,o-diethyl-o-[2-isopropyl-6-methyl-4-pyrimidinyl]phosphorothioate) پنجمین ترکیب از انواع آفت‌کشهای ارگانو فسفره بوده که در کشاورزی بطور وسیعی از آن استفاده می‌شود، لذا سم زدایی محیط زیست از این ترکیب بسیار مورد توجه قرار گرفته است (۱،۲۵). در این تحقیق ابتدا از نمونه های خاک مزارع برنجکاری در معرض ترکیبات فسفره آلی (دیازینون)، میکروارگانوسمهای محیطی مولد آنزیم ارگانوفسفات هیدرولاز (*Pseudomonas sp.*) جداسازی و شناسایی شد. سپس ۲-ایزوپروپیل-۶-متیل-۴-هیدروکسی پیریمیدین (IMHP) بعنوان متابولیت اصلی حاصل از هیدرولیز آنزیمی دیازینون (با سمیت کمتر از آن) با استفاده از دو روش کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) و اسپکتروفتومتری شناسایی و بررسی گردید. خلص سازی آنزیم نیز انجام و خواص کینتیکی مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روشها

نمونه های خاک در معرض دیازینون قرار گرفته از مزارع شالیکاری جمع آوری و در ظروف استریل قرار داده و تا زمان آزمایش در دمای 4°C نگهداری شدند. برای انجام آزمایشات ۱۰ گرم از هر نمونه به لوله های آزمایش منتقل و افزودن ۱۰ میلی لیتر آب، باور تکس آنها را کاملا مخلوط و

آسیبهای عصبی حاد و مزمن اینگونه ترکیبات از مدت‌ها پیش شناخته شده و به اثبات رسیده است (۲،۱۶،۲۴). اثرات جهش زاوی و سرطانی آنها نیز در جانوران مختلف، خصوصا انسان آشکار گردیده است (۸).

در واقع این ترکیبات سمیت خود را با جلوگیری از کار آنزیم حیاتی کولین استراز در سیستم عصبی اعمال می‌کنند. غالباً اتصال ترکیبات ارگانو فسفره (بعنوان مهارکننده) به آنزیم استیل کولین استراز از نوع پیوند کووالان و برگشت‌ناپذیر است که منجر به تجمع استیل کولین در محل سیناپسهای عصبی، انقباض شدید ماهیچه ها و با توقف حرکات تنفسی باعث مرگ مسموم می شوند (۴۳،۴). تقریباً ساختار کلی ترکیبات ارگانوفسفاتها شبیه هم بوده و دارای سه پیوند فسفواستر می باشند که هیدرولیز یکی از این پیوندها منجر به کاهش سمیت آنها و حذف عملکرد غیرفعال سازی استیل کولین استراز می گردند (۱۸،۱۴). از روشهای مختلف فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیک برای تجزیه و تخریب ترکیبات ارگانو فسفره بمنظور سالم سازی آلودگیهای زیست محیطی استفاده می شود، که روش بیولوژیکی از مهمترین و کارآمدترین آنها می باشد. در این روش میکروارگانوسمهای محیطی موجود در خاک/ آب مثل *Pseudomonas sp.* و *Flavobacterium sp.* با استفاده از آنزیم ارگانوفسفات هیدرولاز (OPH)، با هیدرولیز طیف وسیعی از ترکیبات ارگانو فسفره هم منجر به حذف یا کاهش سمیت آنها گردیده و هم از آنها بعنوان منابع کربن، نیتروژن، فسفر، گوگرد برای تغذیه و یا انرژی جهت تامین فعالیتهای حیاتی مورد نیاز خود بهره برداری می نمایند (۷، ۱۳، ۲۱، ۳۹). نتیجه این هیدرولیز، شکست در پیوندهای P-F, P-S, P-O, P-CN و ایجاد الکل است که در اغلب اوقات بصورت ترکیبات کروموفور هستند.

آنزیم ارگانوفسفات هیدرولاز (OPH) بعنوان بهترین آنزیم تجزیه کننده ترکیبات ارگانوفسفره، یک متالوآنزیم همودایمر می باشد که تعیین ساختار سه بعدی آن توسط

و با همان شرایط آزمایش قبلی (از نظر دما و زمان انکوباسیون) انکوبه و در طی مدت 10 روز انکوباسیون، این عمل 5 بار تکرار گردید (۳۶،۳۵). میزان هیدرولیز دیازینون با استفاده از اسپکتروفتومتر و خواندن O.D. نمونه‌ها در طول موج 230nm کنترل شده است.

۲- حداکثر تکرار در رقت سازی جهت تهیه بهترین رقت تجزیه کننده دیازینون: با استفاده از این تکنیک، از محیط کشت غنی شده فوق، رقت‌های سریالی از 10^{-1} تا 10^{-12} بدین طریق تهیه شد. ابتدا 1mL از محیط کشت غنی شده در آزمایش قبلی به لوله آزمایش اول استریل شده منتقل و سپس با افزودن 9mL از محلول مایه حاوی دیازینون به آن، تیمار گردید تا بدین ترتیب نمونه با رقت 10^{-1} تهیه شود. برای تهیه رقت 10^{-2} ، 1mL از لوله آزمایش اول برداشته به لوله آزمایش دوم استریل شده منتقل و مجدداً با افزودن 9mL از محلول مایه حاوی دیازینون به آن، تیمار گردید (۳۷). تیمار نمونه‌ها در این آزمایش نیز با همان شرایط آزمایش قبلی (از نظر دما و زمان انکوباسیون) انجام شد. میزان هیدرولیز دیازینون با استفاده از اسپکتروفتومتر و خواندن O.D. نمونه‌ها در طول موج 230nm کنترل شده است.

استخراج دیازینون و متابولیت‌های ناشی از هیدرولیز آنزیمی آن: در طی مدت انکوباسیون و بطور همزمان نمونه‌ها، ابتدا با ۶۰mL و سپس ۴۰mL مخلوط هگزان - استون به نسبت 1 : 1 برای ۲۰ دقیقه در یک فلاسک با حجم ۲۰۰mL همزده شد. سپس بمدت ۱۰ دقیقه با دور \times ۱۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. مایع رویی به یک دکانتور منتقل، فاز استون آن با اضافه کردن آب، از فاز هگزان جدا گردید و فراکشن هگزان نگهداری شد... در این مرحله نیز ابتدا ۶۰mL و سپس ۴۰mL مخلوط کلروفرم - دی اتیل اتر به نسبت 1 : 1 به فاز آبی (جدا شده از مرحله قبل) افزوده، برای مدت ۱۰ دقیقه همزده و ۳۰ دقیقه اجازه داده شد تا مخلوط ساکن شود. در اینجا نیز فاز آبی از فاز آبی جدا گردید. هر

مدتی بحال خود گذاشته شد، تا ته نشین گردد. سپس از مایع رویی بمیزان ۱۰٪ حجمی به محیط کشت نمکی استریل محتوی ترکیبات ذیل و حاوی دیازینون ۳/۰٪ استریل شده با فیلترهای میلی پور 0.45μ ، تلقیح و در انکوباتور با دمای $28 \pm 2^\circ\text{C}$ قرار داده شد.

$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4, 0.5\text{g}; \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}, 0.2\text{g}; \text{K}_2\text{HPO}_4, 0.1\text{g}; \text{Ca}(\text{NO}_3)_2, 0.01\text{g}; \text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}, 0.2\text{g}; \text{FeSO}_4, 0.01\text{g}; \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}, 0.015\text{g}; \text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}, 0.025\text{g}; \text{Yeast extract}, 0.5\text{g}; \text{Agar}, 15\text{g}; \text{D.W.}, 1000\text{mL}$

میزان هیدرولیز دیازینون و تشکیل 2-ایزوپروپیل-6-متیل-4-هیدروکسی پیریمیدین (IMHP) بعنوان متابولیت اصلی حاصل از هیدرولیز آنزیمی دیازینون و ارتباط بین افزایش میزان IMHP در طول موج 210nm، همزمان با کاهش سطح دیازینون در طول موج 230nm ناشی از هیدرولیز آن با استفاده از اسپکتروفتومتری و خواندن O.D. آنها بررسی گردیده است (۱۵،۱۱).

جداسازی میکروارگانسیم تجزیه کننده دیازینون: با استفاده از تکنیک غنی سازی محیط کشت (Enrichment culture) و تکنیک حداکثر تکرار در رقت سازی (Maximum dilution frequency technique) میکروارگانسیم تجزیه کننده دیازینون از نمونه‌هایی که با دیازینون تیمار شده اند، جداسازی شد. از روش رنگ آمیزی گرم برای مشاهده باکتری در زیر میکروسکپ و از محیط های کشت افتراقی برای آزمایشات بیوشیمیایی استفاده شد (۱۰).

۱- غنی سازی محیط کشت جهت افزایش عامل هیدرولیز کننده دیازینون: با استفاده از این تکنیک، با برداشت یک لوپ از هر کدام از نمونه‌ها و تلقیح آن به محیط کشت مایع فوق الذکر، اجازه داده شد تا میکروارگانسیم رشد نماید. در ابتدا محلول مایه دیازینون به نسبت 1 : 1 با سوسپانسیون نمونه انکوبه گردید. وقتیکه دیازینون از این مخلوط ناپدید شد (باشفاف شدن محیط)، 5mL از آن مجدداً با 5mL محلول دیازینون مخلوط

سلولی بود، لذا طی مراحل چهارگانه ذیل اقدام به جداسازی عصاره آنزیمی از توده سلولی و تخلیص آن گردید. همزمان فعالیت آنزیمی در هر یک از مراحل فوق با استفاده از اسپکتروفتومتر و خواندن O.D. آنها، کنترل شده است. سپس با استفاده از الکتروفورز SDS-PAGE در ژل پلی آکریل آمید و سوبسترای اختصاصی، وزن مولکولی باند آنزیمی با استفاده از مارکر پروتئینی شناسایی و فعالیت ویژه آنزیم نیز برای دیازینون بعنوان سوبسترای واکنش مشخص گردید.

مرحله اول- از بین بردن دیواره سلولی باکتری: عمل سونیکیت کردن باکتری روی یخ در دمای 4°C با زمان سونیکیت ۶۰ ثانیه با فاصله ۱۵ ثانیه و به تعداد ۱۰ بار صورت گرفت. سپس محلول حاصل از سونیکیت بلافاصله با دور $17500 \times \text{g}$ و دمای 4°C بمدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. محلول رویی را دور ریخته تا رسوب بدست آمده در مرحله بعد مورد استفاده قرار گیرد.

مرحله دوم- استفاده از تریتون X-100 برای افزایش حلالیت غشای سلول باکتری: رسوب حاصل از مرحله قبل که حاوی آنزیم بود بلافاصله به بافر سدیم فسفات 50 mM با $\text{pH}=8/5$ حاوی $2/5$ درصد تریتون X-100 انتقال داده شد. محلول حاصل بمدت ۲۴ ساعت در دمای 4°C نگهداری و سپس با دور $20000 \times \text{g}$ و دمای 4°C بمدت ۲ ساعت سانتریفیوژ گردید. نتایج حاصل از انجام سنجش فعالیت آنزیمی در این مرحله نشان داد که تنها محلول رویی فعالیت آنزیمی داشته و لذا جمع آوری و بعنوان محلول آنزیمی نگهداری شد تا در مراحل بعدی تخلیص از آن استفاده شود.

مرحله سوم- رسوب دهی با سولفات آمونیوم: ابتدا عصاره آنزیمی در بافر سدیم فسفات 50 mM با $\text{pH}=8/5$ حل و بترتیب محلولهای سولفات آمونیوم با درصدهای مختلف (۲۰٪، ۴۰٪، ۶۰٪ و ۸۰٪) در یک حمام یخ به محلول آنزیمی اضافه و با آرامی بمدت یک ساعت استیرر گردید. سپس با دور $20000 \times \text{g}$ و دمای 4°C بمدت ۱۵ دقیقه

دو فراکشن هگزان و کلروفرم - دی اتیل اتر در دمای محیط (حدود $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$) تبخیر و خشک شدند. سپس در ۲ ml متانول حل و به ویالهای شیشه ای منتقل، تبخیر و خشک گردید. مجدداً نمونه ها در ۱ ml متانول حل شده و برای آنالیز با کروماتوگرافی لایه نازک مورد استفاده قرار گرفت (۳۴).

کروماتوگرافی لایه نازک: نمونه ها که محتوی دیازینون و یامحصول هیدرولیز دیازینون؛ ۲-ایزوپروپیل-۶-متیل-۴-هیدروکسی پیریمیدین (IMHP) است، بر روی صفحات TLC لکه گذاری و با قراردادن در حلال فاز متحرک تشکیل شده از مخلوط حلالهای بنزن - کلروفرم - اتیل استات با نسبتهای ۲ : ۱ : ۱، بررسی و شناسایی گردید. صفحات پس از خشک شدن، ابتدا با رودامین B ۱٪ در اتیل الکل ۹۵٪ و سپس با محلول پالادیم کلراید ۰/۵٪ در هیدروکسید سدیم 5 N اسپری و در معرض نور UV قرار گرفت (۲۶، ۳۴).

تکثیر میکروارگانیسمهای هیدرولیزکننده سموم فسفره: استوک باکتریایی بعد از کشت در محیط کشت LB، در شیکرانکوباتور با چرخش 200 rpm و دمای 28°C انکوبه شد. بعد از بالا آمدن کامل باکتری در محیط کشت (OD_{600})، با دور $10000 \times \text{g}$ و دمای 4°C بمدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. بمنظور القاء باکتری به افزایش تولید آنزیم OPH برای هیدرولیز دیازینون، رسوب حاصله به محیط کشت نمکی مایع حاوی دیازینون انتقال یافته و مجدداً در شیکر انکوباتور با چرخش 200 rpm و دمای 28°C بمدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. در مرحله بعدی جهت جداسازی باکتریها از محیط کشت نمکی مایع محتوی دیازینون، با دور $10000 \times \text{g}$ و دمای 4°C بمدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. به رسوب باکتریایی، ۵ ml بافر سدیم فسفات 50 mM با $\text{pH}=8/5$ حاوی 5 mM PMSF به عنوان آنتی پروتئاز اضافه کرده و بمدت ۲۰ دقیقه استیرر شد.

تهیه عصاره آنزیمی عاری از سلول (مراحل تخلیص آن): از آنجایی که آنزیم استخراج شده از نوع آنزیمهای درون

بعلت تشکیل اسید در خلال هیدرولیز دیازینون و لزوم ثابت نگهداشتن pH محیط واکنش در $\text{pH}=8/5$ نیاز به افزودن مداوم بافر سدیم کربنات/ بی کربنات می باشد که میزان بافر مصرف شده بستگی به مقدار اولیه دیازینون دارد (۵).

خواص کینتیکی آنزیم OPH: اثر pH: pH ایتیم (بهینه) برای ماکزیمم فعالیت آنزیم با استفاده از بافرهای ذیل با غلظت 50mM و pH های ۶ تا ۱۲ تعیین گردید: سدیم استات برای pH برابر با ۲، ۳، ۴ و ۵، سدیم سوکسینات برای pH برابر با ۵، ۶/۶ و ۷، سدیم فسفات برای pH برابر با ۸/۵، ۷ و ۸/۵، سدیم بورات برای pH برابر با ۹/۹ و ۱۰، گلیسین سدیم هیدروکسید برای pH برابر با ۱۱، ۱۰ و ۱۲ (۱۷).

اثر دما: سنجش فعالیت آنزیم در دماهای $20-70^\circ\text{C}$ بمنظور تعیین دمای ایتیم (بهینه) برای ماکزیمم فعالیت آنزیم انجام شد (۱۷).

اثر غلظت سوبسترا: اثر غلظتهای متفاوت دیازینون ($0/01-0/05\text{M}$) بعنوان سوبسترا بر روی فعالیت آنزیم بمنظور تعیین ماکزیمم فعالیت آنزیم بررسی گردید (۱۷).

تعیین پارامترهای کینتیکی آنزیم: مطالعات کینتیکی جهت محاسبه پارامترهای ثابت میکائلیس- منتن (K_m) و سرعت ماکزیمم (V_{max}) انجام و از معادله لینویور-برگ (Lineweaver-Burk plot) برای تعیین این پارامترهای کینتیکی استفاده گردید. فعالیت آنزیم در بافر سدیم فسفات 50mM با $\text{pH}=8$ حاوی غلظتهای $20-100$ میکرومولار دیازینون بعنوان سوبسترا در دمای 30°C به مدت ۱۲۰ دقیقه مورد سنجش قرار گرفت. برای رسم نمودار معکوس دو طرفه لینویور- برک از منحنی معکوس تغییرات غلظت سوبسترا در برابر معکوس سرعت فعالیت آنزیمی استفاده شده است (۱۷).

سانتریفیوژ و لایه بالایی آن دور ریخته شد. آزمایش سنجش فعالیت آنزیمی با استفاده از روش اسپکتروفتومتری و خواندن O.D. بررسی و بر این اساس رسوب 60% بعنوان بهترین درصد از لحاظ میزان فعالیت بر مقدار پروتئین انتخاب گردید. نهایتاً از کیسه دیالیز برای جدا کردن نمکهای سولفات آمونیوم از پروتئین استفاده شد.

مرحله چهارم- استفاده از کروماتوگرافی: تخلیص نهایی عصاره آنزیمی با استفاده از ستون کروماتوگرافی تعویض یونی دی اتیل آمینواتیل- سفاروز (-DEAE Sepharose) $(300 \times 15\text{mm})$ انجام شد. ستون با مقدار اضافی بافر سدیم فسفات 50mM با $\text{pH}=8/5$ با شدت جریان $1\text{mL}/\text{min}$ شسته تا موادی که به ستون متصل نشده اند، برداشته شوند. برای جدا کردن پروتئینهای متصل شده، با شیب غلظتی از 50mM سدیم کلراید در بافر سدیم فسفات با $\text{pH}=8/5$ ، ستون شستشوداده و فراکشنها با حجم تقریبی 5mL جمع آوری شد. سنجش فعالیت آنزیمی فراکشنها نیز با استفاده از روش اسپکتروفتومتری و خواندن O.D. آنها کنترل گردید.

مرحله پنجم- الکتروفورز SDS-PAGE: با استفاده از الکتروفورز SDS-PAGE خلوص تک باند عصاره آنزیمی تایید و وزن مولکولی آن نیز با استفاده از مارکر پروتئینی مشخص گردید.

تعیین فعالیت آنزیم باروش اسپکتروفتومتری: ابتدا برای شروع واکنش، دیازینون به بافر سدیم کربنات/ بی کربنات 20mM ($\text{pH}=8/5$) افزوده و سپس عصاره آنزیمی به آن اضافه کرده و محلول دائماً با استیرر همزده شد. با هیدرولیز 1mol دیازینون، $2-1\text{mol}$ ایزو پروپیل-6- متیل-4- هیدروکسی پیریمیدین (IMPH) و دی اتیل تیوفسفریک اسید (DEP) تولید می گردد. غلظت IMPH همراه با تنظیم pH نمونه های مائی در $8/5$ ، با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد. این ترکیب در 210nm ماکزیمم جذب دارد که با اندازه گیری غلظت آن تعیین مقدار گردید. همچنین

هیدرولیز آنزیمی دیازینون بعد از یک روز تاخیر شروع می‌گردد. در ابتدای تلقیح محیط‌های کشت حاوی دیازینون کدورت سفید رنگی داشتند که بعد از ۲۴ ساعت، بتدریج در اطراف محل تشکیل کلنی‌ها شفاف گردید (شکل ۱-۱) که نشان‌دهنده فعالیت آنزیمی میکروارگانیسم‌های هیدرولیز کننده دیازینون می‌باشد. البته این شفافیت بمرور زمان وسیع‌تر نیز می‌گردد.

اثر EDTA و یونهای فلزی: اثر EDTA²⁻ و یونهای Zn²⁺، Co²⁺، Mg²⁺، Ca²⁺، Fe³⁺ با غلظت ۲mM بر روی فعالیت آنزیم ارزیابی گردید (۱۹،۳۱).

نتایج

نتایج بدست آمده نشان داد که دیازینون در طی مدت ۳-۵ روز انکوباسیون، بطور کامل از بین می‌رود. البته عمل



شکل ۱-۱- ایجاد شفافیت در اطراف کلنی‌ها

نتایج این هیدرولیز با استفاده از روش اسپکتروفتومتری و خواندن O.D. نمونه‌ها در طول موج 230nm در جدول (۱-۱) منعکس گردیده که کاهش متوالی میزان دیازینون باقیمانده در محیط را نشان داده است.

جدول ۱-۱- میزان O.D. ثبت شده از اسپکتروفتومتر در طول موج 230nm

ردیف	نوع نمونه	زمان تلقیح	روزاول	روزدوم	روزسوم	روزچهارم	روزپنجم
۱-	خاک شالیزاربرنج حسن سرا	0.56171	0.52238	0.39586	0.19575	0.12639	0.08681
۲-	خاک شالیزاربرنج هاشمی	0.56215	0.52253	0.39637	0.19617	0.12727	0.08769
۳-	خاک شالیزاربرنج طارم محلی	0.56263	0.52278	0.39702	0.19653	0.12815	0.08843
۴-	خاک شالیزاربرنج دیلمانی	0.56316	0.52314	0.39761	0.19689	0.12891	0.08912
۵-	خاک شالیزاربرنج فجر	0.56354	0.52339	0.39815	0.19732	0.12973	0.09035

نتایج حاصل از کاربرد تکنیک غنی‌سازی نشان داد که بعد از اولین انتقال، دیازینون در مخلوط انکوبه شده تا مدت ۱۲۰ ساعت بعد از انکوباسیون، هیدرولیز گردید. اما بعد از انتقال پنجم، هیدرولیز دیازینون به کمتر از ۱۰ ساعت کاهش یافت (جدول ۱-۲). بعبارت دیگر غنی‌سازی عامل هیدرولیز آنزیمی دیازینون در نمونه‌های تیمار شده با آن، باعث افزایش سرعت هیدرولیز در هر انتقال گردیده است.

نتایج حاصل از کاربرد تکنیک غنی‌سازی نشان داد که بعد از اولین انتقال، دیازینون در مخلوط انکوبه شده تا مدت ۱۲۰ ساعت بعد از انکوباسیون، هیدرولیز گردید. اما بعد از انتقال پنجم، هیدرولیز دیازینون به کمتر از ۱۰ ساعت کاهش یافت (جدول ۱-۲). بعبارت دیگر غنی‌سازی عامل هیدرولیز آنزیمی دیازینون در نمونه‌های تیمار شده با آن، باعث افزایش سرعت هیدرولیز در هر انتقال گردیده است.

جدول (۱-۲) میزان O.D. ثبت شده از اسپکتروفتومتر در طول موج 230nm

نتایج مربوط به انتقال اول (زمان انکوباسیون ۱۲۰ ساعت)	۲۴ ساعت اول	۲۴ ساعت دوم	۲۴ ساعت سوم	۲۴ ساعت چهارم	۲۴ ساعت پنجم
0.71285	0.38244	0.22447	0.15812	0.06706	-
نتایج مربوط به انتقال دوم (زمان انکوباسیون ۶۰ ساعت)	0.68346	0.34944	0.16834	0.06643	-
نتایج مربوط به انتقال سوم (زمان انکوباسیون ۳۰ ساعت)	0.64921	0.28039	0.06525	-	-
نتایج مربوط به انتقال چهارم (زمان انکوباسیون ۱۶ ساعت)	0.61802	0.06314	-	-	-
نتایج مربوط به انتقال پنجم (زمان انکوباسیون ۸ ساعت)	0.06232	-	-	-	-

نتایج مربوط به آزمایشات بیوشیمیایی انجام شده در جدول (۱-۳) نشان داد که سویه باکتریایی (*Pseudomonas sp.*) جدا شده از عصاره سلولی، از نوع هوازی اجباری است.

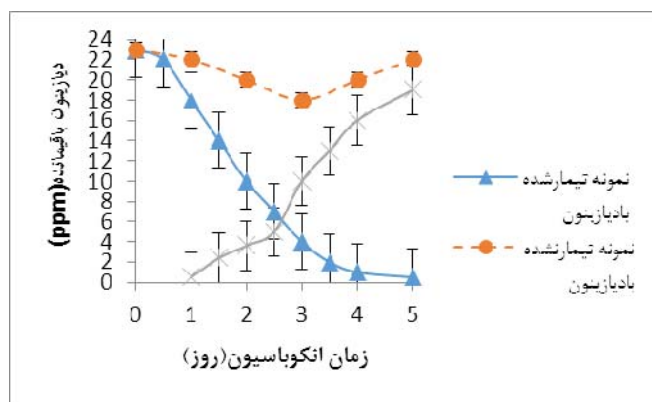
جدول ۱-۳- نتایج مربوط به آزمایشات تشخیص باکتری

Gram stain	negative
Oxidase	positive
Motility	positive
Starch hydrolysis	positive
Fluorescence	positive
Indole	negative
Catalase	positive
Gelatin liquefaction	negative
Simmons citrate	positive
Lactose fermentation	negative

هیدرولیز دیازینون و تشکیل IMHP بعنوان متابولیت اصلی حاصل از آن: نتایج نشان داد که نمونه های تیمار

شده با دیازینون توسط آنزیم هیدرولیز گردیده، بطوریکه در ۳ روز اول انکوباسیون، غلظت دیازینون به صورت تصاعدی کاهش یافته و تا روز پنجم به پایین ترین حد ممکن رسیده است. همزمان با آن (IMHP) بعنوان متابولیت اصلی محصول هیدرولیز، تشکیل و در طی این مدت غلظت آن افزایش پیدا می کند نمودار (۱-۱).

آنالیز باکروماتوگرافی لایه نازک نشان داد که در فراکشن هگزان، عمدتاً دیازینون با $R_f = 0.78$ و تیره رنگ (قبل از شروع هیدرولیز) و در فراکشن کلروفرم-دی اتیل اتر، محصول هیدرولیز دیازینون یعنی ۲-ایزو پروپیل-۶-متیل-۴-هیدروکسی پیریمیدین (IMHP) با $R_f = 0.16$ زیر نور UV و به رنگ آبی ظاهر شد.



نمودار ۱-۱- مقایسه میزان هیدرولیز دیازینون در نمونه های تیمار شده و تیمار نشده با آن و همزمان تشکیل IMHP

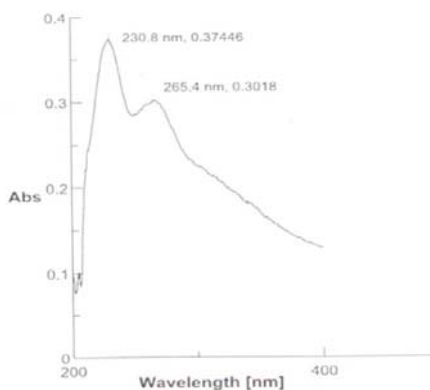
لکه شماره (۱) تا (۵) مربوط به فراکشن هگزان بوده و دیازینون رانشان می‌دهند. لکه‌های شماره (۶) تا (۸) مربوط به فراکشن کلروفرم-دی‌اتیل اتر بوده و IMHP رانشان می‌دهند. لکه‌های انتهایی مربوط به نمونه‌های کاملاً هیدرولیز شده بوده و لذا اثری از IMHP نیز مشاهده نمی‌شود.

طیف‌های اسپکتروفتومتری UV/Vis مربوط به دیازینون و IMHP در نمونه‌های شاهد و تلقیح شده: بمنظور تایید نتایج گرفته شده از آنالیز باکروماتوگرافی لایه نازک، بطور همزمان با استفاده از اسپکتروفتومتری نیز طیف‌های دیازینون با $\lambda_{max}=230nm$ و IMHP با $\lambda_{max}=211nm$ در نمونه‌های شاهد و تلقیح شده در طی مدت انکوباسیون (۵روز) مورد بررسی و نتایج آن در زیر آورده شده است. در نمودارهای ۱-۲ و ۱-۳ که بترتیب مربوط به نمونه شاهد در روز اول و پنجم می‌باشد، فقط طیف دیازینون مشاهده شده است. در حالیکه در نمودارهای ۱-۴ الی ۱-۸ که مربوط به نمونه تلقیح شده در طی مدت پنج روز می‌باشد، در روز تلقیح (نمودار ۱-۴) فقط طیف دیازینون، اما یک روز بعد از تلقیح طیف مربوط به IMHP نیز قابل مشاهده شده است. ضمن اینکه با تشکیل IMHP و همزمان با افزایش جذب آن، میزان جذب دیازینون نیز روندی کاهشی پیدا کرده بطوریکه در انتهای زمان انکوباسیون طیف دیازینون مشاهده نگردیده است.

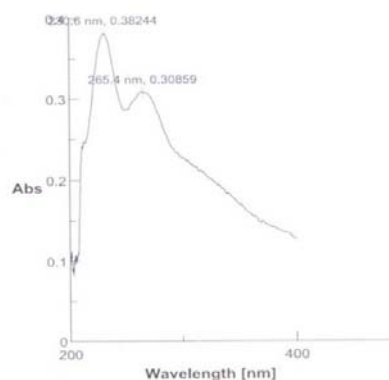
این مطالعه نشان داد که در ۳ روز اول انکوباسیون با نمونه‌های تیمار شده با دیازینون، ابتدا تبدیل به IMHP شده و سپس در ۲ روز بعدی (بین ۷۵ تا ۱۰۰ ساعت) متابولیزه و به دی‌اکسید کربن تبدیل گردیده است. بعبارت دیگر از یک طرف با هیدرولیز دیازینون در نمونه‌های تیمار شده، سطح دیازینون کاهش یافته و از طرف دیگر IMHP، به همان میزان افزایش پیدا کرده است. البته این حالت در مخلوط انکوباسیون تا ۷۵ ساعت قابل رویت می‌باشد شکل (۱-۲).



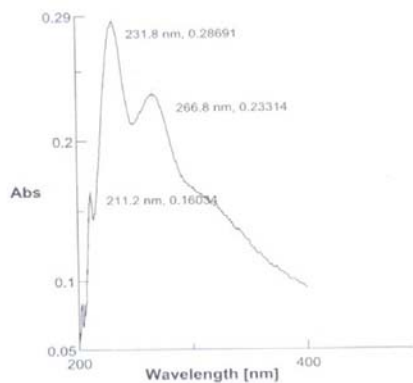
شکل ۱-۲- نتایج آنالیز TLC از دیازینون و IMHP بعنوان محصول هیدرولیز آنزیمی آن



نمودار ۱-۲- طیف دیازینون با $\lambda_{max}=230nm$ مربوط به نمونه شاهد در روز اول

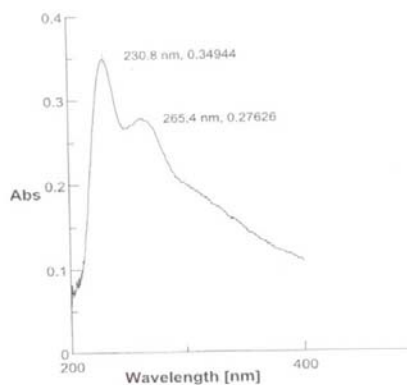


نمودار ۱-۳- طیف دیازینون با $\lambda_{max}=230nm$ مربوط به نمونه شاهد در روز پنجم



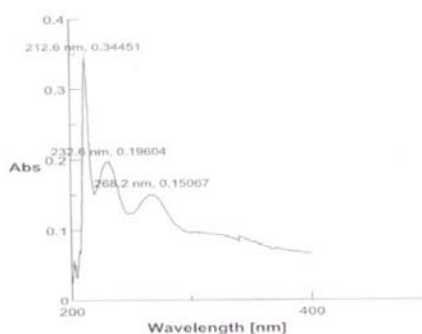
نمودار ۱-۴- طیف مربوط به دیازینون در نمونه تیمار شده

در روز تلقیح



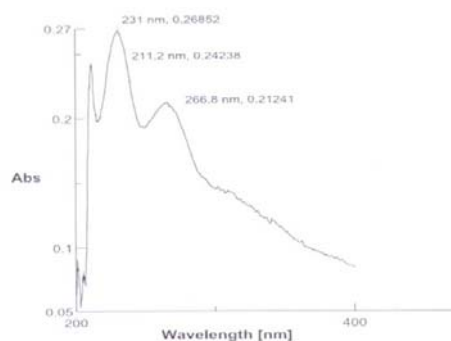
نمودار ۱-۵- طیف مربوط به دیازینون و IMHP (در حال تشکیل)

در نمونه تیمار شده



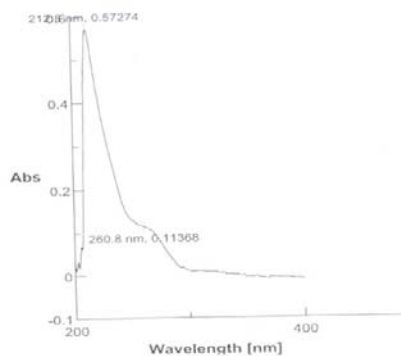
نمودار ۱-۷- طیف مربوط به دیازینون و IMHP در نمونه تیمار شده

در روز دوم بعد از تلقیح (کاهش دیازینون همزمان با افزایش IMHP)



نمودار ۱-۶- طیف مربوط به دیازینون و IMHP در نمونه تیمار شده

در روز اول بعد از تلقیح (کاهش دیازینون همزمان با افزایش IMHP)



نمودار ۱-۸- طیف مربوط به IMHP در نمونه تیمار شده در روز سوم بعد از تلقیح (حذف دیازینون و افزایش IMHP)

آنزیمی خام و فراکشنها در جدول (۱-۴) نشان داده شده است. آنزیم OPH به میزان خلوص ۵۷/۴۸، با فعالیت ویژه برابر ۱۶/۴۴ واحد در هر میلی گرم پروتئین برای دیازینون بعنوان سوبسترا و بازده ۱۱/۴۰٪ از محیط کشت جدا و تخلیص شده است.

نتایج کمی مربوط به مراحل تخلیص آنزیم OPH: آنزیم ارگانوفسفات هیدرولاز (OPH) از *Pseudomonas sp.* با استفاده از روش رسوب گذاری با سولفات آمونیوم و بدنبال آن با کرومانوگرافی تعویض یونی DEAE-Sepharose خالص سازی و نتایج آن شامل مقدار پروتئین، فعالیت کل، فعالیت ویژه، میزان خلوص سازی و بازده مربوط به محلول

جدول ۱-۴- داده‌های کمی حاصله از تخلیص آنزیم OPH

مرحله خالص سازی	حجم کل (mL)	پروتئین تام (mg)	فعالیت کل (U)	فعالیت ویژه (U/mg protein)	میزان خالص سازی (Fold)	بازده (%)
محلول آنزیمی خام	۳۵	۴۸۴/۲۵	۱۳۸/۳۹	۰/۲۸۶	۱	۱۰۰
محلول رویی سانتریفیوژ بعد از تریتون X100	۲۸	۲۷۳/۱۹	۱۳۰/۴۴	۰/۴۷۷	۱/۶۷	۹۴/۲۵
محلول رویی رسوب گذاری با سولفات آمونیوم ۴۰٪	۲۲	۸۱/۳۲	۷۰/۸۵	۰/۸۷۱	۳/۰۴۵	۵۱/۱۹
محلول رویی رسوب گذاری با سولفات آمونیوم ۶۰٪	۱۷	۲۷/۶۲	۴۹/۲۶	۱/۷۸	۶/۲۲	۳۵/۵۹
فراکشن خارج شده از ستون کروماتوگرافی DEAE-Sephrose	۸	۰/۹۶	۱۵/۷۸	۱۶/۴۴	۵۷/۴۸	۱۱/۴۰

اثر دما: اثر دما بر روی فعالیت آنزیم OPH از ۲۰-۷۰°C در نمودار ۱-۱۰ مشخص شده است. همانطور که مشاهده می‌گردد، در ابتدا با افزایش دما فعالیت آنزیم نیز افزایش یافته و این افزایش از ۳۷-۳۰°C شدت گرفته، بطوریکه در دمای ۳۷°C به بالاترین میزان خود رسیده است. بعبارت دیگر بهترین دما برای فعالیت آنزیم دمای ۳۷°C می‌باشد. با ادامه افزایش دما از این محدوده فعالیت آنزیم با شیب تندی کاهش یافته بطوریکه در دمای ۷۰°C به بعد تقریباً فعالیت خود را از دست داده است.

اثر غلظت: اثر غلظت دیازینون بعنوان سوبسترا در محدوده ۰/۰۵M-۰/۰۱M در نمودار ۱-۱۱ حاکی از آن است که عصاره آنزیمی OPH بالاترین فعالیت را در غلظت ۰/۰۵M سوبسترا نسبت به سایر غلظت‌های سوبسترا دارد. همچنین فعالیت آنزیم یک منحنی هیپربولیک با سوبسترا تا غلظت ۰/۰۵M نشان داده است. اما بالاتر از این غلظت، تغییری در فعالیت آنزیم مشاهده نشد.

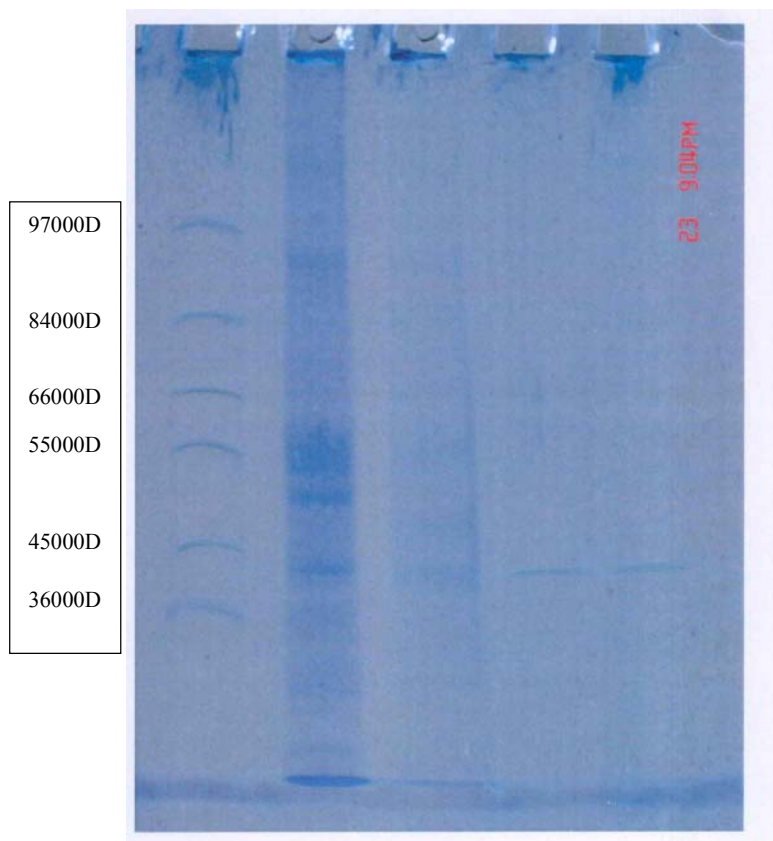
ارزیابی پارامترهای کینتیکی آنزیم: پارامترهای کینتیکی با استفاده از نمودار لاینیور-برک بوسیله دیازینون بعنوان

نتایج الکتروفورز SDS-PAGE عصاره آنزیمی همراه با مارکر پروتئینی: برای تایید درجه خلوص و تعیین وزن مولکولی آنزیم تخلیص شده از روش الکتروفورز SDS-PAGE استفاده شد. همانطور که در شکل (۱-۳) نشان می‌دهد پروتئین‌های اضافی در هر مرحله از تخلیص آنزیم حذف گردیده، بطوریکه در فراکشن خارج شده از ستون کروماتوگرافی تعویض یونی DEAE-Sephrose (چاهک چهارم)، آنزیم خالص سازی شده تنها یک باند با وزن مولکولی تقریبی ۴۰ کیلو دالتون در ناحیه بین 36KD و 45KD مارکر پروتئینی مشاهده گردید.

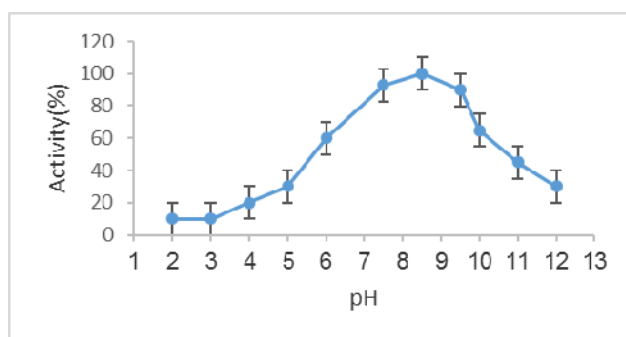
اثر pH: اثر pH بر روی فعالیت آنزیم OPH در محدوده pH ۶-۱۲ تعیین گردید. همانطور که در نمودار ۱-۹ مشاهده می‌گردد، فعالیت آنزیم در pH ۶ به بالا، افزایش یافته بطوریکه در pH برابر با ۸/۵ به ماکزیمم فعالیت خود رسیده است. بعبارت دیگر pH بهینه برای فعالیت آنزیم برابر با ۸/۵ می‌باشد. با افزایش pH از ۸/۵ به بالا و در pH کمتر از ۶ فعالیت آنزیم کاهش قابل ملاحظه‌ای را نشان داده است.

در لیتر در دقیقه تعیین گردید (نمودار ۱-۱۲).

سویسترامحاسبه شد که مقدار K_m و V_{max} برای محلول آنزیمی بترتیب $434/2 \mu M$ و $107/3 \mu M$ سویسترای هیدرولیز شده



شکل ۱-۳- از سمت چپ: چاهک اول مارکر، چاهک‌های دوم، سوم و چهارم مربوط به مراحل دوم تا چهارم تخلیص آنزیم و چاهک پنجم تکرار چاهک چهارم می باشد که نشان می دهد این باند آنزیمی OPH وزن مولکولی بین ۳۶ تا ۴۵ کیلو دالتون دارد.

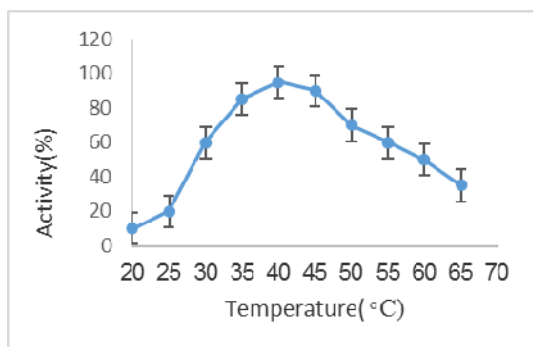


نمودار ۱-۹- اثر pH بر فعالیت آنزیم OPH

منعکس گردیده است. نتایج نشان داد یونهای Mg^{+2} و Zn^{+2} تاثیر مهمی بر فعالیت آنزیم ندارند. در حالیکه یونهای Ca^{+2} و Co^{+2} فعالیت آنزیم را افزایش داده امیون Fe^{+3} فعالیت

اثر EDTA و یونهای فلزی: تاثیر EDTA و یونهای Zn^{+2} ، Co^{+2} ، Mg^{+2} ، Ca^{+2} ، Fe^{+3} بر روی فعالیت آنزیم OPH در pH برابر با ۸/۵ و دمای $37^{\circ}C$ بررسی و نتایج آن در جدول ۱-۵

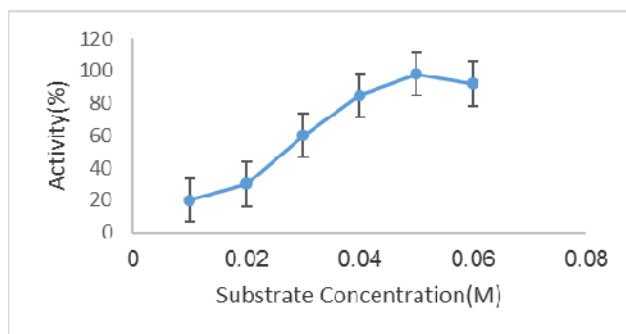
آنزیم راکاهش داده و EDTA بیشترین اثر منفی بر فعالیت آنزیم داشته است.



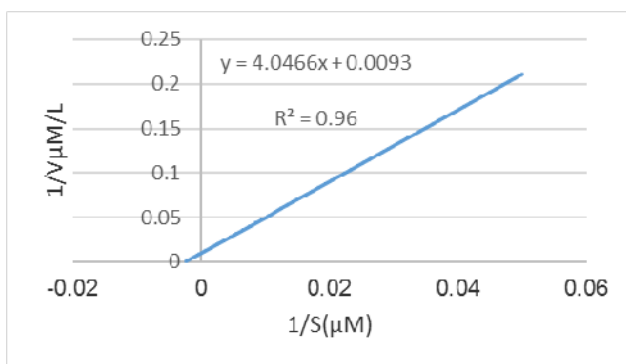
نمودار ۱۰- اثر دما بر فعالیت آنزیم OPH

جدول ۱-۵- مقایسه تاثیر یونهای فلزی بر روی فعالیت آنزیم OPH

یونهای فلزی	درصد فعالیت
Normal (بدون یون)	۱۰۰
Zn ⁺²	۸۴
Co ⁺²	۱۱۹
Ca ⁺²	۱۰۶
Mg ⁺²	۷۷
Fe ⁺³	۴۳
EDTA	۱۱



نمودار ۱۱- اثر غلظت سوبسترا (دیازینون) بر فعالیت آنزیم



نمودار ۱۲-۱- نمودار لینویور-برک مربوط به عصاره آنزیمی خالص سازی شده

توجه به نیازهای فزاینده جوامع انسانی به تامین غذا و انرژی از اهمیت فراوانی برخوردار بوده و باعث گردیده تا سموم با عنوان کلی آفت کش بطور وسیعی مورد استفاده قرار گیرند. از سوی دیگر آسیبهای ناشی از ماندگاری

بحث

بطور کلی فرآورده های کشاورزی همواره با خسارات بیشمار ناشی از آفات مواجه بوده است که این مسئله با

نتایج گرفته شده با استفاده از روش TLC در این مطالعه نشان داد که در طی دوره پنج روزه انکوباسیون، دیازینون ($RF=0.78$) موجود در نمونه های تیمار شده، تا روز سوم انکوباسیون (البته بعد از یک تاخیر یکروزه) توسط آنزیم OPH هیدرولیز و به IMHP ($RF=0.16$) (بعنوان متابولیت اصلی ناشی از هیدرولیز دیازینون)، با سمیت کمتر تبدیل شده که در صفحات TLC کاملاً مشخص می‌باشد. در ادامه هیدرولیز آنزیمی، IMHP نیز مینرالیزه شده و به دی اکسید کربن تبدیل گردیده است (شکل ۱-۲). این نتایج مطابق با گزارشاتی است که توسط Sethunathan, N. and Yoshida, T., 1969 & 1973; Sethunathan, N. and Pathak, M. D., 1971 & 1972; Sethunathan, N. and MacRae, C. 1969; Lichtenstein, E. P. et al. 1967; ارائه شده است (۲۶، ۳۳، ۳۴، ۳۵، ۳۶، ۳۸).

بمنظور تایید این نتایج، در طی مدت انکوباسیون، از اسپکتروفتومتری جهت مانیتورینگ هیدرولیز آنزیمی دیازینون ($\lambda_{max}=230nm$)، تشکیل IMHP ($\lambda_{max}=211nm$) و نیز افزایش IMHP همزمان با کاهش تدریجی دیازینون استفاده شده است. نتیجه آنکه از یک طرف دیازینون بوسیله عملکرد هیدرولازی آنزیم OPH در نمونه های تیمار شده، هیدرولیز گشته و سطح آن بتدریج کاهش یافته و به پایین ترین حد ممکن رسیده، و از طرف دیگر محصول هیدرولیز یعنی IMHP، به همان میزان افزایش یافته و بالاترین حد ممکن را نشان داده است (نمودارهای ۱-۱ تا ۱-۸). این نتایج مطابق با نتایجی است که توسط Sethunathan, N., Pathak, M. D., 1971 گزارش شده است (۳۵).

استفاده از محیط کشت غنی شده، روشی است که به افزایش تعداد میکروارگانیسمهای مورد نظر در مقایسه با سایر میکروارگانیسمها منجر می‌شود. این فرآیند، شامل ایجاد شرایط مناسب برای رشد میکروارگانیسم مورد نظر، با ایجاد شرایط نامناسب برای رشد سایر میکروارگانیسمها است. در این مطالعه بمنظور کاهش زمان هیدرولیز آنزیمی

سموم خصوصاً آفت کشتهای فسفره در فرآورده های کشاورزی، خطرات بزرگی در سلامت جانوران مفید، انسان و تعادل اکوسیستم پدید می‌آورند. سمیت آفت کشتهای در موجودات مختلف بویژه جانوران بطور گسترده ای بررسی گردیده و شواهد متعددی از ابعاد بیوشیمی، سم شناسی، مورفولوژی، بافت شناسی و سیتوژنتیک آنها باثبات رسیده که البته این اثرات تابع عوامل مختلف از جمله نوع، مقدار و ساختار شیمیایی سم، گونه، جنسیت و سن موجود زنده و نیز راههای ورود سم در بدن حیوان می‌باشند.

در این راستا، تحقیقات بمنظور سم زدایی و پاکسازی محیط زیست از این ترکیبات خطرناک با استفاده از روشهای فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی مورد توجه قرار گرفته است. از جمله ابعاد منفی استفاده از روشهای فیزیکی و شیمیایی سم زدایی و زدودن آلودگیهای زیست محیطی شامل افزایش آلودگیهای جدید به محیط زیست، حذف بسیاری از فعالیتهای زیستی، بازدهی پایین و هزینه بالای آنها می باشد. در روش بیولوژیک میکروارگانیسمهای محیطی که در خاک و آب قرار دارند، در تجزیه مواد شیمیایی مختلف از جمله ترکیبات آلی فسفره تواناییهای چشمگیری دارند. باکتریها قابلیت تکثیر فوق العاده ای داشته و در شرایط مختلف رشد می‌نمایند، شرایط نگهداری و بکار گیری آنها از نظر زمان و هزینه اقتصادی مقرون بصرفه بوده و چون بسیاری از آنها بعنوان فلور طبیعی محیط زیست محسوب می‌گردند، احتمالاً آلودگی دیگری ایجاد نمی‌نمایند. لذا توانایی اختصاصی میکروارگانیسمهای باکتریایی و قارچی در این است که آفت کش را به متابولیتی با سمیت کمتر تبدیل کرده و پس از آن مجدداً بوسیله همان میکروارگانیسم، و یا بوسیله طیف وسیعی از میکروارگانیسمهای ثانویه ای که در محیطهای خاکی و آبی وجود دارند، متابولیت حاصل متابولیزه شده و بعنوان منبع کربن، نیتروژن، فسفر و یا انرژی در تامین فعالیتهای حیاتی باکتریها مورد استفاده قرار می‌گیرد (۴۱).

کروماتوگرافی تعویض یونی انجام شده، که منجر به افزایش فعالیت ویژه آنزیم گردیده است (۲۳، ۲۸، ۱۲).

در این تحقیق، بمنظور ارزیابی خلوص آنزیم و تعیین وزن مولکولی آن، از روش الکتروفورز SDS-PAGE همراه با مارکر پروتئینی استفاده شده که تک باند آنزیمی OPH با وزن مولکولی حدود ۴۰KD مشخص گردیده است (شکل ۱-۳). این نتایج مشابه با نتایج گرفته شده از آنزیم OPH جدا شده از سویه باکتریایی *Pseudomonas diminuta* گزارش شده توسط Dumas, D. P. و همکارانش در سال ۱۹۸۹ می‌باشد (۱۲).

در این تحقیق همچنین خواص کینتیکی آنزیم OPH برای تعیین شرایط بهینه ماکزیمم فعالیت آنزیم مطالعه و تاثیر pH، دما و غلظت سوبسترا بر روی فعالیت آنزیم بررسی گردیده که ماکزیمم فعالیت آنزیم، در pH برابر ۸/۵ و دمای ۳۷°C نشان داده شده است (نمودارهای ۱-۹ و ۱-۱۰). در واقع اثر pH بر فعالیت کاتالیزوری آنزیم، بر روی گروه‌های یونیزه شونده در جایگاه فعال آنزیم بوده که بر روی واحد های اسیدی و بازی آمینو اسیدها قرار دارند. آنزیم در pH پایین تر از ۶ کمترین فعالیت را داشته، زیرا pH اسیدی باعث دناتوره شدن آنزیم و یا احتمالا خروج کوآنزیم از آن شده، لذا فعالیت کاتالیزوری آنزیم مختل می‌گردد (۳۲). تغییر دما نیز بر فعالیت آنزیم تاثیرگذار است، در ابتدا با افزایش دما و بموجب آن افزایش تعداد مولکولهای دارای انرژی لازم برای غلبه بر انرژی فعال سازی، سرعت واکنش افزایش پیدا می‌کند. در این حالت انتقالی، انرژی کینتیکی آنزیم با غلبه بر سد انرژی، پیوندهای ضعیف هیدروژنی و هیدروفوبیک را که حافظ ساختار دوم و سوم آنزیم هستند، شکسته باعث افزایش سرعت واکنش می‌گردد. در این دما اگر دناتوراسیون آنزیم اتفاق بیفتد، منجر به تغییر در ساختار جایگاه فعال آنزیم شده و همراه با آن فعالیت کاتالیتیکی آنزیم از دست می‌رود. بنابراین آنزیمها ماکزیمم فعالیت خود را در یک دمای

دیازینون، با استفاده از تکنیک غنی سازی محیط کشت و بدنبال آن تراکم مناسبی از جمعیت میکروارگانیسمها در آن، سرعت هیدرولیز آنزیمی دیازینون به کمتر از ۱۰ ساعت تقلیل یافته است (جدول ۱-۲)، که حاکی از افزایش تشکیل آنزیم (OPH) در سیستم های میکروبی برای تجزیه زیستی ترکیبات آفت کش می‌باشد. در تحقیقاتی که توسط Sethunathan, N. and Pathak, M., D. 1971 و با استفاده از تکنیک غنی سازی محیط کشت انجام شده، سرعت هیدرولیز آنزیمی مولکول دیازینون بعد از انتقال پنجم به ۶ ساعت کاهش یافته است (۳۵). همسو با نتایج گرفته شده از سویه *Pseudomonas sp.* در این تحقیق، مطالعات بر روی سویه های دیگری همچون *Agrobacterium sp.*، *Arthrobacter sp.* و *Flavobacterium sp.* نیز انجام شده که از دیازینون بعنوان منبع تامین کننده کربن برای تامین فعالیت های حیاتی خود استفاده نموده اند (۲۹، ۱۵).

از آنجایی که آنزیم استخراج شده از نوع آنزیمهای درون سلولی بود، لذا طی مراحل چهارگانه ذیل شامل: استفاده از سونیکاتور، تریتون X-100، رسوب دهی با سولفات آمونیوم و ستون کروماتوگرافی تعویض یونی DEAE-Sepharose جداسازی عصاره آنزیمی از توده سلولی و تخلیص آن انجام و فعالیت ویژه آنزیم به ۱۶/۴۴U/mg رسید، که افزایش ۵۷ برابری در فعالیت آنزیم OPH را نشان داده است (جدول ۱-۴). در این راستا مطالعات دیگری نیز توسط Kearney, P. C. در سال ۱۹۶۵ بر روی تخلیص آنزیم هیدرولیزکننده فنیل کارباماتها جدا شده از سویه باکتریایی *Pseudomonas sp.* و Mulbery, W. W. and Karns, J. S. در سال ۱۹۸۹ بر روی تخلیص آنزیم پاراتیون هیدرولاز جدا شده از سه سویه باکتریایی گرم منفی (*Flavobacterium sp.* (strain ATCC 27551, Strain B-1, Strain SC) و Dumas, D. P. و همکارانش در سال ۱۹۸۹ بر روی تخلیص آنزیم فسفوتری استراز جدا شده از سویه باکتریایی *Pseudomonas diminuta* با استفاده از تکنیکهای ژل فیلتراسیون و

(۱۲)، اما حضور آن همچنان منجر به القاء فعالیت میکرو ارگانیسرها در تولید آنزیم OPH جهت سم زدایی خاکهای در معرض ترکیبات ارگانوفسفره نظیر دیازینون گردیده است. مضافاً اینکه K_m بالا نشان‌دهنده آنستکه فعالیت سم زدایی آنزیم OPH بصورت تدریجی انجام گرفته و همانند فعالیت آنزیمهای لیپاز، عملکرد بهینه آن بطئی بوده و به زمان احتیاج دارد که البته در این تحقیق با استفاده از تکنیک غنی سازی عامل هیدرولیز آنزیمی دیازینون در محیط کشت، زمان هیدرولیز با کاهش چشمگیری به کمتر از ۱۰ ساعت تقلیل یافته است. بعبارت دیگر بحث اپتیم فعالیت آنزیم و بهینه سازی شرایط، نقش مهمی در کارایی عملکرد این آنزیم بعهده دارد. علاوه بر این، از آنجائیکه این آنزیم بعنوان آنزیم فسفوتری استراز PTE (Phosphotriesterase) نیز معرفی شده، لذا علاوه بر سم زدایی و حذف یا کاهش آلودگیهای ناشی از مصرف ترکیبات ارگانوفسفره همراه با توانایی اختصاصی آن در آزادسازی فسفات سوم از تری استرهای ارگانو فسفره، بعنوان کود زیستی (Biofertilizer) نقش موثری نیز در بازیافت فسفات و نتیجتاً حاصلخیز نمودن خاک، ایفا نموده است.

نتیجه گیری

توانایی میکروارگانیسرهای خاک شالیزارها در استفاده از ترکیبات ارگانوفسفره نظیر دیازینون (بعنوان آفت کش) برای تامین فعالیتهای حیاتی خود، با القاء تولید آنزیم OPH صورت می‌گیرد که منجر به هیدرولیز طیف وسیعی از این ترکیبات گردیده و سمیت آنها را حذف یا کاهش می‌دهد. علاوه بر این، آنزیم با عملکرد فسفوتری استراز خود می‌تواند نقشی موثر در بازیافت فسفات برای تولید کود زیستی، جهت حفظ حاصلخیزی خاک، ایفاء نماید. در این تحقیق نتایج حاصل از عملکرد تدریجی و موثر آنزیم OPH در شرایط بهینه از نظر pH و دما نشان داد که این آنزیم مناسبترین کاتالیست زیستی در سم زدایی از زمینهای

بهینه نشان می‌دهند (۶). همچنین بین فعالیت آنزیم و غلظت سوستر تا $0.05M$ یک منحنی هیپربولیک مشاهده شد (نمودار ۱-۱۱). غلظت سوستر یک فاکتور مهم برای ارزیابی فعالیت آنزیم می‌باشد، بطوریکه در غلظت پایین سوستر، بیشتر آنزیم بشکل آزاد وجود دارد و لذا در این حالت سرعت واکنش متناسب با غلظت سوستر افزایش پیدا می‌کند. افزایش غلظت سوستر منجر به تشکیل بیشتر کمپلکس سوستر-آنزیم گردیده و نهایتاً تمامی آنزیم تبدیل به کمپلکس سوستر-آنزیم شده، لذا سرعت واکنش آنزیمی به حداکثر میزان خود (V_{max}) می‌رسد. اما اگر غلظت سوستر افزایش یابد و تغییری در فعالیت آنزیم مشاهده نشود، نشان دهنده اشباع شدن آنزیم از سوستر بوده و افزایش بیشتر آن تاثیری بر روی سرعت واکنش نخواهد داشت. این حالت زمانی بوقوع می‌پیوندد که غلظت سوستر باندازه کافی بالا بوده و تمامی آنزیم آزاد بشکل کمپلکس سوستر=آنزیم درآمده و تقریباً غلظت آنزیم آزاد صفر شده است. حال اگر غلظت آنزیم بالا و غلظت سوستر کمتر از غلظت آنزیم باشد، فعالیت آنزیم افزایش نخواهد یافت، چون در این حالت سوستر نمی‌تواند تمام جایگاههای فعال آنزیم را اشغال کند. (۴۰،۳۲). همچنین نتایج نشان داد که باکاتیون دوظرفیتی بویژه Co^{+2} فعالیت آنزیم افزایش، اما با EDTA کاهش یافته است (جدول ۱-۵). چون EDTA با شلاته کردن یونهای دوظرفیتی باعث کاهش فعالیت آنزیم می‌گردد. بنابراین ضرورت وجود کاتیونهای دوظرفیتی در انجام عمل هیدرولیز آنزیم تایید می‌گردد (۴۲).

در این تحقیق ثابت میکائیلیس (K_m) آنزیم برای دیازینون برابر $434 \mu M$ ($0.434mM$) بدست آمده (نمودار ۱-۱۲)، که نزدیک به نتایج گزارش شده توسط Dumas و همکارانش در سال ۱۹۸۹ ($K_m=0.45mM$) می‌باشد. همانطور که نتایج نشان داده است علیرغم اینکه دیازینون سوسترای اختصاصی آنزیم OPH (نسبت به سایر سوسترهای گزارش شده توسط Dumas و همکارانش در سال ۱۹۸۹) نمی‌باشد

میکروارگانوسم مولد آنزیم OPH بدست آمده، که در صورت استفاده از آنزیم خالص شده، به نتایج مطلوبتری نیز خواهد رسید.

کشاورزی با کارایی بالا (با حذف یا کاهش ترکیبات ارگانوفسفره نظیر دیازینون) می‌باشد. البته این نتایج با استفاده از فعالیت محلول آنزیمی گرفته شده از

منابع

1. Abo-Amer A. 2011. Biodegradation of diazinon by *Serratia marcescens* DI101 and its use in bioremediation of contaminated environment. *J Microbiol Biotechnol.*, 21(1), 71–80.
2. Akbar, S., Sultan, S. 2016. Soil bacteria showing a potential of chlorpyrifos degradation and plant growth enhancement. *Braz. J. Microbiol.*, 47, 563-570.
3. Baishya, K., Sarma, H.P. 2015. Advances in biodegradation of organophosphorus pesticides. *Arch. Applied Sci. Res.*, 7, 37-43.
4. Bakry, N. M., El-Rashidy, A. H., Eldefrawi, A. T., E.Eldefrawi. M. 2006. Direct actions of organophosphate anticholinesterases on nicotinic and muscarinic acetylcholinic receptors. *J. Biochem.Toxicol.*, 3, 235-259.
5. Barik, S. Munnecke, D. M. 1982. Enzymatic hydrolysis of concentrated diazinon in soil. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, 29, 235-239.
6. Bender, M.L., Bergeron, R.J., Komiyama, M. 1985. *The Bioorganic Chemistry of Enzymatic catalysis.* Wiley-Interscience, 188(1), 167.
7. Bigley, A.N., Raushel, F.M. 2013. Catalytic mechanisms for phosphotriesterases. *Biochim. Biophys. Acta Proteins. Proteomics*, 1834, 443-453.
8. Bolognesi, C., Morasso, G. 2000. Genotoxicity of pesticides: potential risk for consumers. *Trends Food Sci. Technol.*, 11, 182–187.
9. Chen-Goodspeed, M., Sogorb, M., Wu, F., Hong, S. B., Raushel, F. 2001. Structural determinants of the substrate and stereochemical specificity of phosphotriesterase. *Biochemistry*, 40(5), 1325–1331.
10. Collee, J. G., Duguid, J. P., Fraser, A. G., Marmion, B. P. 1989. *Mackie & McCartney Practical Medical Microbiology* 13th ed. Vol.2, Churchill Livingstone.
11. Cycon, M., Wojcik, M., Piotrowska-Seget, Z. 2009. Biodegradation of the organophosphorus insecticide diazinon by *Serratia* sp. and *Pseudomonas* sp. and their use in bioremediation of contaminated soil. *Chemosphere*, 76, 494-501.
12. Dumas, D. P., Caldwell, S. R., James R., Wild, J. R., Raushel, F. M. 1989. Purification and Properties of the Phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*. *The journal biological chemistry*, 264(33), 19659-19665.
13. Geetha M, Fulekar M. H. 2008. Bioremediation of pesticides in surface soil treatment unit using microbial consortia. *African J. Envir. Sci. Tech.*, 2(2), 36–45.
14. Ghada M. E. S., Nivien A. A., Ibrahim, S.A., AbdEl-Razik, A.B., Hammad, M.A., Fatma M. H. 2018. Identification of Gene Encoding Organophosphorus Hydrolase (OPH) Enzyme in Potent Organophosphates-degrading Bacterial Isolates. *J. Environ. Sci. Technol.*, 11 (4), 175-189.
15. Ghassempour, A., Mohammadkhah, A., Najafi, F., Rajabzadeh, M. 2002. Monitoring of the pesticide diazinon in soil, stem and surface water of rice fields. *Anal. Sci.*, 18, 779-783.
16. Gilani, R.A., Rafique, M., Rehman, A., Munis, M.F.H., Chaudhary, H.J. 2015. Biodegradation of chlorpyrifos by bacterial genus *Pseudomonas*. *J. Basic Microbiol.*, 56, 105-119.
17. Gothwal, A., Dahiya, M., Beniwal, P., Hooda, V. 2014. Purification and kinetic studies of Organophosphorus hydrolase from *B. diminuta*. *Int. J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, 10, 341-344.
18. Horne, I., Sutherland, T.D., Oakeshott, J.G., Russell, R.J. 2002. Cloning and expression of the phosphotriesterase gene *hocA* from *Pseudomonas monteilii* C11. *Microbiology*, 148, 2687–2695.
19. Hong, S. B., Raushel, F. M. 1996. Metal-Substrate Interactions Facilitate the Catalytic Activity of the Bacterial Phosphotriesterase. *Biochemistry*, 35, 10904-10912.
20. Hong, S. B., Raushel, F. 1999. Stereochemical constraints on the substrate specificity of phosphotriesterase *Biochemistry*, 38, 1159–1165.
21. Kanekar, P., Bhadbhade, B. 2004. Biodegradation of Organophosphorus Pesticides. *Proc. Indian natn. Sci. Acad.*, 70, 57-70.
22. Karpouzias, D. G. and B. K. Singh. 2006. Microbial degradation of organophosphorus

- xenobiotics: Metabolic pathways and molecular basis. *Adv. Microb. Physiol.*, 51, 119-185.
23. Kearney, P. C. 1965. Purification and Properties of an Enzyme Responsible for Hydrolyzing Phenylcarbamates. *J. Agr. Food Chem.*, 13(6), 561-564.
 24. Khalid, M., Rasul, S., Hussain, J., Ahmad, R., Zia, A. 2016. Biodegradation of organophosphorus insecticides, chlorpyrifos, by *Pseudomonas putida* CP-1. *Pak. J. Zool.*, 48, 1453-1458.
 25. Khani, M., Kafilzadeh, F. 2015. Diazinon degradation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Flavobacterium* bacteria and assessing the growth kinetics. *J. Biol. Today's World*, 4, 44-48.
 26. Lichtenstein, E. P., Fuhremann, T. W., Scopes, N. E. A., Skrentny, R. F. 1967. Translocation of insecticides from soils into Pea plants, effects of the detergent LAS on translocation and plant growth. *J. Agr. Food Chem.*, 15(5), 864-869.
 27. Maheshwari, D.T., Thygaraj, V., Kumar, N. S. 2017. Extraction and Purification of Organophosphorus Hydrolase Enzyme from Soil Microorganism *Pseudomonas diminuta*. *Defence Life Science Journal*, 2(4), 416-421.
 28. Mulbery, W. W., Karns, J. S. 1989. Purification and Characterization of Three Parathion Hydrolases from Gram-Negative Bacterial Strains. *Applied and environmental microbiology*, 55(2), 289-293.
 29. Ohshiro, K., Kakuta, T., Sakai, T., Hirota, H., Hoshino, T., Uchiyama, T. 1996. Biodegradation of organo-phosphorus insecticides by bacteria isolated from turf green soil. *J. Ferment. Bioeng.*, 82, 299-305.
 30. Omburo, G. A., Kuo, J. M. 1992. Characterization of the zinc binding site of bacterial phosphotriesterase, *J. Biol. Chem.*, 267, 13278-13283.
 31. Rochu, D., Viguie, N., Renault, F., Crouzier, D., Froment, M., Masson, P. 2004. Contribution of the active-site metal cation to the catalytic activity and to the conformational stability phosphotriesterase: temperature and pH-dependence. *J. Biochem.*, 380, 627-633.
 32. Rowland, S. S., Speedie, M. K., Pogell, B. M. 1991. Purification and characterization of a secreted recombinant phosphotriesterase (parathion hydrolase) from streptomyces lividans. *Appl. Env. Microbio.*, 57, 440-44.
 33. Sethunathan, N., Macrae, I. C. 1969. Persistence and biodegradation of diazinon in submerged soils. *J. Agr. Food Chem.* 17(2), 221-225.
 34. Sethunathan, N., Yoshida, T. 1969. Fate of diazinon in submerged soil, accumulation of hydrolysis product. *J. Agr. Food Chem.* 17(6), 1192-1195.
 35. Sethunathan, N., Pathak, M. D. 1971. Development of a diazinon-degrading bacterium in paddy water after repeated applications of diazinon. *Can. J. Microbial.*, 17, 699-702.
 36. Sethunathan, N., Pathak, M. D. 1972. Increased biological hydrolysis of diazinon after repeated, application in rice paddies. *J. Agr. Food Chem.*, 20(3), 586-589.
 37. Sethunathan, N. 1972. Diazinon degradation in submerged soil and rice-paddy water. *Advan. Chem. Ser.*, 111, 144-255.
 38. Sethunathan, N., Yoshida, T. 1973. A *Flavobacterium* sp. That degrades diazinon and parathion. *Can. J. Microbiol.*, 19, 873-875.
 39. Singh, B. K., Walker, A. 2006. Microbial degradation of organophosphorus compounds. *FEMS Microbiol. Rev.*, 30, 428-471.
 40. Votchitseva, Y. A., Efremenko, E. N., Aliev, T. K., Varfolomeyev, S. D. 2006. Properties of hexahistidine tagged organophosphate hydrolase. *Biochem.*, 71, 216-22.
 41. William, J., Donarski, D. P., Dumas, D. P., Heitmeyer, V., Lewis, E., Raushel, F. M. 1989. Structure-Activity Relationships in the Hydrolysis of Substrates by the Phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*, *Biochemistry*, 28, 4650-4655.
 42. Wu, N., Deng, M., Shi, X., Liang, G., Yao, B., Fan, Y. 2004. Isolation, purification and characterization of a new organophosphorus hydrolase OPHC2. *Chinese Science Bulletin*, 49(3), 268-272.
 43. Yasouri, F. N. 2006. Plasmid mediated degradation of diazinon by three bacterial strains, *Pseudomonas* sp., *Flavobacterium* sp. and *Agrobacterium* sp., *Asian J. Chem.*, 18, 2437-2444.
 44. Zheng, Y., Long, L., Fan, Y., Gan, J., Fang, J., Jin, W. 2013. A review on the detoxification of organophosphorus compounds by microorganisms. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 7, 2127-2134.

Performance evaluation of soil microorganism producing organophosphate hydrolase enzyme in detoxification of organophosphorus compounds (diazinon) and its kinetic properties assessment

Haji Abolhasani M.¹ and Sahebghadam Lotfi A.²

¹ Dept. of Chemical Technology, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran, I.R. of Iran.

² Dept. of Clinical Biochemistry, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of Iran.

Abstract

Organophosphorus compounds, such as diazinon, are widely used as pesticides and insecticides in agriculture, due to their unique characteristics. Organophosphate Hydrolase (OPH) enzyme effectively hydrolyses a wide variety of organophosphate esters. In the present study, by using both enrichment culture and maximum dilution frequency techniques, the diazinon degradation bacteria was isolated from treated samples (Rice field) and was identified by morphological and biochemical tests. Then the enzyme was extracted from its bacterial strain and then purified using ammonium sulfate and ion exchange chromatography. The purity of the enzyme was confirmed by electrophoresis (SDS-PAGE), then its molecular weight was determined by specific marker proteins and its kinetic properties was evaluated. Using enrichment culture technique and the increasing factor of the biodegradability in diazinon-treated samples, enzymatic hydrolysis time decreased significantly with less than 10 hours. The main metabolite produced from diazinon hydrolysis was identified as 2-isopropyl-6-methyl-4-Hydroxy pyrimidine (IMHP) through both thin layer chromatography (TLC) and spectrophotometry techniques. IMHP has less toxicity compared with diazinon. The OPH enzyme was purified to 57.48 fold to a specific activity of 16.44 U/mg of protein from the crude enzyme solution with a yield of 11.4 percent and approximate molecular weight of 40 KD. Maximum activity enzyme was at optimum pH 8.5 and temperature of 37 °C. Additionally, substrate concentration up to 0.05 M and Co⁺², Ca⁺² metal ions presence had 119 and 106 percent respectively positive effects on activity enzyme. Michaelis constant (K_m) and maximal velocity (V_{max}) values for diazinon, as substrate were calculated as 434.2 μM and 107.3 μM/min, respectively. The overall results showed that OPH enzyme with its activity gradual and effective in addition to detoxification, could be played a key role in recovery of phosphate for the production of biofertilizer.

Keywords: Organophosphate Hydrolase (OPH), diazinon, 2-isopropyl-6-methyl-4-Hydroxy pyrimidine (IMHP), enzymatic hydrolysis