

اثر مترونیدازول بر دنیتریفیکاسیون بیولوژیک سودوموناس استوتزری در فاضلاب

حسین معصوم بیگی^۱، عباس رضائی^۲، حاتم گودینی^۳

۱- مرکز تحقیقات بهداشت نظامی و گروه 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 سودوموناس استوتزری انجام شد. سپس سوسپانسیون باکتری در محیط کشت اختصاصی، غلظت‌های مختلف مترونیدازول در آب مقطر و غلظت‌های مختلف نیترات برای انجام آزمایشات حذف نیترات در شرایط انواکسیک آماده و آزمایشات بازدارندگی مترونیدازول بر فعالیت دنیتریفایری سودوموناس استوتزری در فاضلاب مصنوعی و واقعی انجام شد.

*** یافته‌ها:** مترونیدازول در غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ mg/l، در فاضلاب‌های مصنوعی حاوی غلظت‌های تا ۵۵۰ mg/l نیترات، بر فعالیت دنیتریفایری سودوموناس استوتزری اثر بازدارندگی نداشت. غلظت ۸۰۰ mg/l به بالای مترونیدازول در فاضلاب‌های 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 دنیتریفیکاسیون 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 P450.

آدرس مکاتبه: تهران، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

پست الکترونیک: rezaee@modares.ac.ir

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 (۱-۲).

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 $4/33$ گرم 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 می‌باشند 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 (۴-۵).

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).

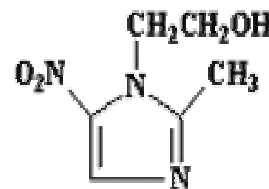
امروزه فاضلاب‌های خانگی محتوی مقادیر زیادی باقی مانده آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی توسط انسان در بخش مراقبت‌های پزشکی می‌باشند. معمولاً این داروها یا جذب لجن فعال شده و وارد هاضم‌های لجن می‌شوند و می‌توانند نقش ممانعت کنندگی در فعالیت تجزیه بیولوژیک باکتری‌های بی‌هوازی داشته باشند (۷) و یا با عبور از فرایندهای متداول تصفیه فاضلاب به همراه پساب، وارد خاک و یا منابع آب‌های سطحی و زیرزمینی و شرب می‌شوند. افزایش مقدار و تنوع آنتی‌بیوتیک‌های 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^۱ 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 آب‌های 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

است که محلول در آب و اتانول بوده و از طرق مختلف وارد محیط زیست می شود (۱۰) (شکل ۱).



شکل ۱- ساختار شیمیایی مترونیدازول

مترونیدازول مهارکننده فعالیت سیستم آنزیمی سیتوکروم P450 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 دنیتریفیکاسیون 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 از ۵۰۰ باکتری دارای این قابلیت، باکتری سودوموناس استوتزری که اولین بار توسط بوری و همکارش استوتز 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).

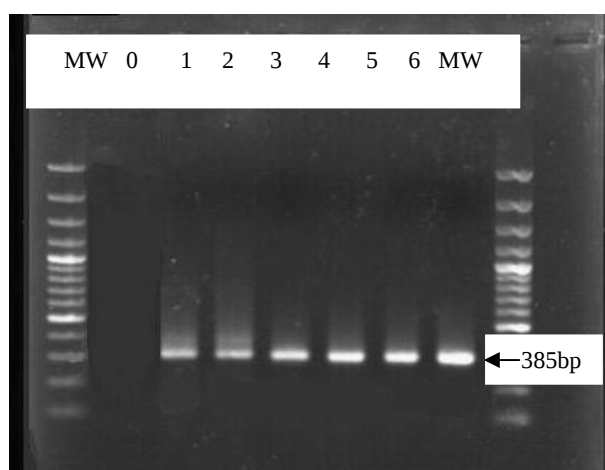
با توجه به قابلیت‌ها و مزیت‌های بالقوه آنزیم‌ها و توسعه روش‌های جدید مولکولی، تا بحال تحقیقات زیادی روی توسعه فرایندهای آنزیمی جهت تصفیه فاضلاب، مواد زائد جامد و مواد زائد خطرناک و خاک‌های آلوده انجام شده است (۱۷-۱۵). دیوید و لام^۱ در مطالعه خود نشان دادند که در بین سیستم‌های آنزیمی مختلف، سیستم آنزیمی سیتوکروم P450 از مهمترین و مؤثرترین آن‌ها در تجزیه ترکیبات آلی مقاوم و زنبیوتیک‌ها از طریق ترسیب و یا تبدیل به محصولات معدنی و یا قابل تجزیه بیولوژیک و یا تبدیل به مواد با خطر کمتر با محلول کردن آن‌ها در آب است. این آنزیم‌ها در بین باکتری‌ها در گونه‌های مختلف باکتری‌های سودوموناس هم شناسایی شده اند و سیتوکروم P450 جدا شده از سودوموناس پوتیدا به عنوان اولین سیتوکروم P450 جدا شده از باکتری‌ها می باشد (۱۸).

این سیستم آنزیمی قابلیت‌های معجزه آسایی را برای سودوموناس‌ها فراهم نموده‌اند. انجام فرایند دنیتریفیکاسیون و کمک 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 P450 می‌شوند. مترونیدازول، سایمیتدین، اریترومایسین و کلرامفنیکل از جمله عوامل مهارکننده و ریفامپین، فنوباریتال، پریمیدین و کاربامازین 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

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 سلول‌های باکتری‌ها، آزمون‌های بیوشیمیایی جهت تشخیص افتراقی و PCR (شکل ۲)، باکتری‌های دارای قابلیت دنیتریفیکاسیون شناسایی و جداسازی گردید.



شکل ۲- 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 آنواکسیک 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 آب ($C_4H_4Na_2O_4$)، یک گرم پتاسیم هیدروژن فسفات ($K_2HPO_4 \cdot 2H_2O$)، یک گرم نیترات سدیم ($NaNO_3$)، ۰/۲ گرم کلرید پتاسیم (KCl)، ۰/۲ گرم سولفات منیزیم هفت آب ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)، یک میلی‌گرم سولفات آهن ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) در یک لیتر آب مقطر

آنزیم‌های اصلی درگیر در متابولیسم ویژه داروها، یکی از مهمترین بخش‌های مطالعات اخیر است (۲۱-۲۰). ادوارد^۱ و همکاران اثر چند دارو را به عنوان مهارکننده فعالیت آنزیم سیتوکروم P450 بر روی تجزیه ۹ متیل آنتراسن بررسی نمودند. نتایج آن‌ها نشان داد اثر ممانعت‌کنندگی بعضی از آن‌ها خیلی قوی بود و بعضی هم در غلظت‌های پایین، دارای اثر ممانعت‌کنندگی تا ۸۰٪ بودند (۲۲). در مطالعه دیگری نیز اثر ممانعت‌کنندگی 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 P450 در این باکتری (۲۵)، و نقش بازدارندگی و مهارکنندگی ترکیبات دارویی ایمیدازولی مثل مترونیدازول و کتوکونازول روی سیستم آنزیمی سیتوکروم P450 (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^۲ انجام شد. ابتدا نمونه‌برداری از فاضلاب خام یکی از صنایع پتروشیمی که محتوی نیترات بالا (۱ g/l N) بود، انجام شد. نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا قبل از آزمایشات نگهداری گردید. در آزمایشگاه، آزمایشات لازم مطابق روش‌های

1. Edvardo

2. One Variable At a Time

دو بار تقطیر شده استفاده شد. علاوه بر ماکرونوترینت‌ها، میکرونوترینت‌های لازم نیز به محیط کشت اضافه گردید و $pH=7.2$ 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 در pH 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 غلظت‌های 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 از ۲۴-۴۸ ساعت، از آن‌ها برای تلقیح به محیط‌های مورد آزمایش استفاده شوند. قبل از شروع هر نوبت از آزمایشات غلظت‌های مورد نیاز محلول مترونیدازول در آب 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 غلظت‌های 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. بطری‌ها در دمای $25^{\circ}C$ روی دستگاه شیکر با سرعت ۱۲۵ دور در دقیقه قرار داده شد و در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت بعد از کشت،

نیترات آن به کمک اسپکتروفتومتر UV-Vis (Unico Model 2001) در طول موج 220 nm اندازه گیری شد و غلظت مؤثر و بازدارنده مترونیدازول برای هر کدام از غلظت‌های نیترات، تعیین شد. اندازه گیری‌ها در طول موج 275 nm هم جهت جلوگیری از خطای ناشی از وجود احتمالی مواد آلی انجام شد (۲۴،۲۶).

در ادامه از باکتری‌های مهارشده در حضور 1600 mg/l و 800 mg/l 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.

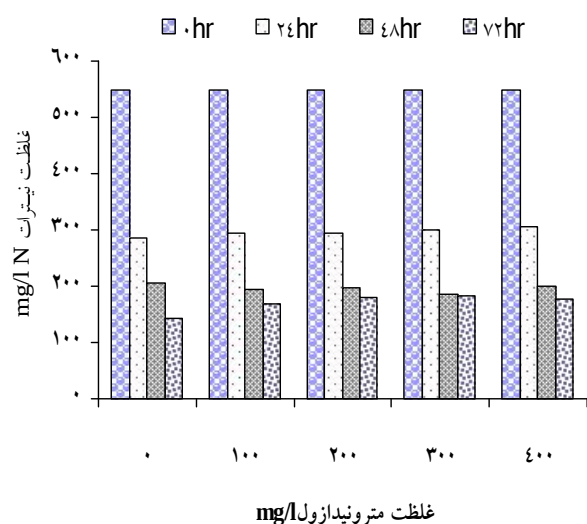
ابتدا قبل از قرائت نتایج نمونه‌ها به روش اسپکتروفتومتری، نمودار استاندارد خطی نیترات در طول موج 220 nm نانومتر تهیه و به کمک آن، سایر نتایج حاصل از قرائت جذب نمونه‌ها محاسبه شد (۲۶).

در مرحله 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 ۱۴۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند و سپس روآب حاصل برای اندازه‌گیری نیترات به روش استاندارد استفاده گردید (۲۶).

در حضور غلظت ثابت 800 mg/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 ۳-۵).

آزمون آماری آنالیز واریانس دو طرفه در حضور غلظت 800 mg/l مترونیدازول بین هر کدام از دو گروه غلظت‌های $171/2$ و $40/2$ ، 590 و $40/2$ با 590 mg/l نیترات بعد از 72 ساعت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار ($P < 0/05$) بین گروه‌ها در خصوص اثر مترونیدازول روی میزان بازدارندگی و فعالیت دنیتریفیکاسیون سودوموناس استوتزری می‌باشد (نمودارهای ۳-۵).



نمودار ۲- حذف 550 mg/l نیترات توسط باکتری سودوموناس استوتزری، در حضور 300 ، 100 ، 200 و 400 mg/l مترونیدازول در دمای 27°C و $\text{PH}=7/2$

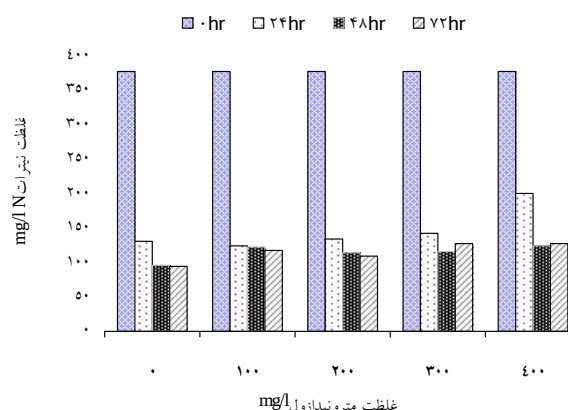
آزمایشات اثر غلظت‌های مختلف مترونیدازول (غلظت 100 الی 1600 mg/l) و نیترات (غلظت 45 تا 590 mg/l) بر قابلیت دنیتریفیکاسیون سودوموناس استوتزری در زمان‌های 24 و 48 و 72 ساعت، تحت شرایط مذکور انجام شد. نتایج حاصل به کمک نرم افزار SPSS 13 و آزمون آماری آنالیز واریانس مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها

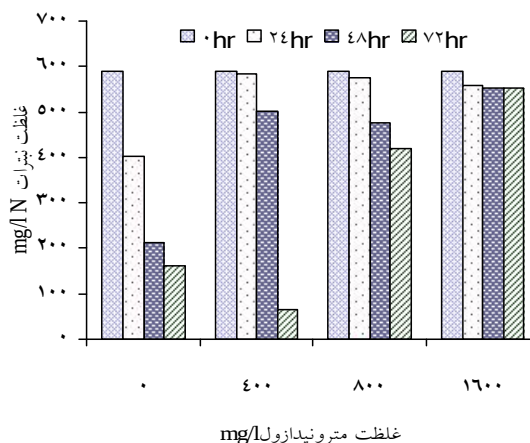
جداسازی و شناسایی باکتری سودوموناس استوتزری از فاضلاب خانگی به کمک روش‌های معرفی شده انجام شد. تصویر ژل الکتروفورز مربوط به تکثیر ژن *nosZ* سودوموناس استوتزری حاصل از PCR در شکل ۲ مشاهده می‌شود.

با توجه به این که حداکثر طول موج جذبی مترونیدازول در طیف الکترومغناطیسی بالای 275 نانومتر می‌باشد، حضور مترونیدازول در اندازه‌گیری غلظت نیترات و قرائت نتایج نمونه‌ها، اختلالی ایجاد نکرده و تأثیری نداشت.

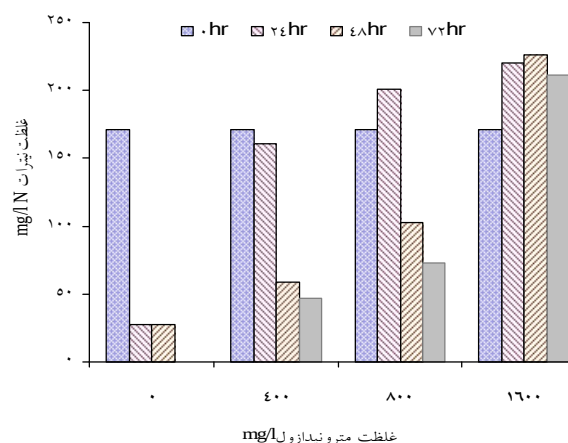
عدم تأثیر بازدارندگی غلظت‌های مختلف مترونیدازول تا 400 mg/l ، بر میزان کارایی سودوموناس استوتزری جهت حذف غلظت‌های مختلف نیترات، در نمودارهای ۱ و ۲ مشاهده می‌شود.



نمودار ۱- حذف 376 mg/l نیترات توسط باکتری سودوموناس استوتزری، در حضور 300 ، 200 ، 100 و 400 mg/l مترونیدازول در دمای 27°C و $\text{PH}=7/2$

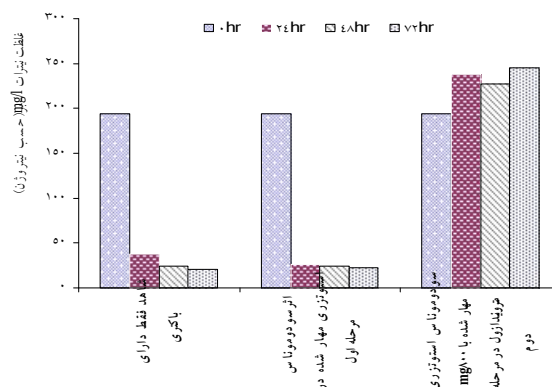


نمودار ۵- حذف ۵۹۰ mg/l نیترات توسط باکتری‌های سودوموناس استوتزری در حضور ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ mg/l مترونی‌دازول در دمای ۲۷°C و pH=۷/۲



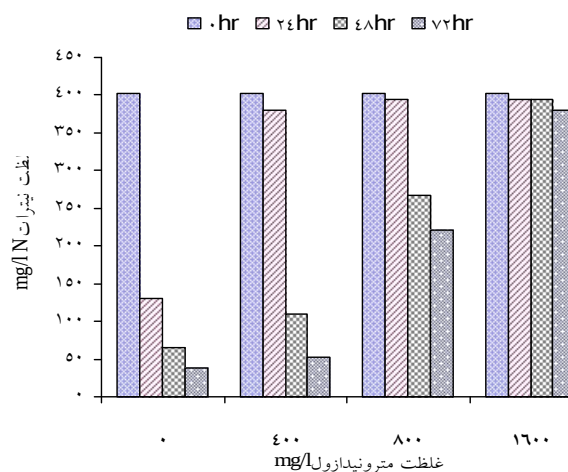
نمودار ۳- حذف ۱۷۱/۴۲ mg/l نیترات توسط باکتری سودوموناس استوتزری در حضور ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ mg/l مترونی‌دازول در دمای ۲۷°C و pH=۷/۲

غلظت‌های ۸۰۰ و ۱۶۰۰ mg/l مترونی‌دازول اختلاف معنی‌داری با یکدیگر در بازدارندگی فعالیت دنیتریفیکاسیون باکتری سودوموناس استوتزری در حضور غلظت‌های ۱۷۱ و ۴۰۲ و ۵۹۰ mg/l نیترات بعد از ۷۲ ساعت داشتند ($P=0/02$ ، $P=0/03$ ، $P=0/04$) (نمودارهای ۳-۵). در بعضی آزمون‌ها، غلظت نیترات بعد از تماس با ۸۰۰ و ۱۶۰۰ mg/l مترونی‌دازول ابتدا بیشتر از غلظت اولیه شده است (نمودار ۳).



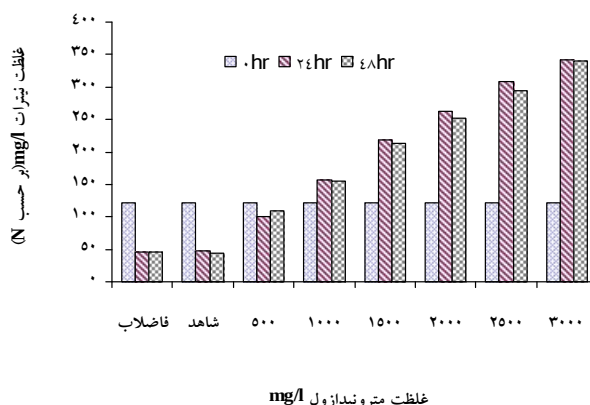
نمودار ۶- حذف ۱۹۴ mg/l نیترات توسط سودوموناس استوتزری طی دو مرحله تماس با ۸۰۰ mg/l مترونی‌دازول

در حالی که غلظت ۴۰۰ mg/l مترونی‌دازول تأثیر معنی‌داری بر بازدارندگی فعالیت دنیتریفیکاسیون باکتری مذکور در حضور غلظت‌های مختلف نیترات نداشت، غلظت ۱۶۰۰ mg/l در حضور تمام غلظت‌های مختلف نیترات، تقریباً اثر بازدارندگی ۱۰۰٪ داشت (نمودارهای ۳-۵).



نمودار ۴- حذف ۴۰۲ mg/l نیترات توسط باکتری سودوموناس استوتزری، در حضور ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ mg/l مترونی‌دازول در دمای 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 800 mg/l مترونی‌دازول به این باکتری‌ها، اثر بازدارندگی آن بر فعالیت دنیتریفایری باکتری سودوموناس استوتزری 100% بود (نمودار ۶).

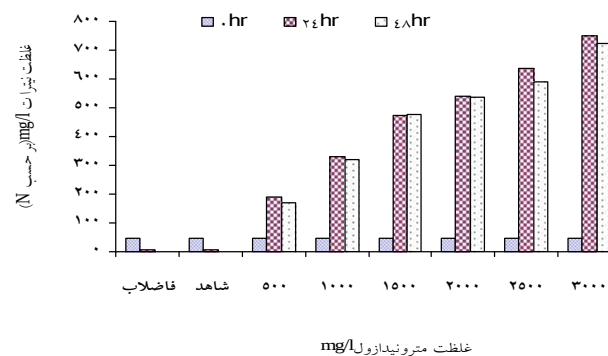


نمودار ۹- حذف $121/78 \text{ mg/l}$ نیترات پساب خروجی حوض ته‌نشینی توسط سودوموناس استوتزری درحضور و عدم حضور غلظت‌های مختلف مترونی‌دازول دردمای 27°C و $\text{PH}=7/2$ اثر مهارکنندگی مترونی‌دازول بر کارایی سودوموناس استوتزری در نمونه‌های فاضلاب خام، خروجی حوض هوادهی و پساب خروجی حوض ته‌نشینی ثانویه، نسبت به فاضلاب مصنوعی در غلظت‌های پایین‌تری اتفاق افتاد (نمودارهای ۷-۹).

بحث و نتیجه‌گیری

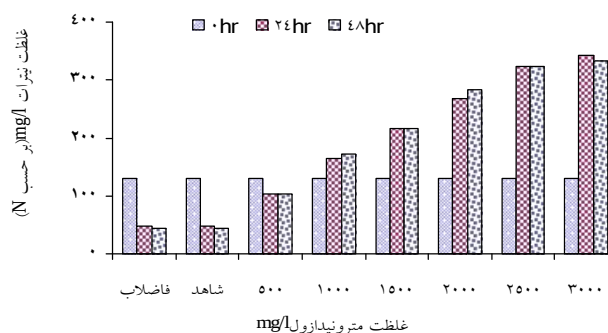
در این تحقیق، اثر مترونی‌دازول بر بازدارندگی فعالیت باکتری سودوموناس استوتزری به عنوان یک باکتری دنیتریفایر مورد مطالعه قرار گرفت. انتخاب سودوموناس استوتزری در این تحقیق به علت قدرت بالای دنیتریفیکاسیون این باکتری و حضور سیستم آنزیمی سیتوکروم P450 در آن می‌باشد. دنیتریفیکاسیون به وسیله این قبیل باکتری‌ها، بخشی از سیکل جهانی نیتروژن است و طی چهار مرحله واکنش‌های مختلف، نیترات از طریق نیتريت (NO_2)، نیتريك اكساید (NO)، نیتروس اكساید (N_2O)

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.



نمودار ۷- حذف $45/38 \text{ mg/l}$ نیترات از فاضلاب خام توسط سودوموناس استوتزری درحضور غلظت‌های مختلف مترونی‌دازول دردمای 27°C و $\text{PH}=7/2$

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 کلی‌های ریز و سوزنی شکل روی محیط BHIA بعد از ۴۸-۷۲ ساعت رشد کردند.



نمودار ۸- حذف 130 mg/l نیترات فاضلاب خروجی حوض هوادهی توسط سودوموناس استوتزری درحضور غلظت‌های مختلف مترونی‌دازول دردمای 27°C و $\text{PH}=7/2$

و نیتروژن (N_2) احیاء می‌شود (۲۹). هنریچ والتر^۱ در مطالعه اثر دنیتریفیکاسیون باکتری سودوموناس استوتزری با توجه به حضور سیستم آنزیمی سیتوکروم P450، 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 P450 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 ۱-۲ و مقایسه نتایج با نمونه شاهد بدون مترونیدازول، نشان دهنده عدم تأثیر مترونیدازول در غلظت‌های تا 400 mg/l ، بر کاهش میزان فعالیت دنیتریفیکاسیون سودوموناس استوتزری بعد از ۷۲ ساعت تماس در نمونه‌های تهیه شده می‌باشد و تفاوت معنی‌داری هم بین آن‌ها مشاهده نشد. گمز^۲ و همکاران هم نشان دادند، آنتی‌بیوتیک‌های مختلف تا غلظت 250 mg/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 غلظت 800 mg/l مترونیدازول به بالا می‌باشد. تجزیه و تحمل تا

غلظت 800 mg/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 زنبیوتیک‌ها، به متابولیت‌های ثانویه می‌باشد. به خصوص وقتی مهار فعالیت دنیتریفیکاسیون 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 دنیتریفیکاسیون 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 می‌باشد و این آنتی‌بیوتیک اثری روی مرگ و میر این باکتری نداشته است. معمولاً انتظار می‌رود که مقاومت آنتی‌بیوتیکی در محیط‌های آبی بیشتر باشد. در مطالعه انجام شده توسط توماس^۳ 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

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 می‌دهد، مهار فعالیت باکتری سودوموناس استوتزری در حضور 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 می‌شود 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 می‌تواند ناشی از تجزیه مترونیدازول توسط سودوموناس استوتزری به عنوان سوبسترای ثانویه، به متابولیت‌های ثانویه و تولید نیترات باشد. چون مترونیدازول از جمله مهار کننده فعالیت سیستم آنزیمی سیتوکروم P450 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 باکتری‌های 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 آب‌های سطحی و زیر زمینی می‌شوند.

بررسی اثر مترونیدازول 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 ۷-۹)، 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 پایین‌تر نیترات می‌باشد. یعنی در فاضلاب خام ورودی که نیترات کمتری دارد، اثر مهارکنندگی مترونیدازول در غلظت‌های کمتر از 500 mg/l و در نمونه‌های خروجی حوض ته نشینی ثانویه و خروجی حوض هوادهی، مترونیدازول در غلظت بالاتر از 500 mg/l اثر مهار کنندگی خود را نشان می‌دهد.

نمودارهای ۷-۹، 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 500 mg/l مترونیدازول، فعالیت دنیتریفایری باکتری‌های موجود در نمونه‌های 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 P450 می‌تواند خلاء حضور آن‌ها را پر کرده و به جای آن‌ها عمل نماید (۳۲).

مهار فعالیت دنیتریفایری باکتری سودوموناس استوتزری به منزله مهار سیستم‌های آنزیمی فعال آن است. مهار سیستم آنزیمی سیتوکروم P450 در باکتری سودوموناس استوتزری در

حضور غلظت‌های بازدارنده مترونیدازول، بدلیل تشکیل کمپلکس متابولیت‌های دارویی و آنزیم و یا باند شدن آن با مترونیدازول می‌باشد (۳۳). بانرزی^۱ 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 آن‌هاست. 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 P450 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 P450 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 می‌باشد، 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 P450 باکتریایی در متابولیسم و کاتالیز محدوده گسترده ای از زنبیوتیک‌ها 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 P450 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

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 بالقوه‌ای 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 زئوبیوتیک‌ها و ترکیبات آلوده‌کننده 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 آنزیم‌ها و دسترسی راحت‌تر به آنزیم‌ها از طریق جداسازی بهتر و روش‌های خالص‌سازی جدید شده است (۴۱-۴۲).

ترکیبات دارویی مثل آنتی بیوتیک‌ها از فرایندهای متداول تصفیه بیولوژیک فاضلاب عبور کرده و بخش عمده‌ای 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 بر فعالیت 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 می‌شوند و به عنوان مهار کننده فعالیت باکتری‌های بیهوازی عمل می‌کنند (۷-۶). متناسب با نوع آلاینده‌ها و باکتری‌های مورد مطالعه ممکن است غلظت‌های مهار کنندگی آنتی‌بیوتیک‌ها متفاوت باشد، ولی بررسی نتایج مطالعه فوق و یافته‌های این تحقیق و غلظت بالای مهار کنندگی 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 کاستی‌ها و مشکلات عمده‌ای 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 حمایت‌های مالی و از آقای دکتر یونس پناهی از مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا... (عج) به خاطر مساعدت و رهنمودهای ایشان در انجام این تحقیق تشکر و قدردانی می‌کنیم.

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 fetoplacental 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*. *Micriobiol 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-450 in 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/isbn9514258649/html/x246.html>.
18. David C, Lam B. The Cytochrome p450 complement (cypome) of *Streptomyces Coelicolor A3* (2). *JBC Papers in press.* 2002.

19. Wagne A, Kradyam B. Text book Applied Therapeutics. Lippin CO It 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 Genetics, 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 *fmr*-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 . Amplichip cyp450 test . 24 Tests P/N: 04591402 190.
33. Oulu University library. drug metabolism. Chapter 2. Review of the literature 2006/16/11. <http://herkules.oulu.fi/isbn9514270231/html/c146.html>.

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.