Journal of Military Medicine
2019 ,Volume 21, Issue 5
Pages: 468-478

Organophosphate compounds and their biodegradation; using enzymes as an increased efficiency approach

Taleb Badri [1], Ali Mohammad Latifi [2], Kazem Hassanpour [3], Ramezan Ali Taheri [4], Morteza Mirzaei [2], Gholamreza Farnoosh [2*]

[1] *Neuroscience Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.*
[2] *Applied Biotechnology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
[3] *Medical School, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran*
[4] *Applied Biotechnology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

Received: 20 May 2019 **Accepted:** 15 June 2019

Abstract

Organophosphorus compounds are widely used in pesticides, insecticides in agriculture and as nervous chemical agents. These chemicals inhibit the acetylcholinesterase enzyme activity that is responsible for the nervous impulse in organisms. This effect leads to an increase in acetylcholine level and finally neuronal complications.

Many methods are used to degrade and decontaminate these compounds, such as: the use of chemicals, burial of toxins, burning and biodegradation. The chemical and physical methods are often toxic, allergic, corrosive and nonspecific and harmful for the environment and are not usable in war spaces. Biodegradation is an effective and safe method that is performed under controlled conditions for the decomposition of various constituents, including organophosphorus compounds, by biological agents. Biodegradation is performed using microbes to detoxify and decompose contaminants. These strains contain broad substrate-degrading enzymes.

Although the use of natural strains as vital catalysts is an interesting method for the treatment of organophosphorus compounds, the inability of organophosphorus compounds to cross the membrane width reduces the total catalytic power, so the use of recombinant enzymes for the decomposition of organophosphorus compounds can be of great help in removing contaminants, especially in war environments. Many enzymes have been identified and used for this purpose, but most notably include: Diisopropyl-fluorophosphatase (DFPasae), Organophosphorus acid anhydrolase (OPAA) and Organophosphorus Hydrolase (OPH).

In this review, in addition to describing the organophosphorus compounds and their effects, biodegradation especially by use of enzymes was considered. The understanding and mastering of this knowledge could help researchers in the use of chemical degrading enzymes, especially organophosphates, in spray and enzymatic ointments in military environments.

Keywords: Biodegradation, Acetylcholinesterase, Organophosphorus Compounds, Nervous Chemical Agents, Degradation Enzymes.

*Corresponding author: **Gholamreza Farnoosh**, Email: rzfarnoosh@yahoo.com

مجله طب نظامی
دوره ۲۱، شماره ۵، آذر و دی ۱۳۹۸
صفحات: ۴۷۸-۴۶۸

ترکیبات ارگانوفسفره و تجزیه زیستی آنها؛ استفاده از آنزیم‌ها با رویکرد افزایش کارایی

طالب بدری[۱]، علی محمد لطیفی[۲]، کاظم حسن پور[۳]، رمضانعلی طاهری[۴]، مرتضی میرزایی[۲]، غلامرضا فرنوش[۲]*

[۱] مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)، تهران، ایران
[۲] مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)، تهران، ایران
[۳] دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار، ایران
[۴] مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)، تهران، ایران

چکیده

ترکیبات ارگانوفسفره به عنوان آفت‌کش و حشره‌کش در کشاورزی و همچنین عوامل شیمیایی اعصاب مورد استفاده قرار می‌گیرند. این ترکیبات باعث مهار آنزیم استیل‌کولین‌استراز که مسئول تجزیه استیل‌کولین در سیستم عصبی بوده، می‌شود. نتیجه این عمل افزایش استیل‌کولین و نهایتاً ایجاد مشکلاتی در سلولهای عصبی را در پی دارد. روش‌های زیادی جهت تجزیه ترکیبات مذکور استفاده می‌شود. این روشها شامل: استفاده از مواد شیمیایی، دفن سموم، سوزاندن و تجزیه زیستی آنها هستند. روش‌های شیمیایی و فیزیکی اغلب سمی، حساسیت‌زا، خورنده و غیراختصاصی بوده و به محیط زیست آسیب رسانده و کارایی لازم در محیط‌های جنگی را ندارند. تجزیه زیستی روشی موثر و بی خطر است که تحت شرایط کنترل شده تجزیه ترکیبات مختلف از جمله ترکیبات ارگانوفسفره توسط عوامل زیستی انجام می‌شود. تجزیه زیستی با استفاده از میکروب‌ها به منظور سم‌زدایی و تجزیه‌ی آلودگی انجام می‌گیرد. این سوش‌ها دارای آنزیم‌های تجزیه کننده با دامنه سوبسترای وسیع می‌باشند.

اگرچه استفاده از سوش‌های طبیعی به عنوان کاتالیزکننده‌های حیاتی روش جالبی برای تیمار ترکیبات ارگانوفسفره است اما عدم توانایی ترکیبات ارگانوفسفره در عبور از عرض غشاء، قدرت کاتالیتیکی کل را کاهش می‌دهد، لذا استفاده از آنزیم‌های نوترکیب جهت تجزیه ترکیبات ارگانوفسفره می‌تواند کمک شایانی در رفع آلودگی‌ها بخصوص در محیط‌های جنگی نماید. تعداد زیادی از آنزیمها قادر به تجزیه این ترکیبات می‌باشند اما مهمترین آنها سه آنزیم Organophosphorus Hydrolase (OPH)، Organophosphorus acid anhydrolase(OPAA) و Diisopropyl-fluorophosphatase (DFPasae) هستند.

در این مطالعه مروری ضمن بررسی مطالعات انجام شده، علاوه بر توصیف ترکیبات ارگانوفسفره و اثرات آن، تجزیه زیستی بویژه استفاده از آنزیم‌ها مورد توجه و بررسی قرار گرفت. تسلط دانشی بر این موضوع می‌تواند محققین رو در استفاده از آنزیم‌های تجزیه کننده ترکیبات شیمیایی بخصوص ارگانوفسفره بصورت اسپری و پماد آنزیمی در محیط‌های نظامی کمک نماید.

کلیدواژه‌ها: تجزیه زیستی، استیل کولین استراز، ترکیبات ارگانوفسفره، عوامل اعصاب، آنزیم‌های تجزیه کننده.

*نویسنده مسئول: **غلامرضا فرنوش**. پست الکترونیک: rzfarnoosh@yahoo.com
دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۰۲/۳۰ پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۰۶/۰۸

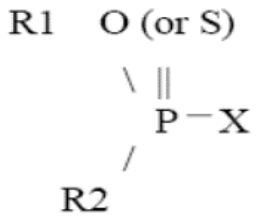
مقدمه

ترکیبات ارگانوفسفره و استفاده آنها

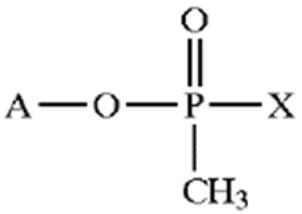
ترکیبات ارگانوفسفات نام عمومی استرهای اسید فسفریک (شکل-۱) و پایه بسیاری از آفت کش‌ها و عوامل مخرب عصبی می‌باشد. این ترکیبات به منظور حفاظت از محصولات کشاورزی و دام‌ها استفاده شده و حدود ۳۴٪ از حشره‌کش‌های متداول در سطح جهان را شامل می‌شوند. دانشمند آلمانی به نام Gerhard Schrader در اواخر دهه ۱۹۳۰ به طور تصادفی اولین ترکیب ارگانوفسفره مخرب عصبی به نام تابون را کشف کرد (۳-۱).

وی در آزمایشات اولیه خود مشاهده کرد که تنها ۵ppm از تابون برای کشتن همه شپش‌های روی برگ گیاه کافی است. این ماده به وزارت جنگ آلمان فرستاده و از آن در ساخت سلاح‌های شیمیایی استفاده شد (۴). تعدادی از ترکیبات ارگانوفسفره اولیه بسیار سمی بوده و توسط نازی‌ها به اولین سلاح‌های شیمیایی و عوامل عصبی تبدیل شدند. عوامل عصبی جنگی شامل انواع G-Type و V-Tpye و ساختار کلی یکسانی دارند. شکل-۲ ساختار کلی عوامل عصبی ارگانوفسفره را نشان می‌دهد. در هر دو دسته، A یک گروه آلکیل، X در G-Type فلورین و در V-Type یک گروه مرکاپتان می‌باشد (۵).

O-ethyl S-(2-diisopropylaminoethyl) methylphosphonothioate (VX) و O-isobutyl S-(2-diethylamino) methylphosphonothioate(RVX) به عنوان عوامل V شناخته شده‌اند که از عوامل G بسیار سمی‌تر می‌باشند (۱). در شکل-۳ ساختار این عوامل شیمیایی نشان داده شده است (۶).



شکل-۱. ساختار کلی ترکیبات ارگانوفسفره (۱)



شکل-۲. ساختار کلی عوامل مخرب عصبی (۱)

استفاده ترکیبات ارگانوفسفره در جنگ‌ها

کشورهایی چون آلمان، آمریکا، انگلستان، روسیه، مصر، لیبی، کره شمالی، سوریه و عراق از جمله کشورهایی بودند که بعدها عوامل عصبی ارگانوفسفره بوسیله‌ی آنها ساخته شد. صدام حسین رئیس جمهور عراق اولین فردی بود که عوامل عصبی ارگانوفسفره را علیه مردم خودش در سال ۱۹۸۸ استفاده نمود، و از سارین علیه مردم کردنشین شمال عراق استفاده کرد. در سال ۱۹۹۴ و ۱۹۹۵ نیز استفاده از سارین بوسیله‌ی یک گروه تروریستی در توکیو باعث کشته شدن ۱۹ نفر شد. در سالهای اخیر عوامل عصبی ارگانوفسفره به عنوان خطر امنیتی، بسیار مورد توجه می‌باشند (۱). انباشته‌های جنگ آورهای شیمیایی ارگانوفسفره در آمریکا ۲/۵×۱۰۴ و در شوروی ۴×۱۰۴ تن تخمین زده شده است (۷).

مکانیسم اثر ترکیبات ارگانوفسفره

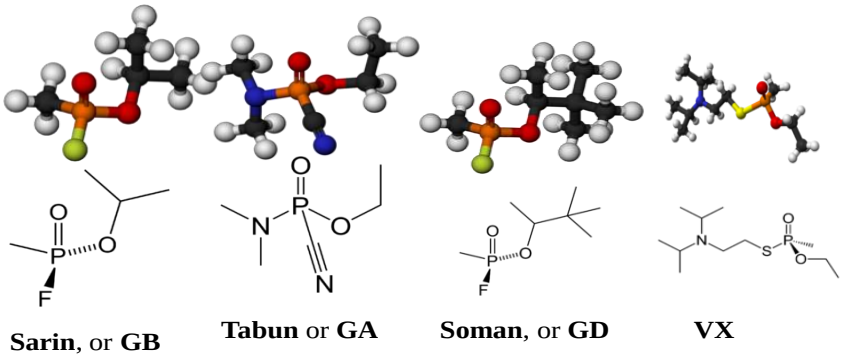
آنزیم هدف ترکیبات ارگانوفسفره استیل کولین استراز می‌باشد. این ترکیبات با فسفریله کردن جایگاه فعال آنزیم باعث غیر فعال شدن آن و نهایتاً جمع شدن استیل کولین در سیستم عصبی می‌شوند که این امر منجر به مشکلاتی در سیستم عصبی فرد می‌شود. مکانسیم غیرفعال شدن استیل‌کولین‌استراز در شکل-۴ نشان داده شده است (۸). اولین مسیر سمیت با عوامل اعصاب VX و RVX جذب پوستی است چرا که فراریت این دسته از گازها به ترتیب ۱۰/۵ mg/m^3 و ۸/۳ mg/m^3 بوده که نسبت به گازهای دسته G کم است. در نتیجه از طریق مسیر زیر پوستی مانند مایع عمل می‌کنند و بعد از جذب پوستی به راحتی به سرم رگهای خونی می‌رسند. گازهای شیمیایی دسته G فراریت بسیار بالایی دارند مانند سارین که ۲۲/۰۰۰ mg/m^3 فراریت دارد و در نتیجه از راه تنفس عمل کرده و به سد خونی مغزی می‌رسد و مولکول هدف خود را مهار می‌کند (۱) (جدول-۱).

تظاهرات بالینی و نحوه تشخیص مسمومیت با ترکیبات ارگانوفسفره

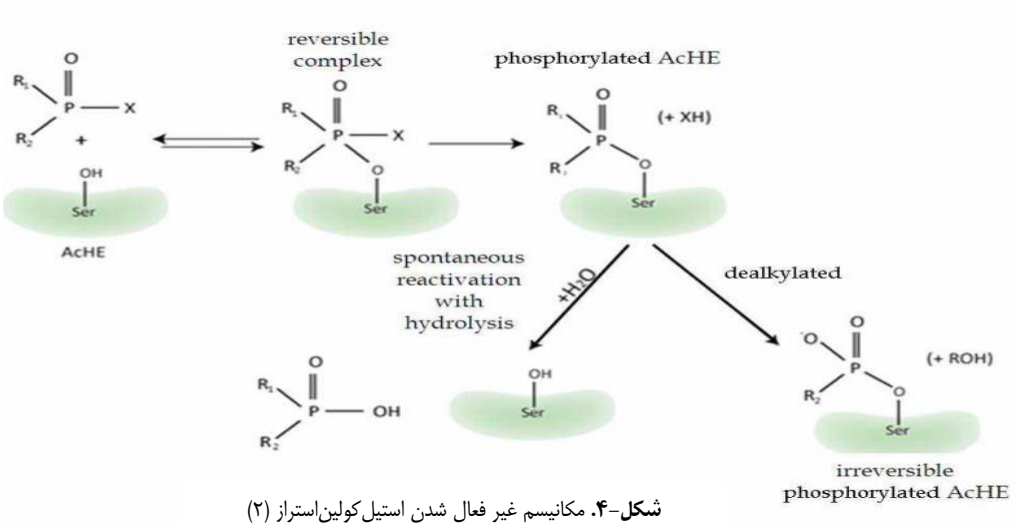
علائم مسمومیت با ترکیبات ارگانوفسفره می‌تواند قابل برگشت باشد. معمولا علائم مسمومیت با ترکیبات مذکور در مدت زمان ۱۲-۴ ساعت اول بعد از آلودگی ظاهر می‌شوند ولی تابلوی کامل مسمومیت تا ۲۴ ساعت به طول می‌انجامد. مسمومیت به ترکیبات ارگانوفسفره منجر به علائمی‌چون فشار خون بسیار پایین، کندی قلب، تجمع مایع نای که در نتیجه ناتوانی عضله‌های تنفسی است، ناتوانی مرکز تنفسی و کبودی در مقدار کشنده ارگانوفسفره مشاهده می‌شود.

جدول-۱. خواص فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیک عوامل اعصاب

عامل اعصاب	سال ساخت	فشار بخار (mmHg)	Volatility (mg m^{-3})	حلالیت در آب (g L^{-1})	دوز کشنده	
					تنفسی (mg individual^{-1})	پوستی (mg min^{-1}m^{-3})
Tabun (GA)	۱۹۳۶	۰/۰۷	۶۰۰	۹۸	۱۵۰-۴۰۰	۱۰۰۰-۱۷۰۰
Sarin (GB)	۱۹۳۸	۲/۹	۱۷۰۰۰	۰۰	۷۵-۱۰۰	۱۰۰۰-۱۷۰۰
Soman (GD)	۱۹۴۴	۰/۳	۳۹۰۰	۲۱	۳۵-۵۰	۵۰-۱۰۰
VX	۱۹۵۲	۰/۰۰۰۷	۱۰	۳۰	۱۰	۶-۱۰



شکل-۳. ساختار شیمیایی و مولکولی عوامل اعصاب مشتق از ترکیبات ارگانوفسفره (۱)



شکل-۴. مکانیسم غیر فعال شدن استیل‌کولین‌استراز (۲)

در مسمومیت با دوز کمتر، کندی قلب، سفتی عضله، تنگی نفس روی می‌دهد در مصدومین آلوده با دوزهای بالا که نسبت به بستن ماسک و پوشیدن لباس‌های محافظتی اقدام نکرده اند، می تواند علایم شدیدی همراه با نارسایی تنفسی ایجاد نموده و امکان امداد رسانی سریع را محدود نماید. مسیرهای تنفس، خوردن، جذب از طریق پوست و چشم از جمله راه‌هایی هستند که مهار کننده‌های استیل‌کولین‌استراز می‌توانند انسان را آلوده سازند. سالانه در جهان حدود ۳ میلیون مورد مسمومیت با سموم ارگانوفسفره تخمین زده می‌شود که از این تعداد نزدیک به ۳۰۰۰۰۰ نفر دچار مرگ یا صدمات جدی می‌شوند (۷).

جهت تشخیص مسمومیت با ترکیبات ارگانوفسفره معمولا سه علامت بزاق فراوان و اشک، ضعف (weakness) و مردمک‌های میوز مشهود است. بهترین راه تشخیص، شرح حال و معاینه بیمار بوده که ممکن است دچار میوز، افزایش ترشحات راه هوایی، ریزش اشک، برادیکاردی، مشکلات گوارشی و برخواستن بوی سیر از دهان باشد. ضمناً برای تشخیص بیماری می‌توان از روش‌های

آزمایشگاهی مانند سنجش آنزیم کولین استراز سرم یا گلبول‌های قرمز استفاده کرد که در مسمومیت با ترکیبات مذکور کاهش می‌یابد. کاهش بالای ۲۵٪ سطح آنزیم فوق در گلبول‌های قرمز یک شاخص مهم مسمومیت با ارگانوفسفره می‌باشد (۹, ۱۰).

روش‌های رفع آلودگی ترکیبات ارگانوفسفره

به دلیل رها شدن ناگهانی یا مدیریت ضعیف پسماند آفت‌کش‌ها، آلودگی خاک و آب‌های زیرزمینی در منطقه ایجاد می‌شود (۱۱). بنابراین، نیاز مهمی در تکامل فن‌آوری تصفیه زیستی به منظور تسهیل تجزیه آلودگی‌های ارگانوفسفره احساس می‌شود (۱۲). از طرفی ضرورت استفاده از روشهای مناسب، بی خطر و سریع جهت رفع آلودگی‌ها در محیط‌های جنگی که در آن از ترکیبات ارگانوفسفره در قالب عوامل اعصاب استفاده می‌شود از ضروری ترین اقدامات است. روش‌های زیر از جمله روشهای معمول در تجزیه و رفع آلودگی ترکیبات ارگانوفسفره می‌باشد:

الف –روش‌های معمول دفع ترکیبات ارگانوفسفره (بویژه در محیط‌های جنگی)

۱. استفاده از مواد شیمیایی: این روش اگرچه امکان پذیر می‌باشند اما تولید حجم زیاد اسید و آلکیل، دفع آنها را مشکل می‌کند (۱۳). از جمله تیمارهای شیمیایی رایج هیدرولیز، پرتوافکنی با اوزون و فوتولیز می‌باشد (۱۴).

۲. دفن سموم: این روش اگرچه روشی نسبتا خوب است اما فروشست ترکیبات ارگانوفسفره درون خاک و آب‌های زیرزمینی نیز خود می‌تواند عامل آلودگی‌های بیشتری شود (۷).

۳. سوزاندن: سوزاندن روش مطمئن‌تری برای تخریب این ترکیبات است اما به دلیل انتشار بالقوه سم و محدودیت‌های اقتصادی روش مناسبی نیست (۱۵). با این وجود برای حذف مواد آلی کلر دار، فلزات سنگین و جنگ آورهای شیمیایی عمل نکرده از این روش استفاده می‌شود (۷).

روش‌های رایج فوق، به دلیل خطر در معرض قرارگیری سم، محدودیت‌های اقتصادی و عدم کارایی مناسب آنها در محیط‌های نظامی، استفاده آنها بسار محدود گشته است (۱۵). به همین دلیل یک روش قابل اعتماد و قابل جایگزین برای سم زدایی و رفع آلودگی این ترکیبات بویژه در هنگام آلودگی با عوامل اعصاب در محیط‌های جنگی، لازم است. با توجه به محدودیت‌ها و معایب روش‌های فوق، استفاده از روش‌های تجزیه زیستی جایگزین قابل قبول‌تری به نظر می‌آید (۷).

ب- تجزیه زیستی ترکیبات ارگانوفسفره

بیشتر روش‌های شیمیایی و فیزیکی از قبیل استفاده از حرارت، سوپراکسیداز، دی‌اکسیدکربن و غیره که برای رفع آلودگی ناشی از ترکیبات ارگانوفسفره به کار می‌روند، نقایص و مشکلات زیادی دارند، زیرا این روش‌ها اغلب سمی، حساسیت‌زا، خورنده و غیراختصاصی بوده و به محیط زیست آسیب رسانده و کارایی لازم در محیط‌های جنگی را ندارند. بنابراین برای هیدرولیز ترکیبات سمی یک فن آوری سالم و بی خطر نیاز است. تجزیه زیستی روشی موثر و بی خطر است که تحت شرایط کنترل شده تجزیه ترکیبات مختلف از جمله ترکیبات ارگانوفسفره توسط عوامل زیستی انجام می‌شود. درطی این فرآیند نمونه به سطحی بی‌ضررتر یا به غلظتی کمتر تبدیل می‌شود. تجزیه زیستی با استفاده از میکروب‌ها به منظور سم‌زدایی و تجزیه‌ی آلودگی انجام می‌گیرد و به عنوان روشی موثر در بیوتکنولوژی به منظور پاک سازی محیط آلوده مورد توجه سوش‌های باکتریایی متعلق به گروه‌های تاکسونومی‌مختلف، توانایی تجزیه دامنه وسیعی از ارگانوفسفره را دارند (۱۶). این سوش‌ها دارای آنزیم‌های تجزیه کننده با دامنه سوبسترای وسیع می‌باشند (۱۷).

محصولات هیدرولیز شده ۴-۳ مرتبه سمیت کمتری دارند و با ادامه دادن پروسه‌های زیستی یا غیر زیستی می‌توان به طور کامل ارگانوفسفره‌ها را معدنی کرد یا به ترکیبات واقعاً غیرسمی تبدیل نمود (۱۸).

برخی ترکیبات سمی به صورت ناقص تجزیه می‌شوند و مسیر تجزیه برای آنها تکامل نیافته است. تجزیه زیستی کامل، اغلب نیازمند یک مجموعه از ارگانیسم‌ها می‌باشد چرا که یک گونه خاص از ارگانیسم‌ها معمولا قادر به متابولیسم همه محصولات حاصل از واکنش زیستی اولیه نیست (۷). استفاده از میکرو ارگانیسم‌ها در رفع آلودگی ترکیبات ارگانو فسفره یک شیوه با ارزش و موثر می‌باشد. همانطور که در جدول-۲ آمده تعدادی از میکروارگانیسم‌ها قادر به تجزیه ترکیبات ارگانوفسفره می‌باشند (۷, ۱۹). جداسازی میکروارگانیسم‌های تجزیه کنندگان به سه دلیل مهم است (۱۹):

۱- برای تعیین مکانیسم داخلی متابولیسم میکروبی

۲- برای فهم مکانیسم ژن/ آنزیم

۳- جهت استفاده سم زدایی و رفع آلودگی

در این روش با استفاده از سوشهای باکتریایی و همچنین آنزیم‌های تخلیص شده از آنها، تجزیه ترکیبات ارگانوفسفره انجام می‌شود.

روش‌های نوین بر پایه استفاده از آنزیم با رویکرد افزایش کارایی

این روش تجزیه از آن جهت قابل توجه است که سازگار با محیط زیست بوده و سم زدایی در محل روی می‌دهد. سرعت تجزیه آنزیمی به کمک این دسته از باکتری‌ها سریع‌تر از هیدرولیز شیمیایی است. همانطور که در جدول-۳ آمده تعدادی از آنزیم‌های جدا شده از میکروارگانیسم‌ها شناسایی شده‌اند که قابلیت تجزیه ترکیبات ارگانوفسفره را دارند (۷, ۱۹)

جدول-۲. میکروارگانیسم‌های جداشده با قابلیت تجزیه ترکیبات ارگانوفسفره (۱۹)

ترکیبات ارگانوفسفره	میکروارگانیسم‌ها
Chlorpyrifos	Bacteria Enterobacter sp. Flavobacterium sp. ATCC27551 Pseudomonas diminuta Micrococcus sp. Fungi Phanerochaete chrysosporium Hypholama fascicularae ND Coriolus versicolor ND Aspergillus sp. Trichoderma harzianum Pencillium brevicompactum
Parathion	Flavobacteriumsp. ATCC27551 Pseudomonas diminuta Pseudomonas stutzeri Arthrobacter spp. Agrobacterium radiobacter Bacillusspp.) Pseudomonas sp. Pseudomonas spp. Arthrobacter sp. Xanthomonassp.
Methyl parathion	Pseudomonas sp. Bacillussp. Plesimonas sp M6 Pseudomonas putida Pseudomonass p. A3 Pseudomonass p. WBC Flavobacterium balustinum
Glyphosate	Bacteria Pseudomonass sp. Alcaligene sp. Bacillus megaterium2BLW Rhizobiumsp. Agrobacterium sp. Arthrobactersp. GLP Arthrobacter atrocyaneus Geobacillus caldoxylosilyticusT20 Flavobacterium sp. Fungi Penicillium citrium Pencillium natatum Penicillium chrysogenum Trichoderma viridae Scopulariopsis spand Aspergillus niger Alternaria alternata
Coumaphos	Nocardiodes simplexNRRL B24074 Agrobacterium radiobacterP230 Pseudomonas monteilli Flavobacteriumsp. Pseudomonas diminuta Nocardiastrain B-1
Monocrotophos	Pseudomonasspp Bacillusspp. Arthrobacterspp. Pseudomonas mendocina Bacillus megaterium Arthrobacter atrocyaneus Pseudomonas aeruginosaF10B Clavibacter michiganenseSBL11
Fenitrothion	Flavobacteriumsp. Arthrobacter aurescenesTW17 Burkholderiasp. NF100
Diazinon	Flavobacterium sp. Pseudomonas spp. Arthrobacter spp.
Chemical warfare agents G Agent	Pseudomonas diminuta Altermonas spp.
Chemical warfare agents V Agent	Pseudomonas diminuta Pleurotus ostreatus (fungus)

جدول-۳. آنزیم‌های میکروبی تجزیه کننده ترکیبات ارگانوفسفره (۱۹)

آنزیم	منبع (باکتری/قارچ)	وزن مولکولی	ساختار	پیوند شکسته شده			
				P–O	P–F	P–S	P–C
OPH	*Pseudomonas diminuta*	۷۲	دایمر	+	+	+	+
OPAA	*Alteromonas* spp	۶۰–۵۰	مونومر	+	+	–	+
OPDA	*A. radiobacter*	۷۰	دایمر	+	+	+	+
ADPase	*Nocardia* sp	۴۳	مونومر	+	تعیین نشده	تعیین نشده	–
AMPP	*Escherichia coli*	۵۲	تترامر	+	تعیین نشده	تعیین نشده	تعیین نشده
HOCA	*Pseudomonas monteilli*	۱۹	مونومر	+	تعیین نشده	–	تعیین نشده
SC-OPH	SC strain	۶۷	تترامر	+	تعیین نشده	تعیین نشده	–
NS-OPH	*Nocardiodes simplex*	۴۵	مونومر	+	تعیین نشده	تعیین نشده	تعیین نشده
PEH	*Burkholderia caryophilli*	۵۸	تترامر	–	–	–	+
C–P lyase	*Pseudomonas* spp.	۲۰۰	تعیین نشده	–	–	–	+
Phosphonatase	*Bacillus cereus*	۳۷	دایمر	–	–	–	+
A-OPH	*Aspergillus niger*	۶۷	مونومر	–	تعیین نشده	+	تعیین نشده
P-OPH	*Penicillium lilacinum*	۶۰	مونومر	+	تعیین نشده	+	تعیین نشده
Laccase	*Pleurotus ostreatus*	تعیین نشده	تعیین نشده	–	–	+	تعیین نشده

باکتری‌ها و قارچ‌ها بطور طبیعی قادر به تجزیه ترکیبات ارگانوفسفره هستند اما عدم توانایی این ترکیبات در عبور از عرض غشاء، میزان تجزیه آنها را کاهش می‌دهد. استفاده از آنزیم‌های نوترکیب جهت تجزیه ترکیبات، بویژه ترکیبات ارگانوفسفره می‌تواند کمک شایانی در رفع آلودگی‌ها بخصوص در محیط‌های جنگی نماید. با توجه به تنوع در ساختار و عملکرد ترکیبات ارگانوفسفره و همچنین تفاوت در تجزیه آنها توسط آنزیم‌های مختلف، شناخت آنزیم‌ها و عملکرد آنان در مواجهه با سوبسترا و همچنین مقایسه آنان، ضروری به نظر می‌رسد (۲۰،۲۱).

در اواخر دهه ۸۰ ارتش آمریکا به منظور دفع ترکیبات ارگانوفسفره برنامه‌ایی به نام ACES به راه انداخت که در آن از آنزیم‌های تجزیه کننده عوامل جنگی میکروبی و شیمیایی استفاده می‌شد. طبق این برنامه سه آنزیم سم زدا انتخاب شدند؛ DFPasae، OPH، OPAA. برای هر سه آنزیم، ژن‌ها کلون شده و توالی یابی شده‌اند (۴). البته بعدها چندین نوع از آنزیم‌های تجزیه کننده ترکیبات ارگانوفسفات مورد شناسایی قرار گرفت که در زیر به آنها اشاره شده است.

ارگانوفسفروس اسید انهیدرولاز/ Organophosphorus Hydrolase **(OPAA)**:

OPAA در سال ۱۹۴۶ به عنوان یک آنزیم هیدرولیزکننده Diisopropylfluorophosphate (DFP) توسط Abraham Mazur در آنزیم بافت خرگوشی شناسایی شد و سپس از باکتری *Alteromonas species strain JD6. 5. 19* خالص گردید. فعالیت بالای OPAA در هیدرولیز باند P-F در DFP، sarin و soman تائید شده است اما توانایی این آنزیم در هیدرولیز P-O و P-CN کم بوده و توانایی در هیدرولیز P-S ندارد. OPAA به دست آمده از *Alteromonas sp* پاراگزون را با ۲٪ سرعت DFP هیدرولیز می‌کند. در واقع OPAA بر پیوندهای فسفروس انهیدرات موجود در ترکیبات ارگانوفسفره (مانند عوامل عصبی) عمل می‌کند و مانند OPH برای عملکرد نیازمند یون‌های فلزی دو ظرفیتی بوده و در حضور دام‌اندازهای یونی نیز مهار می‌شود (۲۲).

اتحادیه بین المللی بیوشیمی‌در سال ۱۹۹۲ آنزیم‌هایی که قادر به تجزیه پیوندهای P-F یا P-CN موجود در ترکیبات ارگانوفسفره باشند را OPAA نامید (۴).

OPAA انواعی از ترکیبات ارگانوفسفره به ویژه ترکیبات G-type که حاوی فلور هستند را تجزیه می‌کند. OPAA بهترین فعالیت را علیه گازهای جنگی G-type دارد در حالی که فعالیتش علیه آفت‌کش‌ها، بسیار کم بوده و حتی فعالیتی علیه عوامل جنگی V-type ندارد (۲۲). این آنزیم هم‌هالوفیلیک و هم ترموفیلیک است که این دو ویژگی برای رفع آلودگی بسیار مهم است. این پروتئین یک پلی پپتید تک رشته متشکل از ۵۱۷ آمینو اسید با وزن مولکولی ۵۸ kDa است که در دامنه وسیعی از (۹/۵–۶/۵) pH و دما (۶۵–۱۰ ^{o}C) فعال می‌باشد (۲۳).

دی ایزوپروپیل فلئوروفسفاتاز/ Diisopropyl-fluorophosphatase **(DFPase)**:

DFPase در سال ۱۹۶۶ بوسیله Francis Hoski شناسایی شد. این آنزیم تنها در سرپایان دیده شده است و برای عملکرد خود نیازمند یون کلسیم می‌باشد. سوبسترای اصلی آنزیم DFP است و

در حضور آب، diisopropyl phosphate و fluoride تولید می‌کند (۲۲).

DFPase یک پروتئین ۳۵ kDa با ۳۱۴ زیر واحد اسیدآمینه است که قادر به برش پیوند P-F در Fluorophosphate می‌باشد. DFPase از عقده‌ها و مغز ماهی مرکب squid Loligo vulgaris به دست آمده و سوبسترای پیشنهادی‌اش DFP می‌باشد. این آنزیم قادر به هیدرولیز soman و sarin با ۱۰/۱ سرعت هیدرولیز DFP است. فعالیت هیدرولیزی DFPase برای پاراگزون در مقایسه با سوبسترای P-F بسیار کم است. مقایسه توانایی این سه آنزیم در تجزیه پیوندها در جدول-۴ مشاهده می‌شود (۲۴).

جدول-۴. مقایسه فعالیت آنزیم‌های OPH، OPAA و DFPase علیه سوبستراهای مختلف (۲۵, ۲۶).

فعالیت	منبع	آنزیم
DFP>GF=GB>GD>GA	Squid (Loligo vulgaris)	DFPase
GD>GF=DFP>GB>GA	Bacteria (P. diminuta and Flavobacterium)	OPH
DFP>GF=GB>GD>VX	Bacteria (Alteromonas sp.)	OPAA

آمینوپپتیداز/Aminopeptidase (PepP):

PepP یک متالوپروتئین موجود در *E. coli* است که برای عملکرد نیازمند دو یون Mn^{2+} می‌باشد. بیشترین سرعت تجزیه این آنزیم زمانی مشاهده شده است که سوبسترای آن شامل گروه متیل‌ایزوپروپیل و متیل‌ایزوبوتیل بوده است (۲۷).

فسفوتری استراز مشابه لاکتوناز/ phosphotriesterase-like lactonase (PLL):

این آنزیم جدیدا از باکتری *Geobacillus stearothermophilus strain 10* جدا و شناسایی شده است. این آنزیم از خانواده آمیدوهیدرولاز بوده و قادر به تجزیه ترکیبات ارگانوفسفات و لاکتون می‌باشد. یک فرضیه مطرح شده که آنزیم OPH از آنزیم لاکتوناز منشا گرفته‌اند. عوامل مختلفی شامل واکنش‌های بین پروتئینی، دارا بودن سطح آب گریز، پایداری ساختار ثانویه و ترکیب اسیدهای آمینه در پایداری دمایی این آنزیم نقش دارند (۲۸).

فسفوتری استراز/ Paraoxonase 1 (PON1):

PON1، Aryldialkylphosphatase یا Aromatic esterase از خانواده PON است که شامل زیر گروه‌های PON1، PON2، PON3 می‌باشد. توالی‌های PON2 و PON3 با PON1 ۶۰٪ شباهت دارند اما هیچ فعالیت پاراکسونازی از خود نشان نمی‌دهند. PON1 آنزیم پستانداران است که مسئول هیدرولیز بخش تیوآت اکسیده تولید شده بوسیله سیستم P450 بوده و قادر به هیدرولیز P-O، P-F و P-CN نیز می‌باشد. این فعالیت ابتدا در سلول‌های خونی و پلاسمای خرگوش، انسان و میمون مشاهده شد (۲۸). با وجود توانایی آنزیم‌های تجزیه کننده ترکیبات ارگانوفسفره، هنوز موانعی بر راه کاربردی کردن این آنزیم‌ها وجود دارد. از جمله مشکلات ناپایداری آنزیم در شرایط ناگوار است. برای مثال آنزیم به راحتی فعالیت خود را در حضور حلال‌های آلی، دمای بالا یا نگهداری دراز مدت از دست می‌دهد (۴).

ارگانوفسفروس‌هیدرولاز/ Organophosphorus Hydrolase (OPH):

شناخته‌شده‌ترین هیدرولاز ترکیبات ارگانوفسفره که در باکتری خاکی *Flavobacterium ATCC 75512* و *P. diminuta* می‌باشد، OPH نام گرفت. فسفوتری‌استراز PTE نام دیگر این آنزیم می باشد. سوبسترای طبیعی آنزیم ارگانوفسفروس‌هیدرولاز شناخته شده نیست. این آنزیم یک هومودایمر با وزن مولکولی ۷۲kDa است (۲۴, ۲۹).

OPH قادر به هیدرولیز پیوند فسفوتری استر P-O در پاراگزون، پیوند فسفونوفلوراید (P-F) در DFP، sarin وsoman، پیوند فسفروتیوآت (P-S) در VX و پیوند فسفروآمیدوسیآنید (P-CN) در تابون می‌باشد. سرعت تجزیه سوبسترای پیشنهادی OPH (پاراگزون) بالا است، در صورتی که هیدرولیز باندهای P-S و P-F با سرعت کم روی می‌دهد. OPH تنها آنزیم شناخته شده هم برای تجزیه پاراگزون و هم عوامل جنگی V-type می‌باشد. البته فعالیتش بر V-type کمتر است (۲۴).

ارگانوفسفوروس هیدرولاز/ Organophosphorus Hydrolase C2 (OPHC2):

آنزیم OPHC2 اولین بار از باکتری *Pseudomonas pseudoalcaligenes C2-1* جدا شده و دارای بالاترین فعالیت برعلیه متیل پاراتیون می‌باشد. مقایسه توالی اسیدهای آمینه این آنزیم با آنزیم جدا شده از باکتریهای *Pseudomonas diminuta* و *Flavobacterium sp. strain ATCC 27551* ۵۷/۹ درصد مشابهت را نشان می‌دهد. این آنزیم با داشتن یک پل دی سولفید مقاومت دمایی بالایی را از خود نشان می‌دهد بطوریکه ۸۰ درصد فعالیت این آنزیم بعد از انکوباسیون در دمای C^{o} ۶۰ برای ۳۰ دقیقه

حفظ می‌شود؛ البته قدرت تجزیه ترکیبات ارگانوفسفات توسط این آنزیم در مقایسه با OPH پایین می‌باشد (۳۰).

متیل پاراتیون هیدرولاز/ Methyl parathion P230 hydrolase (MPH):

این آنزیم از باکتری *Agrobacterium radiobacter P230* جدا شده و قادر به تجزیه طیف وسیعی از ارگانوفسفات‌ها می‌باشد. نام ژن این آنزیم opdA بوده و با آنزیم جدا شده از باکتریهای *Pseudomonas diminuta* و *Flavobacterium sp. strain ATCC 27551* دارای شباهت می‌باشد. قدرت تجزیه فاسمیت و فنتیون بوسیله این آنزیم بیشتر از دیگر نمونه‌های آنزیمی مشابه می‌باشد(۳۱).

متیل پاراتیون هیدرولاز Methyl parathion hydrolase M231/ (MPH):

این آنزیم ۳۳ کیلودالتونی از باکتری *Bacterium Ochrobactrum sp. M231* موجود در خاک جدا شده است. قدرت تجزیه ترکیبات ارگانوفسفات توسط این آنزیم پایین می‌باشد؛ ضمن اینکه این آنزیم دارای مقاومت دمایی پایین تری در مقایسه با دیگر آنزیم‌ها بوده و به سادگی در دماهای بالا غیرفعال می‌شود (۳۲).

اورگانوفسفوروس هیدرولاز *Deinococcus radiodurans*/Dr Organophosphorus Hydrolase (Dr-OPH):

این آنزیم از باکتری حرارت دوست *Deinococcus radiodurans* جدا شده و دارای ۴۸ درصد شباهت با OPH می‌باشد؛ ضمن اینکه دارای فعالیت پایین‌تری در مقایسه با آنزیم OPH می‌باشد. دو یون فلزی در مرکز آنزیم با چهار هیستیدین واکنش برقرار کرده است (۳۳).

اگرچه استفاده از این آنزیم‌های طبیعی به عنوان کاتالیزکننده‌های حیاتی روش جالبی برای تجزیه ترکیبات ارگانوفسفره است اما عدم توانایی آنها در استفاده طولانی مدت و کاهش فعالیت آنها و ناپایداری در برابر عوامل محیطی از جمله دما می‌تواند مشکلاتی را در پی داشته باشد. یکی از مهمترین راه‌ها برای بهبود فعالیت و پایداریی دمایی آنزیم‌ها استفاده از روش‌های مهندسی پروتئین می‌باشد (۲۳). مطالعاتی به منظور افزایش پایداری آنزیم OPH در راستای افزایش بهره وری آن توسط نویسندگان این مقاله با موفقیت انجام گرفته است (۲۹)، ضمن اینکه مطالعات دیگری در این راستا به منظور افزایش فعالیت در حال انجام است.

نتیجه‌گیری

استفاده از ترکیبات ارگانوفسفره بعنوان آفت کش و همچنین عوامل شیمیایی ضمن آسیب به محیط زیست، می‌تواند آسیب‌های جبران ناپذیری به انسان‌ها وارد نماید. استفاده از عوامل اعصاب در جنگ‌ها و حملات شیمیایی تاکنون جان بسیای از انسان‌ها را گرفته و نمونه بارز آن در جنگ ایران و عراق مشاهده شده و اثرات آن هنوز در جانبازان مشاهده می‌شود. استفاده از روش تجزیه زیستی که در آن میکروب‌ها و همچنین آنزیم‌های جدا شده از آنها قادر به تجزیه ترکیبات مذکور هستند می‌تواند کمک شایانی به پیشگیری و همچنین کاهش اثرات آن بر روی محیط زیست و انسان شد. با توجه به وجود طیف وسیعی از ترکیبات ارگانوفسفره و همچنین آنزیم‌هایی با قابلیت‌های مختلف، مطالعه بیشتر و شناخت آنها ضروری است. همانطور که در بالا اشاره شده، ترکیبات ارگانوفسفره دارای طیف وسیعی بوده با ساختار و عملکرد متفاوت، لذا تجزیه کامل آنها با آنزیم‌ها، نیاز به شناخت کافی و لازم ساختار و عملکرد آنزیمهای مربوطه و ارتباط آنها با هر کدام از سوبستراها می‌باشد. استفاده از آنزیم‌های نوترکیب جهت تجزیه ترکیبات ارگانوفسفره در محیط‌های آلوده بویژه در محیط‌های جنگی می‌تواند بعنوان یک روش با اثربخشی بهتر در مقایسه با میکروب‌ها محسوب شود. در این بین مهندسی آنزیم که می‌تواند با رویکردهای افزایش پایداری، افزایش فعالیت و تنوع سوبسترایی انجام شود منجر به کارایی بیشتر آنزیم‌های مورد نظر گردد.

در این مطالعه مروری، ضمن تشریح ترکیبات ارگانوفسفره و اثرات آن، تجزیه زیستی و آنزیم‌های شناسایی شده با ارائه خصوصیات و قابلیت‌های هرکدام بطور تقریبا مفصلی تشریح گردید. آشنایی و تسلط بر استفاده از آنزیم‌ها ، بویژه آنزیم‌های مهندسی شده، می‌تواند منجر به تولید محصولاتی از قبیل پماد و اسپری آنزیمی که دارای قابلیت استفاده در محیط‌های آلوده و جنگی را دارد، شود.

نکات بالینی کاربردی برای جوامع نظامی

- استفاده از ترکیبات ارگانوفسفره بعنوان عوامل اعصاب در جنگ‌ها و حملات شیمیایی تاکنون جان بسیای از انسان‌ها را گرفته و اثرات آن هنوز در جانبازان مشاهده می‌شود.
- استفاده از روش تجزیه زیستی که در آن میکروب‌ها و همچنین آنزیم‌های جدا شده از آنها قادر به تجزیه ترکیبات ارگانوفسفره هستند می‌تواند کمک شایانی به پیشگیری و همچنین کاهش اثرات آن بر روی محیط زیست و انسان شد.

تشکر و قدردانی: این مطالعه بصورت مروری و بخشی از یافته‌های انجام شده پروژه مهندسی آنزیم می‌باشد. که بدین وسیله از زحمات و حمایت‌های معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج) تقدیر و تشکر می‌گردد.

تضاد منافع: بدینوسیله نویسندگان تصریح می‌نمایندکه هیچگونه تضاد منافعی درخصوص پژوهش حاضر وجود ندارد.

منابع:

1. Kern RJ. Enzyme-based detoxification of organophosphorus neurotoxic pesticides and chemical warfare agents: Texas A&M University; 2007.
2. Heide E. Cholinesterase inhibitors: including insecticides and chemical warfare nerve agents Part 5: the intermediate syndrome. 2012 edn. Agency for toxic substances and disease registry (ATSDR). Agency for toxic substances and disease registry (ATSDR), Avalable at: http://www. atsdr. cdc. gov/csem/csem. asp; 2012.
3. Caceres T. Fenamiphos and Related Organophosphorus Pesticides: Environmental Fate and Toxicology. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. 2010;205:117-62.
4. Ong KK. Encapsulation of Organophosphorus Acid Anhydrolase (OPAA) in Nanostructured Materials for the Detection and Decontamination of Chemical Warfare Agents: Drexel University; 2006
. 5. Elashvili I, inventorFurthering the enzymatic destruction of nerve agents,Patent**,** patent 6838277 2005.
6. Efremenko EN, Sergreeva VS. Organophosphate hydrolase - an enzyme catalysing degradation of phosphprous- containing toxins and pesticides. Russian Chemical Bulletin, International Edition. 2001;50(10):1826-32.
7. Diaz Casas AZ. Bioremediation of the organophosphate methyl parathion using genetically engineered and native organisms 2004.
8. Teeling EC, Springer MS, Madsen O, Bates P, O'Brien SJ, Murphy WJ. A molecular phylogeny for bats illuminates biogeography and the fossil record. Science. 2005;307(5709):580-4.
9. Singh S, Sharma N. Neurological syndromes following organophosphate poisoning. Neurol India. 2000;48(4):308-13.
10. Kamanyire R, Karalliedde L. Organophosphate toxicity and occupational exposure. Occup Med (Lond). 2004;54(2):69-75.
11. Leland JE. "Evaluating the Hazard of Land Applying Composted Diazinon Waste Using Earthworm Biomonitoring" 1998.
12. Pierdominici-Sottile G, Palma J, Roitberg AE. Free-energy computations identify the mutations required to confer trans-sialidase activity into Trypanosoma rangeli sialidase. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics. 2014;82(3):424-35.
13. Shimazu M, Mulchandani A, Chen W. Cell Surface Display of Organophosphorus Hydrolase Using Ice Nucleation Protein. Biotechnol Prog 2001;17:76-80.
14. Honeycutt R, Paulson D, LeBaron H, Rolofson G. Chemical treatment options for pesticide wastes disposal. 1984.
15. Mulchandani A, Chen W. Bioremediation of Organophosphorus Pesticides by Surface-Expressed Carboxylesterase from Mosquito on Escherichia Coli. Biotechnol Prog. 2004;20:1567-71.
16. Cycon M, Wójcik 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.
17. Mcdaniel C, Harper L, Wild J. Cloning and Sequencing of a Plasmid-Borne Gene (opd) Encoding a Phosphotriesterase. Bacteriology. 1988;170(5): 2306-11.
18. Mulchandani A, Chen W, Wang A, Catherine Mee C, Hie Cho H, Mark Shimazu M. Novel biological methods for degradation of organophosphate pesticides. Preprints of Extended Abstract. 2002;42 (2).
19. Singh BK, Walker A. Microbial degradation of organophosphorus compounds. FEMS Microbiology Reviews. 2006;30(3):428-71.
20. Shimazu M, Nguyen A, Mulchandani A, Chen W. Cell Surface Display of Organophosphorus Hydrolase in *Pseudomonas putida* Using an Ice-Nucleation Protein Anchor. Biotechnol Prog. 2003;19:1612-4.
21. Yang C, Zhao Q, liu Z, li Q, Qiao C, Mulchandani A, et al. Cell Surface Display of Functional Macromolecule Fusions on *Escherichia coli* for Development of an Autofluorescent Whole-Cell Biocatalyst. Environmental Science. 2008;42(16): 6105-10.
22. Organophosphorus Acid Anhydrase [Available from: http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?ec:3.1.8.2.
23. Ong KK. Encapsulation of organophosphorus acid anhydrolase (OPAA) in nanostructured materials for the detection and decontamination of chemical warfare agents: Drexel University; 2006.
24. Kern JR. "Enzyme-based detoxification of organophosphorus neurotoxic pesticides and chemical warfare agents" 2007.
25. Hartleib J, Rüterjans H. High-yield expression, purification, and characterization of the recombinant diisopropylfluorophosphatase from Loligo vulgaris. Protein expression and purification. 2001;21(1):210-9.
26. DeFrank JJ, Cheng T-C. Purification and properties of an organophosphorus acid anhydrase from a halophilic bacterial isolate. Journal of bacteriology. 1991;173(6):1938-43.
27. Ghanem E, Raushel FM. Detoxification of organophosphate nerve agents by bacterial phosphotriesterase. Toxicology and Applied Pharmacology. 2005;207:S459 – S70.

28. Hawwa R, Aikens J, Turner RJ, Santarsiero BD, Mesecar AD. Structural basis for thermostability revealed through the identification and characterization of a highly thermostable phosphotriesterase-like lactonase from Geobacillus stearothermophilus. Archives of biochemistry and biophysics. 2009;488(2):109-20.
29. Latifi AM, Khajeh K, Farnoosh G, Hassanpour K, Khodi S. The Cytoplasmic and Periplasmic Expression Levels and Folding of Organophosphorus Hydrolase Enzyme in Escherichia coli. Jundishapur journal of microbiology. 2015;8(12):e17790.
30. Chu X-y, Tian J, Wu N-f, Fan Y-l. An intramolecular disulfide bond is required for the thermostability of methyl parathion hydrolase, OPHC2. Applied microbiology and biotechnology. 2010;88(1):125-31.
31. Horne I ,Sutherland TD, Harcourt RL, Russell RJ, Oakeshott JG. Identification of an opd (organophosphate degradation) gene in an Agrobacterium isolate. Applied and environmental microbiology. 2002;68(7):3371-6.
32. Tian J, Wang P, Gao S, Chu X, Wu N, Fan Y. Enhanced thermostability of methyl parathion hydrolase from Ochrobactrum sp. M231 by rational engineering of a glycine to proline mutation. FEBS journal. 2010;277(23):4901-8.
33. Hawwa R, Larsen SD, Ratia K, Mesecar AD. Structure-based and random mutagenesis approaches increase the organophosphate-degrading activity of a phosphotriesterase homologue from Deinococcus radiodurans. Journal of molecular biology. 2009;393 (1): 36-57.