شناسایی و جداسازی باکتری‌های حاوی آنزیم ارگانوفسفروس هیدرولاز با قابلیت تجزیه‌زیستی سم ارگانوفسفره دیازینون از نمونه خاک کشاورزی

سارا مبارک‌پور[1]*؛ منصور بیات[2]؛ سهیل سبحان‌اردکانی[1]

چکیده

زمینه: دیازینون ترکیبی ارگانوفسفره است که به‌طور وسیع به‌عنوان حشره‌کش در کشاورزی استفاده می‌شود و از قابلیت انباشت و انتقال در خاک، آب و بافت‌های جانوری و بروز مسمومیت در گیاهان، جانوران و انسان برخوردار است. در انسان این ترکیب با غیرفعال کردن آنزیم استیل‌کولین استراز، مانع انتقال پیام عصبی می‌شود. پژوهش حاضر با هدف شناسایی سویه باکتریایی با قابلیت هیدرولیز و حذف سم دیازینون از خاک آلوده انجام یافت.

روش‌ها: 8 نمونه از خاک اراضی کشاورزی شهرستان همدان که طی دو دهه اخیر در معرض انواع سموم به‌ویژه دیازینون بودند، جمع‌آوری شد. پس از تهیه محیط‌های کشت، به‌منظور جداسازی و کشت باکتری‌های حاوی آنزیم OPH قادر به تجزیه سموم ارگانوفسفره توسط هیدرولیز آنزیمی دیازینون، نسبت به استخراج DNA ژنومی باکتری، تعیین توالی محصول پلاسمیدی، پردازش توالی حاصل از نظر فیلوژنی و ترسیم درخت فیلوژنی اقدام شد.

یافته‌ها: هشت سویه باکتریایی با قابلیت ترشح آنزیم OPH از نمونه‌ها جداسازی شد و یکی از آن‌ها با نام BS-1 با 86 درصد قرابت با گونه *Bacillus safensis* از کارایی قابل قبول در هیدرولیز سم دیازینون و استفاده از آن به‌عنوان منبع کربن و فسفر برخوردار است.

نتیجه‌گیری: باکتری شناسایی‌شده در این پژوهش با ترشح آنزیم OPH از قابلیت زیست‌پالایی سموم ارگانوفسفره به‌ویژه خاک آلوده به دیازینون در مقیاس آزمایشگاهی برخوردار است. قبل از استفاده از میکروارگانیسم‌ها به‌منظور زیست‌پالایی آلاینده‌ها در محیط‌های طبیعی، باید مطالعات بیش‌تری بر روی ثبات و تعامل محیط‌زیستی، ایمنی، راهبردهای تولید، هزینه-فایده، عوامل مخرب محیطی، سم‌شناسی، پیراسنجه‌های ژنتیکی و بیوشیمیایی انجام شود.

کلیدواژه‌ها: دیازینون، آنزیم ارگانوفسفروس هیدرولاز، *Bacillus safensis*، زیست‌پالایی

«دریافت: 1393/8/17 پذیرش: 1394/1/25»

1. گروه محیط زیست، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد همدان، همدان، ایران

2. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده علوم دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

***عهده‌دار مکاتبات:** همدان، شهرک شهید مدنی، دانشگاه آزاد اسلامی، دانشکده علوم پایه، گروه محیط زیست، تلفن: 08134494143، دورنگار: 08134494143

Email: sara.mobarakpoor@gmail.com

مقدمه

با ساخت و استفاده آفت‌کش‌ها توسط بشر و به‌دنبال آن مشخص شدن آثار مثبت آن‌ها از جمله بهبود کیفیت محیط زندگی انسان، حیوانات اهلی و گیاهان، افزایش تولیدات کشاورزی، بهبود شرایط بهداشت و سلامت انسان، عدم نیاز به اطلاع از خاستگاه بوم‌شناختی آفات، صرفه اقتصادی و تأثیر سریع بر گونه هدف، کاربرد این دسته از مواد شیمیایی آلی به‌ویژه بعد از جنگ جهانی دوم توسعه زیادی یافت. به‌نحوی که امروزه حفظ و بهبود کیفیت زندگی بدون این مواد شیمیایی برای بشر غیرقابل تصور است (1).

حشره‌کش‌های آلی فسفره از مهم‌ترین سموم آفت‌کش واجد فسفر در ترکیب خود هستند. در این گروه، سموم با خاصیت تماسی، گوارشی، نفوذی، تدخینی و

سیستمیک وجود دارد. این ترکیبات امروزه به‌دلایلی همچون خاصیت شدید حشره‌کشی و کنه‌کشی، اثرگذاری سریع، قابلیت متابولیسم سریع در بدن موجودات زنده، خاصیت نفوذی و سیستمیک برخی از آن‌ها و همچنین تجزیه سریع در خاک و آب و ایجاد آلودگی محیطی کم‌تر به‌طور گسترده به‌عنوان آفت‌کش و حشره‌کش مورد استفاده قرار می‌گیرند (**1** و **2**).

ترکیبات ارگانوفسفره با ممانعت از فعالیت آنزیم استیل‌کولین استراز که یک آنزیم ضروری برای فعالیت طبیعی انتقال پیام سیستم عصبی است، باعث اختلال در عملکرد سیستم عصبی می‌شوند (**3**). به‌دلیل وجود این ترکیبات، سالانه در سراسر جهان بیش از **3** میلیون نفر مسموم شده و بیش از **300** هزار نفر جان خود را از دست می‌دهند (**4**). علاوه بر این، انباشت زیستی این مواد در بدن جانوران در اثر جذب از راه‌های گوناگون به‌ویژه استفاده از مواد غذایی آلوده و در نهایت راه‌یابی به سطوح بالاتر هرم غذایی از دیگر اثرات منفی این ترکیبات در محیط‌زیست می‌باشد (**1**).

میکروارگانیسم‌ها نقش حیاتی در تخریب و تجزیه زیستی ترکیبات آلی دارند. بعضی از ترکیبات شیمیایی سنتزی به‌سرعت از محیط حذف می‌شوند، اما برخی دیگر در دوره‌های طولانی‌مدت مقاوم بوده و در محیط باقی می‌مانند. از اواخر دهه **1960** میلادی تجزیه میکروبی سموم و پاکسازی محیط‌های‌آلوده توسط میکروارگانیسم‌ها مورد توجه قرار گرفت (**5**). Sethunathan و Yoshida (**1973**) اولین مدرک حاکی از تجزیه‌زیستی آفت‌کش‌های دیازینون و پاراتیون توسط گونه‌های باکتری فلاوباکتریوم را ارایه کردند (**6**). از جمله مطالعاتی که در رابطه با شناسایی و استفاده از میکروارگانیسم‌ها به‌منظور تجزیه و خنثی‌کردن آلودگی مربوط به ترکیبات ارگانوفسفره انجام شده است، می‌توان به پژوهش Li و همکاران (**2008**)، Xu و همکاران (**2008**)، Anwar و همکاران (**2009**)، Cycoń و همکاران (**2009**)، Chen و همکاران (**2011** الف و ب)، Kulshrestha و Kumari (**2011**)، Theriot و Grunden (**2011**) و Gao و همکاران (**2012**) (**7-15**) اشاره کرد.

برخی از باکتری‌ها همچون گونه‌های فلاوباکتریوم (*Flavobacterium* sp.) و سودوموناس (*Pseudomonas* sp.) با تولید آنزیم‌های فسفریک تری‌استرهیدرولاز (Phosphoric Triester Hydrolases -PTH) ترکیبات اورگانوفسفره را تخریب می‌کنند (**16**). گروه آنزیم‌های فسفریک تری‌استراز شامل دو زیرگروه اورگانوفسفروس هیدرولاز (Organophosphate hydrolase-OPH) و اورگانوفسفروس اسید انیدرولاز (Organophosphate acid anhydralas-OPAA) می‌باشد. آنزیم OPH معروف به فسفوتری‌استراز یک متالوپروتیین با وزن مولکولی تقریبی **36**KD_a می‌باشد که هر مونومر آن دارای یک یون فلزی مثل Zn^{2+}، Mn^{2+}، Co^{2+}، Ni^{2+} و Cd^{2+} است. این آنزیم‌ها از آنجا که دارای دامنه فعالیت بیشتری بوده و می‌توانند پیوندهای P-F، P-S ، P-N و P-O را برش دهند، بنابراین بر روی انواع ترکیبات اورگانوفسفره از خود فعالیت نشان داده و قادرند این ترکیبات را هیدرولیز کنند. به بیان دیگر این آنزیم‌ها قادر به تجزیه طیف وسیعی از عوامل عصبی ارگانوفسفره و حشره‌کش‌ها هستند (**17**).

با توجه به این‌که استان همدان یکی از قطب‌های کشاورزی غرب کشور محسوب می‌شود، از این‌رو انواع نهاده‌های کشاورزی از جمله سموم شیمیایی به‌میزان زیاد و در مقیاس وسیع مورد استفاده کشاورزان قرار می‌گیرد. پژوهش حاضر با هدف جداسازی و معرفی یک‌سویه باکتریایی برتر با قابلیت تولید آنزیم ارگانوفسفوروس هیدرولاز از نمونه خاک آلوده به سموم ارگانوفسفره‌ای که طی دو دهه اخیر در معرض انواع سموم کشاورزی به‌ویژه ترکیبات ارگانوفسفره بودند به‌منظور حذف زیستی سم دیازینون انجام شد.

مواد و روش‌ها

هشت نمونه **25** گرمی از خاک اراضی کشاورزی شهرستان همدان از عمق **0-15** سانتی‌متری برداشت و در

ظروف سترون نگه‌داری شد. سپس نسبت به تعیین غلظت دیازینون در نمونه‌های خاک اقدام شد (18 و 19).

پس از ساخت محیط‌های کشت نمکی براث و آگار حاوی سم دیازینون با غلظت 10 میلی‌گرم در میلی‌لیتر نسبت به جداسازی باکتری‌های حاوی آنزیم OPH قادر به تجزیه سموم ارگانوفسفره از نمونه‌های خاک و کشت آن‌ها مطابق روش استاندارد اقدام شد (1). شناسایی باکتری واجد بیش‌ترین ترشح آنزیم OPH نیز توسط دستگاه اسپکتروفتومتر Jenway مدل 6850 در طول موج 745-410 نانومتر انجام شد (8 و 15).

مشاهده و تعیین هویت سویه باکتریایی برتر واجد بیش‌ترین ترشح آنزیم OPH به‌ترتیب با روش‌های رنگ‌آمیزی و مولکولی انجام شد (20). برای استخراج DNA ژنومی باکتری نیز مطابق روش استاندارد، پس از سانتریفوژ کردن محیط کشت مایع حاوی باکتری و افزودن بافر لیزکننده به رسوب حاصل، نسبت به افزودن محلول پروتئیناز K با غلظت 10 میلی‌گرم در میلی‌لیتر به نمونه و مخلوط کردن محلول به‌وسیله ورتکس اقدام شد. پس از افزودن بافر اتصال به نمونه و مخلوط‌کردن آن به‌وسیله ورتکس، نسبت به افزودن اتانول (100-96%) به نمونه و مخلوط کردن مجدد آن اقدام شد. با قرار دادن ستون خالص‌سازی (Spin column ^{MBST}) در میکروتیوب و اضافه‌کردن مخلوط مرحله قبل به ستون، محلول حاصل سانتریفوژ شد. پس از افزودن بافر شستشو به ستون و سانتریفوژ کردن آن، نسبت به قراردادن ستون داخل یک میکروتیوب جدید سترون، افزودن بافر آزادساز گرم شده به ستون و سانتریفوژ کردن آن اقدام شد (15 و 19).

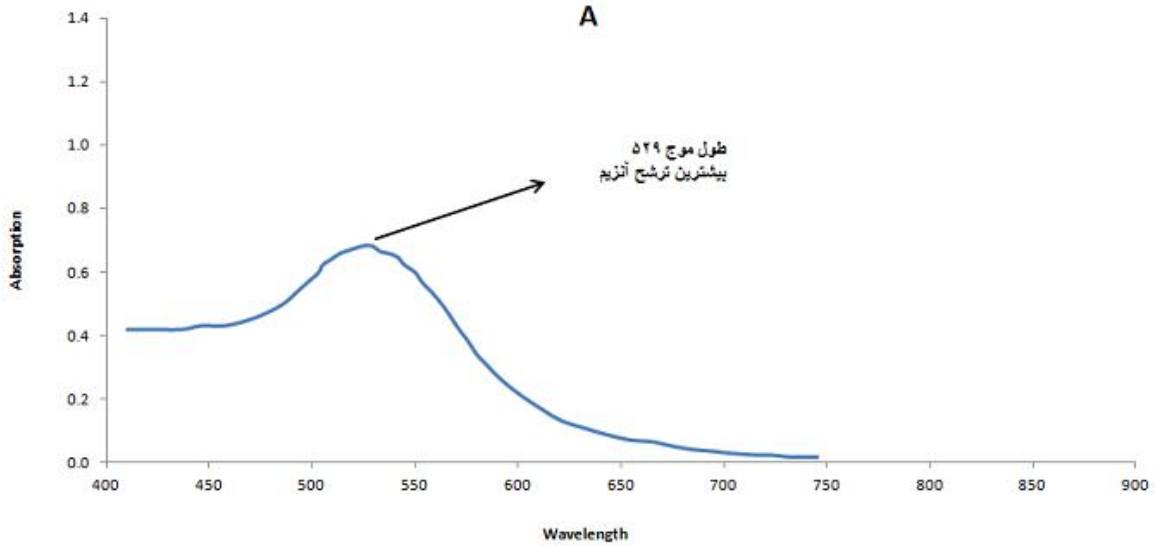
برای جداکردن توده سلولی از کشت باکتری در محیط مایع، از 1 میکرولیتر محلول DNA ژنومی به‌عنوان DNA الگو در PCR با پرایمرهای fD_1 و rD_1 طی 3 مرحله دناتوره شدن، جفت‌شدن آغازگرها (Annealing) و پلیمریزه شدن (Extension) استفاده شد (21). برای جداسازی پلاسمیدهای دارای ژن 16S پلاسمید نوترکیب به داخل باکتری مستعد منتقل شد. همچنین غربال‌کردن کلون‌های واجد پلاسمید نوترکیب، غربال‌گری کلونی سفید/آبی برای بررسی قبول کردن باکتری در پذیرش ژن 16S، استخراج DNA پلاسمیدی نوترکیب و تعیین توالی آن از دوطرف (سکونسینگ دوطرفه) با پرایمرهای M13 fwd و M13 Rev با توجه به این‌که ژن 16S دارای حدود 1600 نوکلوئید می‌باشد، به روش استاندارد انجام شد (20 و 22).

در نهایت نسبت به تعیین توالی محصول پلاسمیدی، پردازش و مقایسه آن از نظر فیلوژنی با توالی‌های موجود در بانک اطلاعات زیستی NCBI بخش 16S ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archaea) توسط نرم‌افزار BLASTn و ترسیم درخت فیلوژنی با استفاده از نرم‌افزار MEGA5 اقدام شد.

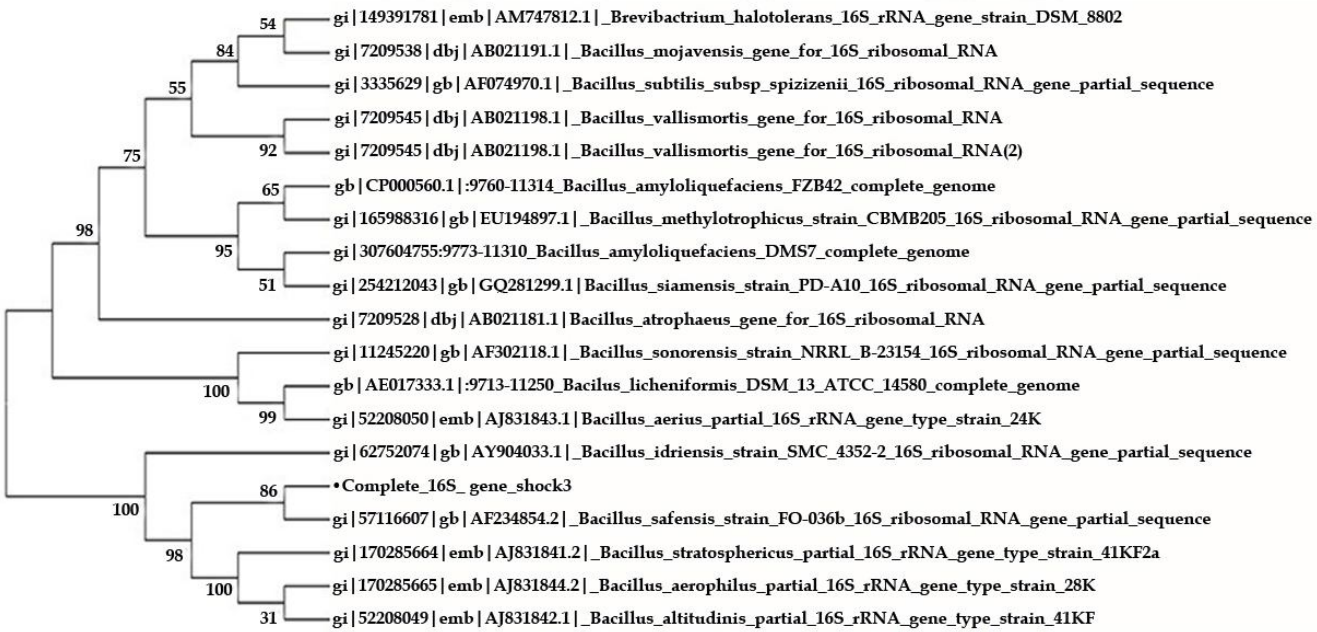
یافته‌ها

نتایج جداسازی باکتری‌ها از محیط کشت آگار حاوی سم دیازینون با قابلیت هیدرولیز و تجزیه‌کنندگی سم دیازینون از طریق بررسی تغییر در فرآیند جذب با استفاده از روش اسپکتروفتومتری بیانگر آن است که 8 کلونی مختلف قادر به رشد در محیط کشت می‌باشد. در این میان 7 سویه باکتری به‌ترتیب در طول موج‌های 516، 518، 519، 521، 522، 524 و 527 نانومتر شناسایی و جداسازی شد که به‌ترتیب با باکتری‌های *Bacillus pumilus*، *Bacillus stratosphericus*، *Bacillus aerophilus*، *Bacillus altitudinis*، *Bacillus atrophaeus*، *Bacillus amyloliquefaciens*، *Bacillus subtilis* قرابت داشتند. هشتمین سویه نیز در طول موج 529 نانومتر با قابلیت ترشح آنزیم OPH شناسایی شد که از بیش‌ترین قابلیت هیدرولیز و تجزیه‌کنندگی سم دیازینون در مقایسه با سایر سویه‌ها برخوردار بود (تصویر 1). نتایج درخت فیلوژنی (تصویر 2) بیانگر آن است که این باکتری باسیل گرم مثبت 86 درصد با باکتری *Bacillus safensis* قرابت دارد.

همچنین نتایج مستخرج از نرم‌افزار BLASTn به‌منظور مقایسه توالی‌های حاصل با توالی‌های موجود در بانک اطلاعات زیستی NCBI بیانگر آن است که بیش از **80** درصد DNA از ستون آزاد شده است.



تصویر 1 - بیشینه ترشح آنزیم OPH توسط سویه باکتری باسیل گرم مثبت شناسایی شده در طول موج **529** نانومتر



تصویر 2 - درخت فیلوژنی حاصل از مقایسه سویه‌های باکتریایی شناسایی‌شده

بحث

متاسفانه روش‌های آزمایشگاهی تنها قادر به جداسازی 10-1 درصد باکتری‌های در حال رشد در خاک هستند. بنابراین بسیاری از باکتری‌هایی که می‌توانند در فرآیند تخریب آلاینده‌ها در محیط‌های طبیعی تأثیرگذار باشند، در آزمایشگاه قابل شناسایی و جداسازی نیستند. از این‌رو توسعه روش‌هایی برای شناسایی و جداسازی باکتری‌های قادر یه پاکسازی محیط‌های آلوده بسیار مهم است (18). زیست‌پالایی به‌عنوان یک روش سازگار با محیط‌زیست از طریق ترکیبات تولیدشده توسط میکروارگانیسم‌های بومی در راستای سم‌زدایی درجای محیط از باقیمانده‌های مضر ترکیبات ارگانوفسفره امروزه یکی از موضوعات مورد توجه پژوهشگران می‌باشد. در این میان، شناسایی و جداسازی باکتری‌هایی با قابلیت ترشح آنزیم OPH به‌دلیل توانایی‌شان در متابولیزه کردن و تجزیه سموم ارگانوفسفره از طریق هیدرولیز باند استری این ترکیبات بسیار مورد توجه قرار گرفته است (18 و 22).

پژوهش حاضر با هدف شناسایی و جداسازی میکروارگانیسم‌هایی با قابلیت ترشح آنزیم ارگانوفسفوروس هیدرولاز از خاک کشاورزی بومی شهرستان همدان که طی دو دهه در معرض سموم ارگانوفسفره بود انجام یافت. نتایج نشان داد که باکتری باسیل گرم مثبت که 86 درصد با باکتری *Bacillus safensis* قرابت دارد، با ترشح آنزیم OPH قادر به تجزیه ترکیبات خطرناک ارگانوفسفره از قبیل دیازینون بوده و می‌تواند از این ترکیبات به‌عنوان منبع کربن و فسفر استفاده کند. با توجه به این‌که تاکنون گزارشات اندکی مبنی بر استفاده قوام باکتری از ترکیبات ارگانوفسفره هم به‌عنوان منبع کربن و هم به‌عنوان منبع فسفر منتشر شده است (23)، بنابراین می‌توان به ویژگی منحصر به‌فرد سویه جداسازی‌شده در این تحقیق اشاره کرد. همچنین در این رابطه می‌توان به قابلیت سوخت و ساز بالای باکتری‌های جنس *Bacillus* که در زیست‌پالایی آلاینده‌های محیطی از جمله خاک‌های آلوده به سموم آفت‌کش، فاضلاب‌های صنعتی و رسوبات آلوده مؤثر است، اشاره کرد (11). در این رابطه سروری زنجانی و همکاران (1387) با جداسازی ده سویه باکتریایی از پساب و خاک کشاورزی با قابلیت استفاده از دیازینون و کلروپیریفوز به‌عنوان منبع کربن و فسفر اعلام کردند که سویه باکتری منتخب از جنس پسودوموناس می‌تواند در حذف ترکیبات سمی و آلودگی از محیط مؤثر باشد (23). همچنین نتایج پژوهش نژاوند و همکاران (1391) نشان داد که آنزیم OPH ترشح‌شده از باکتری *Pseudomonas diminuta* می‌تواند به‌طور مؤثر سموم ارگانوفسفره نظیر پاراکسون را تجزیه کند. همچنین فعالیت و پایداری در pH و دماهای بالا و همچنین پایین بودن ثابت میکائیلیس آنزیم نسبت به انواع باکتریایی، آن را کاتالیزگر زیستی مناسبی برای کاربردهای زیست‌پالایی و تشخیصی می‌سازد (24).

Ortiz-Hernandez و Sanchez-Salinas (2010) با جداسازی 6 سویه باکتریایی از خاک اراضی کشاورزی در مکزیک اعلام کردند که سویه باکتری منتخب براساس نرخ هیدرولیز و تجزیه‌کنندگی آفت‌کش تتراکلروینفوس از قابلیت تجزیه‌زیستی و زیست‌پالایی خاک و آب آلوده به این آفت‌کش برخوردار است (18). از سایر مطالعات که به‌دلیل شناسایی و جداسازی سویه باکتری با قابلیت ترشح آنزیم‌های هیدرولیزکننده سموم شیمیایی از نمونه‌های حقیقی آلوده نتایج مشابهی به‌دنبال داشته است، می‌توان به پژوهش Singh (2009)، Zhang و همکاران (2009)، Pakala و همکاران (2006)، Singh و Walker (2006)، Yu و همکاران (2006)، Dong و همکاران (2005) و Zhang و همکاران (2005 ب) (31-25) اشاره کرد.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که باکتری شناسایی و استخراج‌شده با ترشح آنزیم ارگانوفسفوروس هیدرولاز از

قابلیت زیست‌پالایی سموم ارگانوفسفره به‌ویژه دیازینون خاک در مقیاس آزمایشگاهی برخوردار می‌باشد. ولی لازم است که قبل استفاده از میکروارگانیسم‌ها به‌منظور زیست‌پالایی آلاینده‌ها در محیط‌های طبیعی، مطالعات بیش‌تری بر روی ثبات و تعامل محیط زیستی در برابر تغییرات دما، رطوبت، تابش خورشید، pH و بارش، ایمنی، راهبردهای تولید، هزینه-فایده، عوامل مخرب محیطی، سم‌شناسی، پیراسنجه‌های ژنتیکی و بیوشیمیایی انجام شود.

References

1. Sobhanardakani S. [Formulation and production of biological fungicides and possibility of replacement of common pesticides (Persian)]. PhD Thesis, Faculty of Environment & Energy, Science and Research Branch, Islamic Azad University. 2007;12-5.
2. Casida JE, Quistad GB. [Organophosphate toxicology: safety aspects of nonacetylcholinesterase secondary targets]. Chem Res Toxicol. 2004;17(8):983-98.
3. Donarski WJ, Dumas DP, Heitmeyer DP, Lewis VE, Raushel FM. [Structure–activity relationships in the hydrolysis of substrates by the phosphotriesterase from Pseudomonas diminuta]. Biochem. 1989;28(11):4650-5.
4. Bird SB, Sutherland TD, Gresham C, Oakeshott J, Scott C, Eddleston M. [OpdA, a bacterial organophosphorus hydrolase, prevents lethality in rats after poisoning with highly toxic organophosphorus pesticides]. Toxicol. 2008;247(2-3):88-92.
5. Siddaramappa R, Rejaram KP, Sethunathan N. Degradation of parathion by bacteria isolated from flooded soil. Appl Microbiol. 1973;26(6):846-9.
6. Sethunathan N, Yoshida TA. A Flavobacterium sp. that degrades diazinon and parathion. Can J Microbiol. 1973;19(7):873-5.
7. Li X, Jiang J, Gu L, Waseem Ali Sh, He J, Li Sh. Diversity of chlorpyrifos-degrading bacteria isolated from chlorpyrifos-contaminated samples. Int Biodeter Biodegr. 2008;62:331-5.
8. Xu G, Zheng W, Li Y, Wang Sh, Zhang J, Yan Y. Biodegradation of chlorpyrifos and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by a newly isolated Paracoccus sp. strain TRP. Int Biodeter Biodegr. 2008;62:51-6.
9. Anwar S, Liaquat F, Khan QM, Khalid ZM, Iqbal S. Biodegradation of chlorpyrifos and its hydrolysis product 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by Bacillus pumilus strain C2A1. J Hazard Mater. 2009;168:400-5.
10. Cycoń M, Wojcik M, Piotrowska-Seget Z. Biodegradation of the organophosphorus insecticide diazinon by Serratia sp. and Pseudomonas sp. and their use in bioremediation of contaminated soil. Chemosphere. 2009;76:494-501.
11. Chen Sh, Yang L, Hu MY, Liu JJ. Biodegradation of fenvalerate and 3-phenoxybenzoic acid by a novel Stenotrophomonas sp. strain ZS-S-01 and its use in bioremediation of contaminated soils. Appl Microbiol Biotechnol. 2011a;90:755-67.
12. Chen Sh, Hu MY, Liu JJ, Zhong GH, Yang L, et al. [Biodegradation of beta-cypermethrin and 3-phenoxybenzoic acid by a novel Ochrobactrum lupini DG-S-01. J Hazard Mater. 2011b; 187:433-40.
13. Kulshrestha G, Kumari A. Fungal degradation of chlorpyrifos by Acremonium sp. strain (GFRC-1) isolated from a laboratory-enriched red agricultural soil. Biol Fert Soils. 2011;47: 219-25.
14. Theriot CM, Grunden AM. Hydrolysis of organophosphorus compounds by microbial enzymes. Appl Microbiol Biotechnol. 2011;89:35-43.
15. Gao Y, Chen Sh, Hu M, Hu Q, Luo J, Li Y. Purification and characterization of a novel Chlorpyrifos Hydrolase from Cladosporium cladosporioides Hu-01. PLoS ONE. 2012;7(6): e38137.
16. Zhang R. Cui Z, Jiang J, He J, Gu X, Li S. Diversity of organophosphorus pesticide-degrading bacteria in a polluted soil and conservation of their organophosphorus hydrolase genes. Can J Microbiol. 2005a;51(4):337-43.
17. Yang H, Carr PD, McLoughlin SY, Liu JW, Horne I, Qiu X, et al. Evolution of an orghanophosphate-degrading enzyme: a comparison of natural and directed evolution. Protein Engineering 2003; 16(2):135-45.
18. Ortiz-Hernandez ML, Sanchez-Salinas, E. [Biodegradation of the organophosphate pesticide tetrachlorvinphos by bacteria isolated from agricultural soils in Mexico. Rev Int Contam Ambient. 2010;26(1):27-38.
19. Gonçalves C1, Alpendurada MF. Assessment of pesticide contamination in soil samples from an intensive horticulture area, using ultrasonic extraction and gas chromatography-mass spectrometry. Talanta. 2005;65(5):1179-89.
20. Sambrook, J, Russell, DW. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001;1107-10.

21. Safari Foroshani N, Karami A, Pourali F, Aeidi A. [Simultaneous detection of Salmonella typhi, Bacillus antheracis, and Yersinea pestis by multiplex PCR (Persian)]. Journal of Zanjan University of Medical Sciences. 2013;21(85):93-107.
22. Kang DG, Lim GB, Cha HJ. Functional periplasmic secretion of organophosphorous hydrolase using the twin-arginine translocation pathway in Escherichia coli. J Biotechnol. 2005;118(4):379-85.
23. Sorouri Zanjani R, Mir-Esmaili SM, Latifi AM, ValiPour E. [Isolation and identification of a type strain bacteria with the highest ability to produce organophosphorus acid anhidrase (Persian)]. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences. 2009;18(68):19-26.
24. Najavand S, Sahebghadam Lotfi A, Mohsenifar A, Arjmand S, Mota A. [Expression and characterization of bacterial organophosphorus hydrolase in Pichia pastoris with the intent to degrade organophosphate neurotoxins (Persian)]. Modares Journal of Medical Sciences: Pathobiology. 2012;15(1):61-72.
25. Singh BK. [Organophosphorus-degrading bacteria: ecology and industrial applications]. Nat Rev Microbiol. 2009;7:156-64.
26. Zhang Y, Ning Z, Zhao J, Xinran P, Shuyan M, Miao H. Isolation of two atrazine-degrading strains and their degradation characteristics. Int J Agric Biol Eng. 2009;2(3):27-32.
27. Pakala SB, Gorla P, Pinjari AB, Krovidi RK, Baru R, Yanamandra M, et al. Biodegradation of methyl parathion and p-nitrophenol: evidence for the presence of a p-nitrophenol 2-hydroxylase in a Gram-negative Serratia sp. strain DS001] Appl Microbiol Biotechnol. 2007;73(6):1452-62.
28. Singh BK, Walker A. Microbial degradation of organophosphorus compounds. FEMS Microbiol Rev. 2006;30(3):428-71.
29. Yu YL, Fang H, Wang X, Wu XM, Shan M, Yu JQ. Characterization of a fungal strain capable of degrading chlorpyrifos and its use in detoxification of the insecticide on vegetables. Biodegr. 2006;17:487-94.
30. Dong YJ, Bartlam M, Sun L, Zhou, YF, Zhang, ZP, Zhang, CG, et al. Crystal structure of methyl parathion hydrolase from Pseudomonas sp. WBC-3. J Mol Biol. 2005;353(3):655-63.
31. Zhang XZ, Cui ZL, Hong Q, Li SP. High-level expression and secretion of methyl parathion hydrolase in Bacillus subtilis WB800. Appl Environ Microbiol. 2005b;71(7):4101-03.