Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 16:40 +0330 on Wednesday October 23rd 2019

اثرمترونیدازول بر دنیتریفیکاسیون بیولوژیک سودوموناس استوتزری در فاضلاب

حسین معصوم بیگی[۱]، عباس رضائی[۲]، حاتم گودینی[۳]

۱- مرکز تحقیقات بهداشت نظامی وگروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)، تهران، ایران.
۲- گروه بهداشت محیط و حرفه ای، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
۳- گروه بهداشت محیط، دانشکده بهداشت و تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران.

یافته / دوره چهاردهم / شماره ۴ / پاییز ۹۱ / مسلسل ۵۳

چکیده

دریافت مقاله: ۹۰/۵/۲۰ ، پذیرش مقاله: ۹۱/۲/۲۳

* **مقدمه:** باکتری سودوموناس استوتزری از مهمترین و مؤثرترین باکتری‌های دنیتریفایر فاضلاب است. با توجه به اهمیت اثرات نیترات بر منابع آب و سلامتی انسان و نقش بازدارندگی مترونیدازول، این تحقیق با هدف بررسی اثر غلظت‌های مختلف مترونیدازول بر فعالیت دنیتریفایری سودوموناس استوتزری در فاضلاب انجام شد.

* **مواد و روش‌ها:** این مطالعه از نوع تجربی است. بعد از نمونه برداری فاضلاب خام، شناسایی و جداسازی باکتری سودوموناس‌استوتزری انجام شد. سپس سوسپانسیون باکتری در محیط کشت اختصاصی، غلظت های مختلف مترونیدازول در آب مقطر و غلظت های مختلف نیترات برای انجام آزمایشات حذف نیترات در شرایط انواکسیک آماده و آزمایشات بازدارندگی مترونیدازول بر فعالیت دنیتریفایری سودوموناس‌استوتزری در فاضلاب مصنوعی و واقعی انجام شد.

* **یافته‌ها:** مترونیدازول در غلظت های ۱۰۰، ۲۰۰ ، ۳۰۰ و ۴۰۰ mg/l، در فاضلاب های مصنوعی حاوی غلظت های تا ۵۵۰ mg/l نیترات، بر فعالیت دنیتریفایری *سودوموناس استوتزری* اثر بازدارندگی نداشت. غلظت ۸۰۰ mg/l به بالای مترونیدازول در فاضلاب های مصنوعی، و غلظت ۵۰۰ mg/l به بالا در فاضلاب خانگی، اثر بازدارندگی داشتند. در غلظت ۸۰۰ mg/l مترونیدازول، با افزایش غلظت سوبسترا (نیترات)، کاهش معنی‌دار سرعت حذف نیترات مشاهده شد. این باکتری به سه نمونه فاضلاب خانگی افزوده شد، ولی بر میزان حذف نیترات تأثیری نداشت.

* **بحث و نتیجه‌گیری:** با توجه به قابلیت حذف غلظت‌های بالای نیترات توسط باکتری *سودوموناس استوتزری* و مقاومت بالای آن در مقابل مترونیدازول، فرآیند دنیتریفیاسیون بیولوژیک، می‌تواند پتانسیل بالایی جهت کاربرد به منظور حذف غلظت‌های بالای نیترات از فاضلاب‌های صنعتی به ویژه فاضلاب صنایع دارویی داشته باشد.

* **واژه‌های کلیدی:** مترونیدازول، دنیتریفیکاسیون بیولوژیک، سودوموناس استوتزری، نیترات، تصفیه فاضلاب صنعتی، سیستم آنزیمی سیتوکروم P_{450}.

آدرس مکاتبه: تهران، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
پست الکترونیک: rezaee @modares.ac.ir

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 16:40 +0330 on Wednesday October 23rd 2019

مقدمه

صنایع دارویی و بهداشتی سبب ورود آلاینده‌های متنوعی به محیط زیست و منابع آب، و تهدید سلامت مردم و محیط زیست شده است و حذف آن‌ها از منابع آب و خاک و محیط زیست ضروری است. یکی از مهمترین آلاینده‌ها که از طریق فاضلاب خانگی و صنایع مختلف به منابع آب وارد می‌شود، نیترات به عنوان یکی از مهمترین ترکیبات نیتروژن دار و آنیونی بشدت محلول در آب است. مطالعات انجام شده نشان دهنده افزایش غلظت نیترات در آب‌های زیرزمینی است به طوری که استفاده از این منابع آب تن‌ها با گندزدایی ساده و بدون استفاده از سایر تکنولوژی‌های تصفیه مورد تردید است (۲-۱).

سازمان بهداشت جهانی نیترات را در گروه‌بندی خاص آلاینده‌هایی که به راحتی تصفیه پذیر نیستند قرار داده است (۳). افزایش رشد جلبک‌ها و فراهم شدن شرایط اتریفیکاسیون، کاهش شدید اکسیژن محلول (با مصرف ۴/۳۳گرم اکسیژن به ازای هر گرم نیتروژن)، افزایش میزان سرطان معده در افراد بالغ مستعد، سمیت ناشی از حضور NH_4، ایجاد بیماری سیانوز نیتراتی ناشی از مصرف آب آلوده توسط کودکان از جمله آثار ورود نیترات به منابع آب‌های پذیرنده می باشند و می‌توانند کیفیت آب را بشدت تحت تأثیر خود قرار دهند. به همین علل حذف نیترات از پساب‌های تصفیه خانه‌های فاضلاب قبل از تخلیه به منابع آب، بویژه اگر در پایین دست نقطه تخلیه، برداشت به منظور مصارف مختلف انجام شود و یا جهت تغذیه آب‌های زیرزمینی استفاده شوند، ضروری است (۵-۴).

یکی دیگر از آلاینده‌هایی که امروزه بیش از پیش توجه محققین را متوجه خود نموده است، آنتی‌بیوتیک‌ها هستند که به همراه فاضلاب‌های خانگی، پساب صنایع دارویی، فاضلاب بیمارستان‌ها و کلینیک‌های دامپزشکی حیوانات اهلی، محصولات کشاورزی و حوض‌های پرورش ماهی که از آنتی‌بیوتیک‌ها به عنوان پیشگیری استفاده می‌کنند، مقادیر قابل توجهی وارد منابع آب و محیط زیست می‌شوند (۶).

امروزه فاضلاب‌های خانگی محتوی مقادیر زیادی باقی مانده آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی توسط انسان در بخش مراقبت‌های پزشکی می‌باشند. معمولاً این داروها یا جذب لجن فعال شده و وارد هاضم‌های لجن می‌شوند و می‌توانند نقش ممانعت کنندگی در فعالیت تجزیه بیولوژیک باکتری‌های بی‌هوازی داشته باشند (۷) و یا با عبور از فرایندهای متداول تصفیه فاضلاب به همراه پساب، وارد خاک و یا منابع آب‌های سطحی و زیرزمینی و شرب می شوند. افزایش مقدار و تنوع آنتی بیوتیک‌های مصرفی، سبب ورود بیشتر آن‌ها از طرق مختلف به محیط شده است. با تأسف امروزه اطلاعات موجود در خصوص سرنوشت و خطرات ناشی از آن‌ها در محیط بسیار کم است (۸).

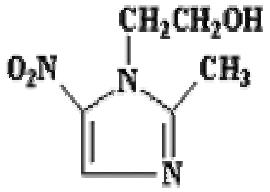
کومرر[1] در مطالعه خود گزارش نموده ۷۰٪ آنتی‌بیوتیک تولید شده در آمریکا که معادل ۱۱۵۰۰ تن می‌شود، توسط بخش دامپروری و برای درمان حیوانات مصرف می‌گردد و بخش زیادی از آن وارد محیط زیست می‌گردد (۸). امروزه قوانین لازم برای کنترل آنتی‌بیوتیک‌ها در منابع آب های سطحی و زیر زمینی و آب‌های آشامیدنی کافی نیست. چون فرض می‌شود مقادیر آن‌ها در آب بسیار کم و در ارزیابی خطرات زیست محیطی اثرات ثابت شده و معنی‌داری روی محیط زیست نشان نداده اند (۹).

مترونیدازول با فرمول $C_6H_9N_3O_3$ و با حضور ۲۴/۵۵٪ وزنی نیتروژن در ترکیب آن یکی از آنتی‌بیوتیک‌هایی

1. Kummerer

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 16:40 +0330 on Wednesday October 23rd 2019

است که محلول در آب و اتانول بوده و از طرق مختلف وارد محیط زیست می شود (۱۰) (شکل۱).



شکل۱-ساختمار شیمیایی مترونیدازول

مترونیدازول مهارکننده فعالیت سیستم آنزیمی سیتوکروم p_{450} بوده و بعد از ورود به فاضلاب، COD فاضلاب را تا حد بالایی افزوده و بعد از تجزیه و متابولیسم و آزاد شدن نیتروژن، منجر به ورود غلظت بالای نیترات آنیونی، به فاضلاب و پساب خروجی تصفیه خانه فاضلاب بیمارستانی و صنایع دارویی حاوی مترونیدازول و در نهایت ورود به منابع آب‌های سطحی و زیر زمینی می شود (۶).

تا به حال روش‌های مختلف فیزیکی و شیمیایی و بیولوژیک برای حذف ترکیبات نیتروژن از منابع آب و فاضلاب و کاهش خطرات ناشی از این آلاینده‌ها مورد استفاده قرار گرفته است. روش دنیتریفیکاسیون بیولوژیک که اغلب به دنبال نیتریفیکاسیون هوازی و در شرایط انوکسیک رخ می‌دهد، می‌تواند شکل‌های مختلف ترکیبات ازته را از فاضلاب حذف، و شرایط بهره برداری را بهبود بخشد. نیترات موجود، با فرایند دنیتریفیکاسیون توسط انواع میکروارگانیسم‌های دنیتریفایر در نهایت به گاز نیتروژن که نامحلول در آب می باشد، تبدیل شده و از محیط فاضلاب حذف می‌شود. در بین بیش از۵۰۰ باکتری دارای این قابلیت، باکتری سودوموناس استوتزری که اولین بار توسط بوری و همکارش استوتزر در سال ۱۸۹۵ به عنوان سودوموناس استوتزری معرفی شد، از مهمترین و مؤثرترین باکتری‌های دنیتریفایر است که با تنفس بیهوازی و در شرایط آنوکسیک احیاء نیترات را با راندمان بالایی، در محیط فاضلاب انجام می دهد و نیترات را به گاز نیتروژن تبدیل می‌نماید (۱۴-۱۱).

با توجه به قابلیت‌ها و مزیت‌های بالقوه آنزیم‌ها و توسعه روش‌های جدید مولکولی، تا بحال تحقیقات زیادی روی توسعه فرایندهای آنزیمی جهت تصفیه فاضلاب، مواد زائد جامد و مواد زائد خطرناک و خاک‌های آلوده انجام شده است (۱۷-۱۵). دیوید و لام[1] در مطالعه خود نشان دادند که در بین سیستم‌های آنزیمی محتلف، سیستم آنزیمی سیتوکروم p_{450} از مهمترین و مؤثرترین آن‌ها در تجزیه ترکیبات آلی مقاوم و زنوبیوتیک‌ها از طریق ترسیب و یا تبدیل به محصولات معدنی و یا قابل تجزیه بیولوژیک و یا تبدیل به مواد با خطرکمتر با محلول کردن آن‌ها درآب است. این آنزیم‌ها در بین باکتری‌ها در گونه‌های مختلف باکتری‌های سودوموناس هم شناسایی شده اند و سیتوکروم p_{450} جداشده از سودوموناس پوتیدا به عنوان اولین سیتوکروم p_{450} جدا شده از باکتری‌ها می باشد (۱۸).

این سیستم آنزیمی قابلیت‌های معجزه آسایی را برای سودوموناس‌ها فراهم نموده‌اند. انجام فرایند دنیتریفیکاسیون وکمک به حذف NO_xها از منابع آب و فاضلاب، یکی از توانایی های این باکتری‌هاست. بسیاری از ترکیبات دارویی منجر به اثر مهارکنندگی یا تحریک کنندگی سیستم آنزیمی سیتوکروم p_{450} می‌شوند. مترونیدازول، سایمیتدین، اریترومایسین و کلرامفنیکل از جمله عوامل مهارکننده و ریفامپین، فنوباربیتال، پریمیدین وکاربامازین از جمله عوامل تحریک کننده می باشند (۱۹).

تا بحال اثر مهارکنندگی مترونیدازول بر فعالیت باکتری‌های مختلف مورد مطالعه قرار گرفته است و شناسایی

1. David and Lam

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 16:40 +0330 on Wednesday October 23rd 2019

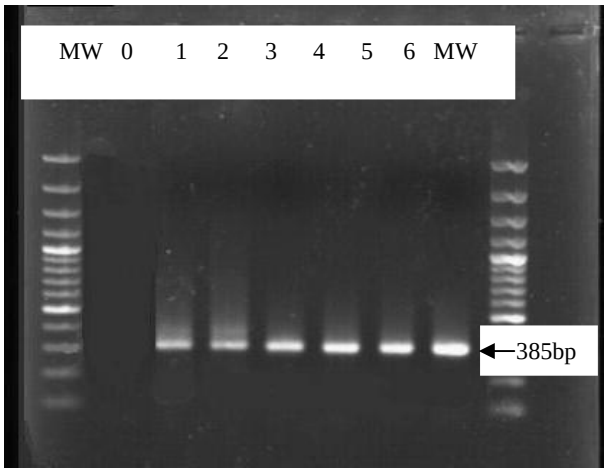
آنزیم‌های اصلی درگیر در متابولیسم ویژه داروها، یکی از مهمترین بخش های مطالعات اخیر است (۲۱-۲۰).

ادواردو[1] و همکاران اثر چند دارو را به عنوان مهارکننده فعالیت آنزیم سیتوکروم P_{450} بر روی تجزیه ۹ متیل آنتراسن بررسی نمودند. نتایج آن‌ها نشان داد اثر ممانعت کنندگی بعضی از آن‌ها خیلی قوی بود و بعضی هم در غلظت های پایین، دارای اثر ممانعت کنندگی تا ۸۰٪ بودند (۲۲). در مطالعه دیگری نیز اثر ممانعت کنندگی مترونیدازول و ترکیبات دارویی ایمیدازولی مورد تحقیق قرار گرفته است که اثر مهارکنندگی بعضی از آن‌ها بسیار قوی بوده است. بعضی از داروها به عنوان عامل بازدارنده فعالیت آنزیمی ممکن است از طریق باند شدن با جایگاه فعال آنزیم، مانع تأثیر آن شوند (۲۳).

با توجه به اهمیت اثرات نیترات بر منابع آب و سلامتی انسان، و همچنین اثبات نقش قوی دنیتریفایری باکتری سودوموناس استوتزری بومی جدا شده از تصفیه خانه فاضلاب (۲۴)، و وجود سیستم آنزیمی سیتوکروم p_{450} در این باکتری (۲۵)، و نقش بازدارندگی و مهارکنندگی ترکیبات دارویی ایمیدازولی مثل مترونیدازول و کتوکونازول روی سیستم آنزیمی سیتوکروم p_{450} (۶)، این تحقیق با هدف تشریح و مقایسه اثر غلظت‌های مختلف مترونیدازول بر میزان بازدارندگی دنیتریفایری سودوموناس استوتزری در حذف غلظت‌های مختلف نیترات، مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مطالعه از نوع تجربی و آزمایشگاهی و به روش OVAT[2] انجام شد. ابتدا نمونه‌برداری از فاضلاب خام یکی از صنایع پتروشیمی که محتوی نیترات بالا (۱g/l N) بود، انجام شد. نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی گراد تا قبل از آزمایشات نگهداری گردید. در آزمایشگاه، آزمایشات لازم مطابق روش‌های استاندارد انجام شد (۲۶). به کمک روش‌هایی مثل کشت باکتری‌ها و بررسی مرفولوژی کلنی‌های رشد کرده روی محیط کشت BHIA، رنگ آمیزی گرم و مشاهده و شناسایی سلول های باکتری‌ها، آزمون های بیوشیمیایی جهت تشخیص افتراقی و PCR (شکل۲)، باکتری‌های دارای قابلیت دنیتریفیکاسیون شناسایی و جداسازی گردید.



شکل۲- نتایج PCR و تصویر ژل الکتروفورز مربوط به تکثیر ژن nosZ *سودوموناس استوتزری*

از بین انواع این باکتری‌ها، باکتری دنیتریفایر سودوموناس استوتزری که از کارایی بالاتری برخوردار بود، انتخاب و تحت شرایط انواکسیک قابلیت دنیتریفایری آن‌ها مورد مطالعه قرار گرفت و ادامه آزمایشات با استفاده از آن‌ها انجام گردید. برای کشت سودوموناس استوتزری از محیط کشت اختصاصی با ترکیب ده گرم دی‌سدیم ساکسینات شش آبه ($C_4H_4Na_2O_4$)، یک گرم پتاسیم هیدروژن فسفات ($K_2HPO_4,2H_2O$)، یک گرم نیترات سدیم ($NaNO_3$)، ۰/۲گرم کلریدپتاسیم (KCl)، ۰/۲گرم سولفات منیزیم هفت آبه ($MgSO_4,7H_2O$)، یک میلی‌گرم سولفات آهن ($FeSo_4,7H_2O$) در یک لیتر آب مقطر

1. Edvardo
2. One Variable At a Time

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 16:40 +0330 on Wednesday October 23rd 2019

دو بار تقطیر شده استفاده شد. علاوه بر ماکرونوترینت‌ها، میکرونوترینت‌های لازم نیز به محیط کشت اضافه گردید وpH=۷/۲ تنظیم و سترون شد (۱۴،۲۷). در مطالعه ای که توسط رضایی و همکاران انجام گرفت نشان داده شد، که بهترین کارایی باکتری سودوموناس استوتزری جهت احیاء نیترات درpH خنثی است (۱۴). به همین دلیل اندازه گیری و تنظیم pH نمونه‌ها در حالت خنثی انجام گردید. گرمخانه گذاری نمونه‌های کشت داده شده و مورد مطالعه در دمای بیست و پنج درجه سانتی گراد به همراه شیک با سرعت ۱۲۵ دور در دقیقه انجام شد.

محیط‌های براث حاوی غلظت های مختلف نیترات برای انجام آزمون‌های مورد نظر تهیه گردید و باکتری مورد نظر بعد از جداسازی از فاضلاب، در محیط مذکور کشت داده شد تا بعد از۴۸-۲۴ ساعت، از آن‌ها برای تلقیح به محیط‌های مورد آزمایش استفاده شوند. قبل از شروع هر نوبت از آزمایشات غلظت‌های مورد نیاز محلول مترونیدازول درآب مقطر، تهیه شد و در ادامه، آزمون‌های لازم جهت بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف مترونیدازول بر باکتری سودوموناس استوتزری به شرح ذیل انجام گردید و حداقل هر مرحله از آزمایشات سه بار تکرار شد.

در مراحل و نوبت‌های مختلف آزمایشات، به هر بطری صدمیلی‌لیتری، پنجاه میلی‌لیتر از فاضلاب مصنوعی محتوی نیترات، یک میلی‌لیتر از محیط براث حاوی باکتری و یکی از غلظت های مختلف مترونیدازول اضافه شد و درب آن‌ها کاملاً مسدود گردید تا از هر گونه نفوذ اکسیژن جلوگیری شود. در هر نوبت سه بطری محیط کشت هم به عنوان شاهد، یکی بدون باکتری و با مترونیدازول، دومی با باکتری و بدون مترونیدازول و سومی بدون باکتری و بدون مترونیدازول تهیه گردید. بطری ها در دمای $۲۵^{o}C$ روی دستگاه شیکر با سرعت ۱۲۵ دور در دقیقه قرار داده شد و در زمان‌های۲۴، ۴۸ ،۷۲ ساعت بعد از کشت، نیترات آن به کمک اسپکتروفتومترUV-Vis (Unico Model 2001) در طول موج ۲۲۰nm اندازه گیری شد و غلظت مؤثر و بازدارنده مترونیدازول برای هر کدام از غلظت‌های نیترات، تعیین شد. اندازه گیری‌ها در طول موجnm ۲۷۵ هم جهت جلوگیری از خطای ناشی از وجود احتمالی مواد آلی انجام شد (۲۴،۲۶).

در ادامه از باکتری‌های مهارشده در حضور mg/l ۱۶۰۰ و mg/l ۸۰۰ مترونیدازول، بر روی محیط BHIA کشت داده شد و بعد از تهیه سوسپانسیون میکروبی از کلنی‌های جدید، مجدد قابلیت دنیتریفایری آن‌ها در حضور و عدم حضور مترونیدازول بررسی شد.

ابتدا قبل از قرائت نتایج نمونه‌ها به روش اسپکتروفتومتری، نمودار استاندارد خطی نیترات در طول موج ۲۲۰ نانومتر تهیه و به کمک آن، سایر نتایج حاصل از قرائت جذب نمونه‌ها محاسبه شد (۲۶).

درمرحله دوم آزمایشات، از تصفیه خانه فاضلاب در سه قسمت فاضلاب خام ورودی، خروجی حوض هوادهی و پساب خروجی حوض ته‌نشینی ثانویه، نمونه‌برداری و آزمایش NO_3 انجام گردید و سپس غلظت‌های مختلف مترونیدازول، به همراه یک میلی‌لیتر از محیط براث محتوی باکتری مورد مطالعه، به پنجاه میلی‌لیتر فاضلاب تهیه شده اضافه شد تا اثر بازدارندگی مترونیدازول بر فعالیت باکتری مورد نظر در فاضلاب واقعی با نتایج فاضلاب مصنوعی مقایسه شود.

مترونیدازول مصرفی در آزمایشات مذکور از شرکت داروسازی پارس دارو تهیه گردید و طبق دستورالعمل سازنده و سایر مقالات در دسترس جهت تهیه غلظت‌های مختلف، در آب مقطر حل گردید (۲۸). کلیه نمونه‌های برداشت شده ابتدا به مدت بیست دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند و سپس روآب حاصل برای اندازه‌گیری نیترات به روش استاندارد استفاده گردید (۲۶).

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 16:40 +0330 on Wednesday October 23rd 2019

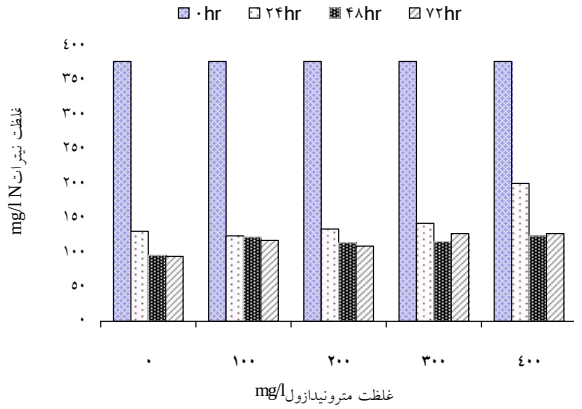
آزمایشات اثر غلظت‌های مختلف مترونیدازول (غلظت ۱۰۰ الی ۱۶۰۰ mg/l) و نیترات (غلظت ۴۵ تا ۵۹۰ mg/l) بر قابلیت دنیتریفایری باکتری سودوموناس‌استوتزری در زمان های۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعت، تحت شرایط مذکور انجام شد. نتایج حاصل به کمک نرم افزار SPSS 13 و آزمون آماری آنالیز واریانس مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها

جداسازی و شناسایی باکتری سودوموناس استوتزری از فاضلاب خانگی به کمک روش‌های معرفی شده انجام شد. تصویر ژل الکتروفورز مربوط به تکثیر ژن nosZ سودوموناس‌استوتزری حاصل از PCR در شکل ۲ مشاهده می‌شود.

با توجه به این که حداکثر طول موج جذبی مترونیدازول در طیف الکترومغناطیسی بالای ۲۷۵ نانومتر می‌باشد، حضور مترونیدازول در اندازه‌گیری غلظت نیترات و قرائت نتایج نمونه‌ها، اختلالی ایجاد نکرده و تأثیری نداشت.

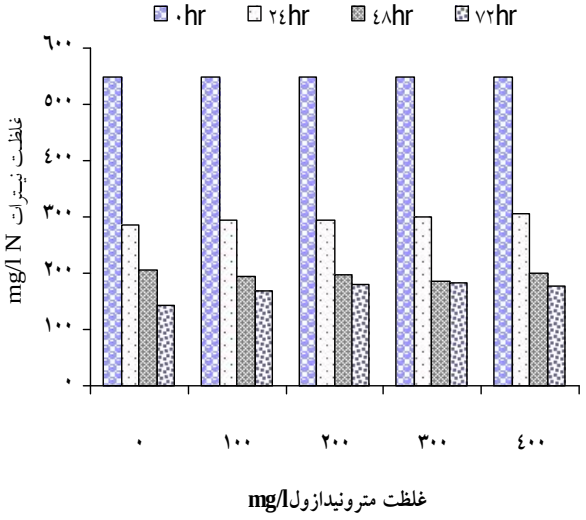
عدم تأثیر بازدارندگی غلظت‌های مختلف مترونیدازول تا ۴۰۰ mg/l، بر میزان کارایی سودوموناس استوتزری جهت حذف غلظت های مختلف نیترات، در نمودارهای ۱و۲ مشاهده می‌شود.



نمودار۱-حذف ۳۷۶ mg/l نیترات توسط باکتری سودوموناس استوتزری، درحضور۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ mg/l مترونیدازول در دمای۲۷°C و PH=۷/۲

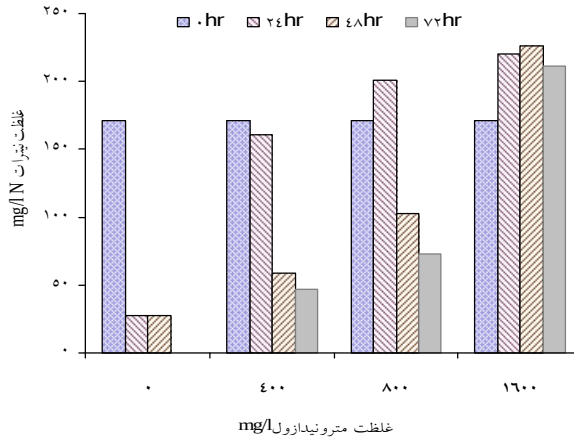
در حضور غلظت ثابت ۸۰۰mg/l مترونیدازول که حداقل غلظت بازدارنده رشد سودوموناس استوتزری است، با افزایش غلظت سوبسترا (نیترات)، اثر بازدارندگی و کاهش معنی‌دار سرعت احیاء نیترات توسط باکتری‌های مورد مطالعه مشاهده می‌شود (نمودارهای ۵-۳).

آزمون آماری آنالیز واریانس دو طرفه در حضور غلظتmg/l ۸۰۰ مترونیدازول بین هر کدام از دو گروه غلظت‌های ۱۷۱/۲ و ۴۰۲ ، ۱۷۱/۲ و ۵۹۰ و ۴۰۲ با ۵۹۰mg/l نیترات بعد از ۷۲ ساعت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار (P <۰/۰۵) بین گروه ها در خصوص اثر مترونیدازول روی میزان بازدارندگی و فعالیت دنیتریفایری سودوموناس استوتزری می‌باشد (نمودارهای ۵-۳).



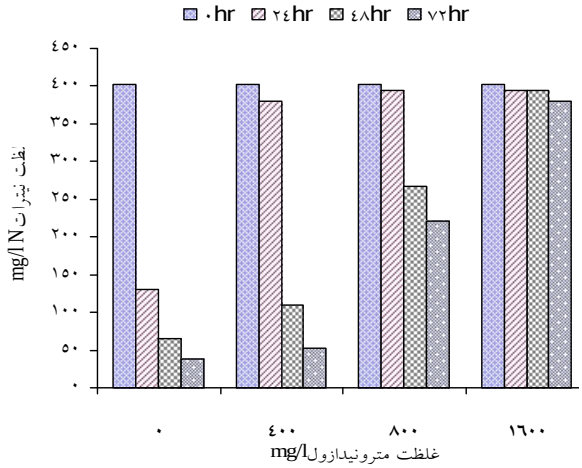
نمودار۲-حذف ۵۵۰ mg/l نیترات توسط باکتری سودوموناس استوتزری، درحضور۲۰۰،۱۰۰،۳۰۰ و ۴۰۰mg/l مترونیدازول در دمای ۲۷°C و PH=۷/۲

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 16:40 +0330 on Wednesday October 23rd 2019

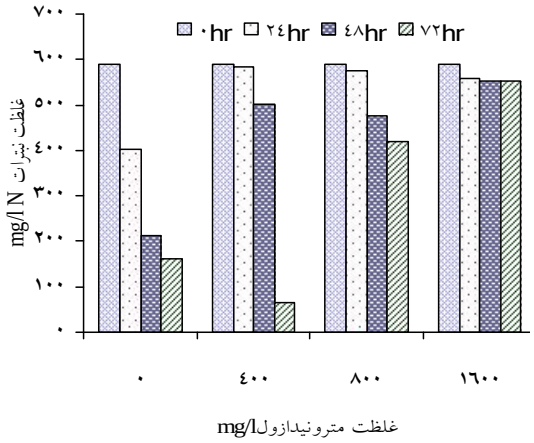


نمودار۳-حذف ۱۷۱/۴۲ mg/l نیترات توسط باکتری سودوموناس استوتزری درحضور۰،۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ mg/lمترونیدازول دردمای ۲۷°C و PH=۷/۲

در حالی که غلظت۴۰۰ mg/l مترونیدازول تأثیر معنی‌داری بر بازدارندگی فعالیت دنیتریفایری باکتری مذکور در حضور غلظت های مختلف نیترات نداشت، غلظت۱۶۰۰ mg/l در حضور تمام غلظت‌های مختلف نیترات، تقریباً اثر بازدارندگی ۱۰۰٪ داشت (نمودارهای۵-۳).

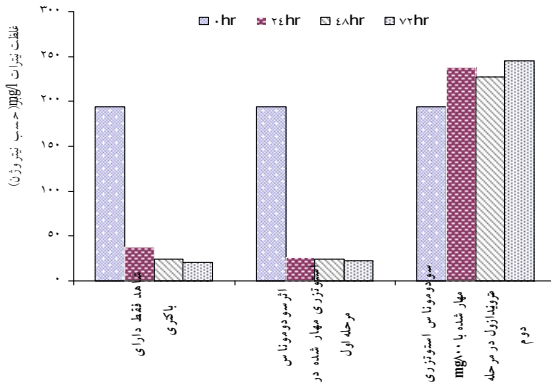


نمودار ۴ : حذف ۴۰۲ mg/l نیترات توسط باکتری سودوموناس استوتزری، درحضور۰، ۴۰۰، ۸۰۰ و۱۶۰۰ mg/lمترونیدازول دردمای۲۷°C و ۷/۲pH



نمودار۵-حذف ۵۹۰ mg/l نیترات توسط باکتری‌های سودوموناس استوتزری درحضور۰،۴۰۰، ۸۰۰ و۱۶۰۰ mg/lمترونیدازول دردمای ۲۷°C و PH=۷/۲

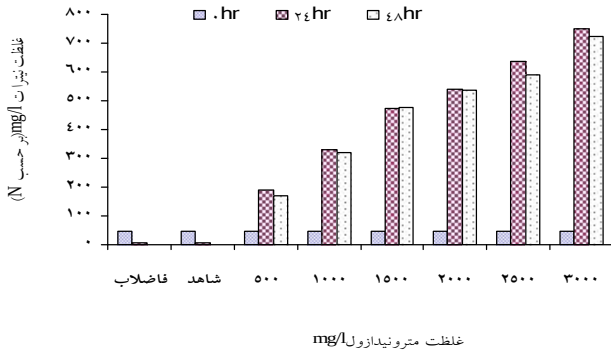
غلظت‌های۸۰۰ و ۱۶۰۰ mg/l مترونیدازول اختلاف معنی‌داری با یکدیگر در بازدارندگی فعالیت دنیتریفایری باکتری سودوموناس استوتزری در حضور غلظت‌های ۱۷۱ و ۴۰۲ و ۵۹۰ mg/l نیترات بعد از ۷۲ ساعت داشتند (P=۰/۰۲، P=۰/۰۳، P=۰/۰۴) (نمودارهای۵-۳). در بعضی آزمون‌ها، غلظت نیترات بعد از تماس با ۸۰۰ و ۱۶۰۰ mg/l مترونیدازول ابتدا بیشتر از غلظت اولیه شده است (نمودار ۳).



نمودار۶:-حذف ۱۹۴ mg/l نیترات توسط سودوموناس استوتزری طی دو مرحله تماس با ۸۰۰ mg/l مترونیدازول

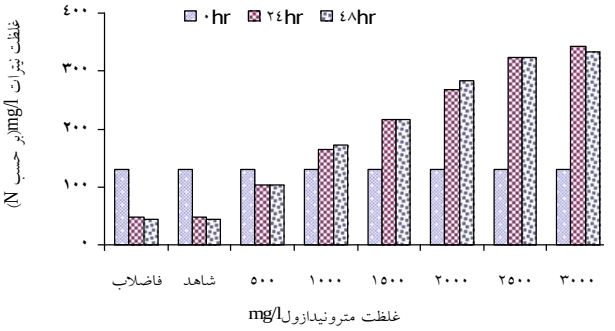
Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 16:40 +0330 on Wednesday October 23rd 2019

با توجه به این که غلظت نیترات در نمونه‌های شاهد دارای فقط مترونیدازول و نمونه‌های شاهد بدون مترونیدازول و بدون باکتری در پایان آزمایشات تغییری نداشت، از نمایش نتایج آن‌ها در نمودارها صرف نظر گردید.



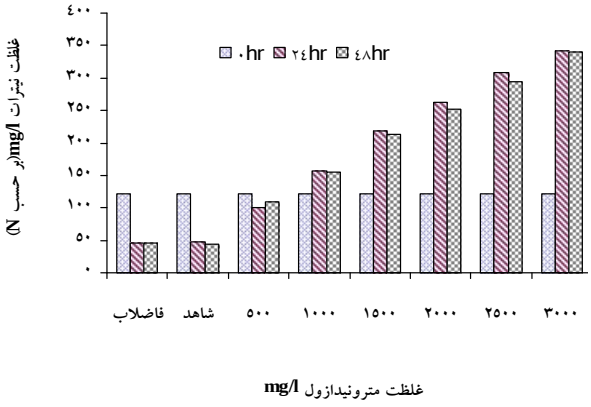
نمودار۷-حذف ۴۵/۳۸ mg/l نیترات از فاضلاب خام توسط سودوموناس استوتزری درحضور غلظت‌های مختلف مترونیدازول دردمای ۲۷°C و PH=۷/۲

جهت بررسی نحوه و میزان تأثیر مترونیدازول بر مهار فعالیت باکتری‌ها و بررسی برگشت پذیر بودن و یا نبودن فعالیت دنیتریفایری باکتری‌های کاملاً مهار شده مرحله اول، از آن‌ها کشت تهیه و مجدد در احیاء نیترات استفاده گردید، مشاهده شد که بصورت کلنی‌های ریز و سوزنی شکل روی محیط BHIA بعد از ۷۲-۴۸ ساعت رشد کردند.



نمودار ۸- حذف ۱۳۰ mg/l نیترات فاضلاب خروجی حوض هوادهی توسط سودوموناس استوتزری درحضور غلظت‌های مختلف مترونیدازول دردمای ۲۷°C و PH=۷/۲

آزمایشات انجام شده با این باکتری‌ها، نشان داد همچنان از توانایی اولیه خود در احیاء نیترات برخوردار می‌باشند. البته با افزودن مجدد ۸۰۰ mg/l مترونیدازول به این باکتری‌ها، اثر بازدارندگی آن بر فعالیت دنیتریفایری باکتری سودوموناس استوتزری ۱۰۰٪ بود (نمودار ۶).



نمودار ۹-حذف ۱۲۱/۷۸ mg/l نیترات پساب خروجی حوض ته‌نشینی توسط سودوموناس استوتزری درحضور و عدم حضور غلظت‌های مختلف مترونیدازول دردمای ۲۷°C و PH=۷/۲

اثر مهارکنندگی مترونیدازول بر کارایی سودوموناس استوتزری در نمونه‌های فاضلاب خام، خروجی حوض هوادهی و پساب خروجی حوض ته‌نشینی ثانویه، نسبت به فاضلاب مصنوعی در غلظت‌های پایین‌تری اتفاق افتاد (نمودارهای۹-۷).

بحث و نتیجه‌گیری

در این تحقیق، اثر مترونیدازول بر بازدارندگی فعالیت باکتری سودوموناس‌استوتزری به عنوان یک باکتری دنیتریفایر مورد مطالعه قرار گرفت. انتخاب سودوموناس‌استوتزری در این تحقیق به علت قدرت بالای دنیتریفیکاسیون این باکتری و حضور سیستم آنزیمی سیتوکرومp_{450} در آن می‌باشد. دنیتریفیکاسیون به وسیله این قبیل باکتری‌ها، بخشی از سیکل جهانی نیتروژن است و طی چهار مرحله واکنش های مختلف، نیترات از طریق نیتریت(NO_2)، نیتریک اکساید(NO)، نیتروس اکساید (N^2O)

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 16:40 +0330 on Wednesday October 23rd 2019

و نیتروژن(N_2) احیاء می‌شود (۲۹). هنریچ والتر[1] در مطالعه اثر دنیتریفایری باکتری سودوموناس استوتزری با توجه به حضور سیستم آنزیمی سیتوکروم p_{450}، تأکید نموده که این سیستم آنزیمی نقش مؤثری در احیاء NO_x ها به نیتروژن دارند (۲۵). معمولاً در بررسی اثر مهارکنندگی آنتی بیوتیک‌ها روی باکتری، از سوبسترای مورد علاقه سیستم آنزیمی باکتری استفاده می‌شود (۲۲) و در این تحقیق هم با بررسی میزان احیاء نیترات به عنوان سوبسترای مورد علاقه سودوموناس استوتزری اثر مهار کنندگی مترونیدازول مورد مطالعه قرار گرفت.

انتخاب مترونیدازول هم، به منظور بررسی اثر بازدارندگی آن بر فعالیت باکتری مذکور و در واقع مهار سیستم آنزیمی سیتوکروم p_{450} می‌باشد. مترونیدازول یا دو متیل پنج نیترو ایمیدازول یک اتانول، یک داروی دارای پنج نیتروایمیدازول و مؤثر در درمان عفونت‌های بیهوازی روده‌ای است. در بعضی مطالعات از آن برای ارزیابی مقاومت و مرگ میکروارگانیسم‌ها استفاده شده است (۲۸).

نتایج نمودارهای ۲-۱ و مقایسه نتایج با نمونه شاهد بدون مترونیدازول، نشان دهنده عدم تأثیر مترونیدازول در غلظت‌های تا mg/l ۴۰۰، برکاهش میزان فعالیت دنیتریفایری سودوموناس استوتزری بعد از۷۲ ساعت تماس در نمونه‌های تهیه شده می باشد و تفاوت معنی‌داری هم بین آن‌ها مشاهده نشد. گمز[2] و همکاران هم نشان دادند، آنتی‌بیوتیک‌های مختلف تا غلظت۲۵۰mg/l بر رشد و فعالیت و میزان کارایی یا بازدارندگی باکتری‌های مؤثر در فرآیند دنیتریفیکاسیون بیولوژیک، تأثیری ندارند و علت آن را وضعیت طبیعی فلاگ‌ها و یا ناپایداری آنتی‌بیوتیک‌ها در حضور میکروارگانیسم‌های فاضلاب بیان کردند (۳۰). بررسی تأثیر بازدارندگی مترونیدازول در این مطالعه، نشان دهنده شروع مهار فعالیت سیستم آنزیمی این باکتری در غلظت۸۰۰ mg/l مترونیدازول به بالا می‌باشد. تجزیه و تحمل تا غلظت ۸۰۰mg/l مترونیدازول توسط سودوموناس استوتزری نشان دهنده قابلیت و توانمندی بالای سیستم‌های آنزیمی این باکتری در تجزیه آلاینده‌های مقاوم به تجزیه بیولوژیک مثل مترونیدازول و انواع زنوبیوتیک‌ها، به متابولیت‌های ثانویه می باشد. به خصوص وقتی مهار فعالیت دنیتریفایری این باکتری‌ها اتفاق می‌افتد، بعضاً ابتدا اقدام به تجزیه مترونیدازول به عنوان سوبسترای ثانویه کرده و منجر به افزایش غلظت نیترات اولیه می‌شوند، ولی بعد از ادامه تماس شاهد کاهش غلظت نیترات در نمونه مورد مطالعه هستیم (نمودار ۳).

نتایج این مطالعه نشان داد در حضور غلظت‌هایی از مترونیدازول که اثر بازدارندگی بر فعالیت باکتری‌ها نداشتند، میزان دنیتریفیکاسیون با افزایش غلظت نیترات به عنوان سوبسترا افزایش می‌یابد. در مطالعه ای هم که توسط رضایی و همکاران به کمک این باکتری انجام گرفته است، نشان داده شده است که میزان دنیتریفیکاسیون با افزایش غلظت نیترات افزایش می‌یابد (۱۴).

بررسی قابلیت دنیتریفایری باکتری‌های مهار شده ای که کشت مجدد داده شدند، نشان داد آن‌ها با همان بازدهی باکتری‌های اولیه فعال هستند (نمودار ۶) و این مطلب به معنی فقط غیر فعال شدن فعالیت سیستم آنزیمی باکتری‌های مذکور در محیط آبی و در حضور غلظت بالای مترونیدازول در مرحله اول می باشد و این آنتی‌بیوتیک اثری روی مرگ و میر این باکتری نداشته است. معمولاً انتظار می رود که مقاومت آنتی‌بیوتیکی در محیط‌های آبی بیشتر باشد. در مطالعه انجام شده توسط توماس[3] و همکاران نیز نشان داده شده که مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌ها در محیط‌های آبی بیشتر بروز می‌نماید (۳۱).

1. Heinrich and walter
2. Gomez
3. Thomas

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 16:40 +0330 on Wednesday October 23rd 2019

بررسی نتایج نشان می‌دهد باکتری که یک نوبت قبلاً با مترونیدازول مهار شده است، وقتی در مرحله دوم در معرض مترونیدازول قرار می‌گیرد، در غلظت‌های پایین‌تری نسبت به مرحله اول مهار می‌شود (نمودار ۶). این نمودار نشان می دهد، مهار فعالیت باکتری سودوموناس استوتزری درحضور مترونیدازول در مرحله اول، تأثیری بر سرعت حذف نیترات، در عدم حضور مترونیدازول در مراحل بعدی ندارد.

با مهار شدن فعالیت این باکتری در واقع احیاء نیترات توسط باکتری متوقف می شود و با عدم مصرف نیترات به عنوان سوبسترا، شاهد افزایش غلظت نیترات، حتی گاهی تا دو برابر مقدار اولیه، در فاضلاب مصنوعی و فاضلاب خانگی هستیم و علت آن می تواند ناشی از تجزیه مترونیدازول توسط سودوموناس استوتزری به عنوان سوبسترای ثانویه، به متابولیت های ثانویه و تولید نیترات باشد. چون مترونیدازول از جمله مهار کننده فعالیت سیستم آنزیمی سیتوکروم p_{450} در این باکتری بوده و به دلیل حضور نیتروژن در ترکیب مترونیدازول (۱۰) بعد از ورود به فاضلاب، COD فاضلاب را تا حد بالایی افزایش می‌دهد. بعد از تجزیه و متابولیسم تحت تأثیر میکروارگانیسم‌های فاضلاب از قبیل سودوموناس استوتزری، در صورتی که غلظت مترونیدازول در حد غلظت مهارکنندگی فعالیت باکتری های دنیتریفایر باشد، گرچه مترونیدازول را به طور کامل تجزیه نخواهد نمود ولی با مصرف و تجزیه بخشی از مترونیدازول به عنوان سوبسترای ثانویه، منجر به افزایش تولید نیترات می‌گردد. در صورتی که فرایندهای مناسبی برای احیاء نیترات پیش بینی نشده باشد، منجر به افزایش غلظت نیترات آنیونی محلول در فاضلاب و در نهایت پساب خروجی تصفیه خانه فاضلاب صنایع دارویی حاوی مترونیدازول شده و در نتیجه سبب ورود نیترات به منابع آب های سطحی و زیر زمینی می شوند.

بررسی اثرمترونیدازول روی دنیتریفیکاسیون بیولوژیک به کمک سودوموناس استوتزری، در فاضلاب شهری هم طی این تحقیق مورد مطالعه قرار گرفت. با توجه به این که حذف نیترات در نمونه فاضلاب‌های خانگی، بعد از افزودن سودوموناس استوتزری، تغییری نکرد (نمودارهای ۹-۷)، نشان دهنده وجود این قبیل باکتری‌ها در نمونه فاضلاب واقعی مورد مطالعه می‌باشد.

مقایسه نتایج آزمایشات انجام شده با استفاده از نمودارهای فاضلاب خانگی و مصنوعی نشان دهنده اثر ممانعت کنندگی غلظت‌های کمتر مترونیدازول در فاضلاب خانگی محتوی غلظت‌های پایین تر نیترات می باشد. یعنی در فاضلاب خام ورودی که نیترات کمتری دارد، اثر مهارکنندگی مترونیدازول در غلظت‌های کمتر از ۵۰۰mg/l ، و در نمونه‌های خروجی حوض ته نشینی ثانویه و خروجی حوض هوادهی، مترونیدازول در غلظت بالاتر از ۵۰۰ mg/l اثر مهار کنندگی خود را نشان می‌دهد.

نمودارهای ۹-۷، نشان دهنده عدم دخالت مؤثر باکتری مورد مطالعه اضافه شده در راندمان و نتایج احیاء نیترات در سه نمونه فاضلاب می‌باشد. این نتایج نشان دهنده بروز اثر مهارکنندگی مترونیدازول در غلظت‌های کمتری می‌باشد، به نحوی که در غلظت ۵۰۰mg/l مترونیدازول، فعالیت دنیتریفایری باکتری های موجود در نمونه های فاضلاب ۱۰۰٪ متوقف شد و این به معنی توقف کامل فعالیت‌های تمام سیستم‌های آنزیمی است، چون اگر سایر سیستم‌های آنزیمی فعال یک باکتری در محیط تحت شرایطی غیر فعال شوند، سیستم آنزیمی سیتوکروم P_{450} می تواند خلاء حضور آن‌ها را پر کرده و به جای آن‌ها عمل نماید (۳۲).

مهار فعالیت دنیتریفایری باکتری سودوموناس‌استوتزری به منزله مهار سیستم های آنزیمی فعال آن است. مهار سیستم آنزیمی سیتوکروم p_{450} در باکتری سودوموناس استوتزری در

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 16:40 +0330 on Wednesday October 23rd 2019

حضور غلظت‌های بازدارنده مترونیدازول، بدلیل تشکیل کمپلکس متابولیت‌های دارویی و آنزیم و یا باند شدن آن با مترونیدازول می‌باشد (۳۳). بانرژی[1] در گزارش نتایج تحقیق خود بیان داشته توسعه مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌ها، تحت تأثیر مکانیسم‌های مختلفی امکان پذیر است که یکی از مهمترین آن‌ها وجود سیستم‌های آنزیمی مناسب در آن هاست. چون بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها بوسیله آنزیم‌های میکروبی به ترکیبات ساده تر تجزیه می‌شوند (۳۴). واکنش‌های متابولیسم داروها معمولاً طی دو مرحله واکنش انجام می‌شود. در مرحله اول یک گروه عاملی مثل هیدروکسیل به ترکیب اضافه می‌شود و یا در بعضی موارد ممکن است آن ترکیب در معرض واکنش‌های بیولوژیک قرار گیرد. سیستم آنزیمی سیتوکروم P_{450} مهمترین سیستم آنزیمی برای تجزیه ترکیبات دارویی و مقاوم به تجزیه بیولوژیک در مرحله اول هستند. این آنزیم‌ها یک خانواده بزرگ از هموپروتیین‌ها هستند که طیف گسترده ای از واکنش‌های بیولوژیک را جهت تجزیه ترکیبات خارجی کاتالیز می‌نمایند (۳۵). این سیستم آنزیمی در انسان‌ها هم مهمترین سیستم و مسئول متابولیسم (اکسیداسیون)۸۰-۷۰٪ داروها و ترکیبات خارجی وارد شده به بدن هستند (۳۶). این سیستم آنزیمی علاوه بر آن در حیوانات، گیاهان و میکروارگانیسم‌ها بخصوص باکتری‌ها و یوکاریوت‌ها، به ویژه قارچ‌ها وجود دارند و بسیاری از واکنش‌های شیمیایی تصفیه‌ای را کاتالیز می‌نماید (۱۶).

معمولاً انتظار داریم با توجه به قابلیت‌ها و توانایی بالای سیستم آنزیمی سیتوکروم P_{450} در متابولیسم داروها، در فاضلاب‌های صنایع دارویی، میکروارگانیسم‌های حاوی این آنزیم حضور فعالی داشته باشند. در بین ترکیبات مختلف دارویی مترونیدازول از عوامل بازدارنده فعالیت سیستم آنزیمی می باشد، در نتیجه ممکن است فعالیت باکتری‌های دارای این سیستم آنزیمی هم (مثل باکتری سودوموناس استوتزری به عنوان یک باکتری دنیتریفایر) در فاضلاب‌های محتوی غلظت بالای این داروها مهار شود. قابلیت بیوکاتالیزوری آنزیم‌های سیتوکروم p_{450} باکتریایی در متابولیسیم و کاتالیز محدوده گسترده ای از زنوبیوتیک‌ها و ترکیبات و آلاینده‌های زیست محیطی اثبات شده است و با توجه به این قابلیت‌ها استفاده از میکروارگانیسم‌ها در حذف و تجزیه آلاینده‌های محیطی روز به روز بیشتر مورد توجه قرار می‌گیرد (۳۷،۳۸). نقش مؤثر سیستم آنزیمی مذکور در تجزیه بیش از هشتاد مورد از آلاینده‌های مقاوم به تجزیه بیولوژیک، مثل داروها اثبات شده است. مهار و بازدارندگی این سیستم آنزیمی، معمول ترین اثر متقابل داروهاست. به همین دلیل شرکت‌های سازنده دارو در تولیدات جدید، دانش خصوصیات و فرآیندهای متابولیکی و قابل تجزیه بودن داروها تحت تأثیر سیستم‌های آنزیمی، به خصوص سیستم آنزیمی سیتوکروم P_{450} را مورد توجه قرار می‌دهند و این مسئله نقش بسیار مهمی در انتخاب ترکیبات مناسب در مراحل توسعه پروژه‌های تولید دارو ایفا می‌نماید. البته این گونه پیشرفت‌ها به افزایش اثر بخشی و کاهش مقدار نیاز و مصرف داروها در مراحل درمان کلینیکی هم کمک می‌نماید (۳۹،۴۰).

مکانیسم‌های بازدارندگی سیستم‌های آنزیمی می‌تواند به سه بخش تقسیم شود، که شامل بازدارندگی قابل برگشت، بازدارندگی نیمه بازگشت پذیر و بازدارندگی برگشت ناپذیر می‌شود. در این تحقیق همانطور که نتایج نشان می‌دهند، بازدارندگی مترونیدازول بر باکتری سودوموناس استوتزری از نوع برگشت پذیر می‌باشد و در مرحله برگشت، شاهد کاهش مقاومت سودوموناس استوتزری و کاهش غلظت مترونیدازول مورد نیاز برای مهار فعالیت این باکتری بودیم. اثرات متقابل بازدارندگی برگشت پذیر منجر به افزایش رقابت بر سر جایگاه‌های فعال سیستم آنزیمی و احتمالاً درگیر شدن فقط در اولین مرحله

1 . Banerjee

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 16:40 +0330 on Wednesday October 23rd 2019

چرخه کاتالیستی انتقال اکسیژن می‌شود. از طرف دیگر داروهایی که طی و یا بعد از مرحله انتقال اکسیژن وارد واکنش می‌شوند، معمولاً دارای بازدارندگی غیر قابل برگشت یا نیمه قابل بازگشت می‌شوند و برای این منظور حداقل یک سیکل کامل از فرآیند کاتالیستی سیستم آنزیمی سیتوکروم نیاز دارند. در محیط‌های فاضلاب متابولیسم‌هایی مناسب هستند که طی آن‌ها اثر بازدارندگی داروها بر سیستم آنزیمی سیتوکروم باکتری‌ها قابل برگشت باشند (۴۰) تا مجدداً باکتری‌ها بتوانند به وظیفه خود در تجزیه و حذف آلاینده‌ها ادامه دهند.

کاربرد و استفاده از باکتری‌های دارای آنزیم‌های اکسیدکننده به عنوان بیوکاتالیست برای اهداف زیست محیطی یک توان بالقوه ای را در جهت مصرف انرژی کمتر در شرایط خاص مورد نیاز، فراهم می‌نماید. توجه به انواع سیستم‌های آنزیمی فعال و قابلیت‌های میکروارگانیسم‌ها در حذف و تصفیه آلاینده‌ها به شدت مورد علاقه محققین قرار گرفته و با توجه به مزایای فراوانی که آنزیم‌ها دارند، انتظار می‌رود در آینده کاربرد آن‌ها در حد قابل توجهی افزوده شود. چون از یک طرف میزان حضور زنوبیوتیک‌ها و ترکیبات آلوده کننده آلی مقاوم در محیط رو به افزایش است و سبب افزایش مشکلات زیست محیطی شده است و تصفیه و حذف این آلاینده‌ها به روش‌های شیمیایی و بیولوژیکی بیش از پیش مورد نیاز است. از طرف دیگر استفاده از آنزیم‌ها جهت تصفیه آلاینده‌های خاص مورد نظر، امکان پذیر است و پیشرفت‌های اخیر بیوتکنولوژی سبب ارزان‌تر شدن فرایندهای تولید آنزیم ها و دسترسی راحت تر به آنزیم‌ها از طریق جداسازی بهتر و روش‌های خالص سازی جدید شده است (۴۲-۴۱).

ترکیبات دارویی مثل آنتی بیوتیک‌ها از فرایندهای متداول تصفیه بیولوژیک فاضلاب عبور کرده و بخش عمده ای از آن‌ها بدون این که متابولیسمی روی آن‌ها صورت گرفته باشد و یا با متابولیسم ناقص، به فاضلاب و از آنجا بدون تصفیه به خاک و یا منابع آب‌های سطحی و زیرزمینی و منابع آب شرب وارد می‌شوند. فقط تعداد کمی از آن‌ها تحت شرایط آزمایشگاهی در سیستم‌های آبی، قابل تجزیه بیولوژیک می‌باشند و ترکیباتی مثل کوئینین‌ها و یا مترونیدازول غالباً مقاوم به تجزیه هستند (۸-۶). طی مطالعه‌ای با هدف بررسی اثر بازدارندگی آنتی‌بیوتیک‌ها برفعالیت باکتری‌های بیهوازی، اثر مهار کنندگی غلظت mg/l ۱۰۰۰-۲۴ آنتی‌بیوتیک‌های مختلف بر باکتری‌های بیهوازی بررسی شد. نتایج این مطالعه نشان داد که بعضی از آنتی بیوتیک‌ها بعد از جذب روی ذرات لجن، وارد هاضم بیهوازی تصفیه لجن می شوند و به عنوان مهار کننده فعالیت باکتری‌های بیهوازی عمل می‌کنند (۷-۶). متناسب با نوع آلاینده‌ها و باکتری‌های مورد مطالعه ممکن است غلظت‌های مهارکنندگی آنتی‌بیوتیک‌ها متفاوت باشد، ولی بررسی نتایج مطالعه فوق و یافته‌های این تحقیق و غلظت بالای مهارکنندگی آنتی‌بیوتیک‌ها، نشان دهنده مقاومت بالای باکتری‌های تصفیه کننده فاضلاب در مقابل آنتی‌بیوتیک‌ها و تأثیر موفق آن‌ها در حذف آلاینده‌های فاضلاب می‌باشد.

با توجه به قابلیت حذف غلظت‌های بالای نیترات و مقاومت بالای باکتری سودوموناس استوتزری در مقابل مترونیدازول، و این که موضوع آنتی بیوتیک‌ها و تأثیرات زیست محیطی آن‌ها امروزه موضوع قابل توجهی در مباحث و موضوعات تحقیقاتی است، توسعه تحقیقات در زمینه استفاده از قابلیت‌های بالای روش‌های بیولوژیک بخصوص استفاده از باکتری مذکور جهت حذف نیترات و سایر آلاینده‌های فاضلاب‌های صنعتی به همراه اندازه‌گیری متابولیت‌های ثانویه احتمالی حاصل از تجزیه آنتی‌بیوتیک‌ها، پیشنهاد می‌شود. قوانین جدید زیست محیطی، بر توسعه اینگونه روش‌های تصفیه و استراتژی‌های جدید دوستدار محیط زیست تأکید دارند و به دلیل گرانی و غیر قابل کاربرد بودن روش‌ها و

تکنیک‌های شیمیایی، تصفیه بسیاری از آلاینده‌های مقاوم، به کمک روش‌های بیولوژیک ممکن می‌باشد. در انجام این تحقیق کاستی ها و مشکلات عمده ای که مانع پیشرفت تحقیق شود وجود نداشت.

بر اساس نتایج حاصل از آزمایشات انجام شده در این مطالعه، باکتری‌های سودوموناس استوتزری دارای قابلیت بسیار بالایی در حذف نیترات بوده و مقاومت بالایی در حضور غلظت‌های بالای آنتی‌بیوتیکی مثل مترونیدازول دارند و میزان دنیتریفیکاسیون با افزایش غلظت نیترات افزایش می‌یابد. در نتیجه این فرآیند پتانسیل بالایی جهت کاربرد به منظور حذف غلظت‌های بالای نیترات از فاضلاب‌های صنعتی به ویژه فاضلاب صنایع دارویی دارد. این گونه مطالعات می‌توانند راه گشای مطالعات گسترده و کاربردی بیشتری با توجه به قابلیت‌های این باکتری‌ها به عنوان معجزه‌گرهای محیط زیست در تجزیه آلاینده‌های مقاوم باشند.

تشکر و قدردانی

از دانشگاه تربیت مدرس به خاطر حمایت های مالی و از آقای دکتر یونس پناهی از مرکز تحقیقات آسیب های شیمیایی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج) به خاطر مساعدت و رهنمودهای ایشان در انجام این تحقیق تشکر و قدردانی می کنیم.

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 16:40 +0330 on Wednesday October 23rd 2019

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 16:40 +0330 on Wednesday October 23rd 2019

References

1. Kappor A, Viraraghran T. Nitrate removal from drinking water. Environ Eng.1997;123 (4): 29-37.
2. Tannehill C, Dahab M, Woldt W, Boyardi I. Evaluation of nitrate treatment methods under uncertainty. Environ System.1997;25(4):127-134.
3. WHO. Guidelines for drinking water quality. 3th ed. vol.1, Geneva. Switzerland. 2004; 417-420.
4. Tchobanoglous G, Burton FL, David stensel H. Wastewater engineering-treatment and reuses. 4th ed. Metcalf and Eddy.McGraw-Hill. 2003;660-665.
5. Hammer MJ. Water and wastewater technolog. 5th ed. Prentice hall of india. New Delhi. 2007;483-485.
6. Wynnae O. Antibiotics in the Environment. TESC 422 Case Study Paper.2003.http://www.consciouschoice. com/health/antibiotics1207.html.
7. Stefan G, Elke U, Radka A, Klaus K. Anaerobic inhibition and biodegradation of antibiotics in ISO test schemes. Chemosphere. 2007; 66: 1839-1848.
8. Kümmerer K. Significance of antibiotics in the environment. J Antimicrob Chemoth. 2003; 52: 5-7.
9. Hakkola J, Pelkonen O, Pasanen M, Raunio H. Xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 enzymes in the human feto-placental unit: role in intrauterine toxicity. Crit Rev Toxicol. 1998 ;28 (1):35-72.
10. Susan B. An Encyclopedia of chemicals, Drugs and Biologicals. 11th ed. Merck & CO, INC U.S.A.1989.
11. Jorge L, Antoni B, Rafael B, Elena G, Norberto J. Biology of Pseudomonas stutzeri. Micribiol Mol Biol R. 2006; 70(2): 510-547.
12. Nirmali S, Subrata K, Bharat K, Patel C, Ram N, Aqbal S, Madhuban G. Biodegradation of beta-cyfluthrin by Pseudomonas stutzeri strain S1. Biodegradation. 2005; 16:581-589.
13. Marazioti C, Kornaros M, Lyberatos G. Kinetic modeling of a mixed culture of pseudomonas denitrificans and Bacillus subtilis under aerobic and anoxic operating conditions. Water Research. 2003; 37(6):1239-1251.
14. Rezaee A, Godini H, Dehestani S, Kaviani S. Isolation and charactrization of a novel denitrifying bacterium with high nitrate removal: Pseudomonas stutzeri. Iran J Environ Health Sci Eng. 2010;313-318.
15. Matigan M. Biology of Microorganisms. 8th ed. Prentice hall .1997.117-119.
16. Hirofum S, Tatsuo T. Denitrification by the fungus fusarium oxysporum and Involvement of Cytochrome p-450in the Respiratory Nitrite Reduction. J Biol Chem. 1991; 266(17): 11078-11082.
17. Xenobiotic-metabolizing CYP450 enzymes in human cytochrome p450 (CYP) enzymes. Review of the Literature.http://herkules.oulu.fi/isbn 9514258649/html/x246.html.
18. David C, Lam B. The Cytochrome p450 complement (cypome) of Streptomyces Coelicolor A3 (2). JBC Papers in press.2002.

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 16:40 +0330 on Wednesday October 23rd 2019

19. Wagne A, Kradyam B. Text book Applied Therapeutics. Lippin CO lt Williams wilkins-chapter 54, 2001.
20. Matsushkin T, Morozova I, Morozov p. Theoretical analysis of mutation pattern of the cytochrome P450 superfamily. Institute of Cytology and Genetices, Siberian Branch of Russian Academy of sciences Russia. 2007/05/01.
21. Madison. Drug Metabolizing Enzymes. Technical Resource Guide. Second ed. Invitrogen life Technology.USA. www.invitrogen. com/drugdiscovery.
22. Eduardo T , Heiko H, Christof M. Niemeyer. Evaluation of cytochrome P450BSb reactivity against polycyclic aromatic hydrocarbons and drugs. Biochem Bioph Res Co. 2007; 286-293.
23. Melaie JC, Pharm D, Timothy S. Cytochrome P450: New Nomenclature and Clinical Implications. American Family Physician.1998.
24. Rezaee A, Godini H, Dehestani S, Yadanbakhsh A, Mousavi G, Anoshiravan K. Biological denitrification by Pseudomonas stutzeri immobilized on microbial cellulose. World J Microbiol Biotechnol. 2008;24: 2397-2402.
25. Heinrich C, Walter GZ. Anaerobic Control of Denitrification in Pseudomonas stutzeri Escapes Mutagenesis of an fnr-Like Gene. J Bacter.1993;175(22) 7236-7246.
26. Clesceri LS, Greenberg AE, Eaton AD, Standard methods for the examination of water and Wastewater. 20th ed. Washington D.C, AWWA,APHA,WPCF, WEF: 2003; 6-13.
27. Picardo KF, Giroux DW. Novel Scientific Research in the College Classroom: Identification of Antibiotic Resistant Pseudomonas Species from a Wastewater Treatment Plant. Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. 2010; 494-500.
28. Nasirudeen AMA, Hian YE, Singh M, Tan KSW. Metronidazole induces programmed cell death in the protozoan parasite Blastocystis hominis. Microbiology. 2004;150: 33-43.
29. Hartig E, Schiek U, Vollack KU, Zumft WG.Nitrate and Nitrite Control of Respiratory Nitrate Reduction in Denitrifying Pseudomonas stutzeri by a Two-Component Regulatory System Homologous to NarXL of Escherichia coli. J Bacteriol. 1999;181(12) 3658-3665.
30. Gomez J, Mendez R, Lema JM. The effect of antibiotics on nitrification processes.Batch assays. Appl Biochem Biotechnol. 1996; (57/58) :869-876.
31. Thomas S, Wolfgang K, Bernd J, Ursula O. Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. FEMS Microbiol Ecol. 2003; 43(3): 325-335.
32. Roche Diagnostics . Ampilichip cyp450 test . 24 Tests P/N: 04591402 190.
33. Oulu University library. drug metabolism. Chapter 2. Review of the literature2006/16/11.http://herkules. oulu.fi/isbn9514270231/html/c146.html.

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 16:40 +0330 on Wednesday October 23rd 2019

34. Banerjee S. Community composition in soils along a topographic gradient. Masters Theses. University of Kentucky. 2010.
35. Yan Z, Caldwell G. Metabolism profiling, and cytochrome P450 inhibition & induction in drug discovery. Curr Top Med Chem.2001;1(5): 403-425(23).
36. Guengerich F, Rendic S. Update information on human P450s. Drug Metab Rev. 2002; 34 (1): 7-15.
37. Nelson D. Bacterial P450 Links. 2004; Estimate 90 Bacterial P450 Genes. http://drnelson.uthsc.edu/bacterial.P450s.html.
38. The worldwide Physiologist. Cytochrome p450 Clinical section Isoform tables. 2006.http://www.anaesthetist.com/physiol/basics/metabol/cyp/Findex.htm#cyp.htm.
39. Lin JH, Lu AY. Interindividual variability in inhibition and induction of cytochrome P450 enzymes. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2001;41:535-567.
40. Lin JH, Lu AY. Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. Clin Pharmacokinet. 1998;35 (5):361-390.
41. Jean K, James AN. Review Potential Applications of Enzymes in Waste Treatment. J Chem Tech Biotechnol. 1997; 69: 141-153.
42. Raina M. Environmental Microbiology. Academic Press. 2000; 364-67.