

Effect of Zero Valent Iron Nanoparticles on Removal of Antibiotic Resistant Genes of Heterotrophic Bacteria in Urban Wastewater

Jabber Yeganeh¹,
Nasser Mehrdadi²,
Gholamreza Nabi bidhendi²,
Majid Baghdadi³,
Rahim Aali⁴

¹ PhD Student in Environmental Engineering, Faculty of Environmental Engineering University of Tehran Aras International Campus, Tehran, Iran

² Professor, Department of Environmental Engineering, Faculty of Environmental Engineering University of Tehran, Tehran, Iran

³ Associate Professor, Department of Environmental Engineering, Faculty of Environmental Engineering University of Tehran, Tehran, Iran

⁴ Assistant Professor, Department of Environmental Health, Faculty of Medical Sciences Khoy, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

(Received September 18, 2017 ; Accepted November 13, 2017)

Abstract

Background and purpose: Application of nanomaterials is growing in removing various contaminants, pharmaceuticals, and in deactivation of water or sewage bacteria. However, the ability to degrade or eliminate the genetic components of bacteria by nanoparticles and preventing the increasing trend of antibiotic resistance from sewage treatment plants needs to be further investigated. This study aimed at eliminating the genetic components (antibiotic resistance genes) of heterotrophic bacteria from wastewater by Zero Valent Iron Nanoparticles.

Materials and methods: To eliminate genetic components of bacteria, the ability of nZVI was measured by cellular and molecular methods to remove the genetic components of the bacteria. Selected genes included *TetW* (tetracycline) *Ctx-m-32* (Ceftazidime), and *CmlA1* (Chloramphenicol). Polymerase chain reaction (PCR) and specific primers were used to detect resistant genes.

Results: The average concentrations of HPC and ARBs were 1.68×10^5 and 2.58×10^4 cfu/mL in primary effluent. The mean values for ARGs were (*TetW*)= 33.71 ± 10.66 , (*CmlA1*)= 57.71 ± 11.60 , and (*Ctx-m-32*)= 37.71 ± 4.85 ng/ μ l after the experiments. The proposed software model for HPC and ARBs included nZVI= 20-23 mg/l, Q_{N2} =7-7.8l/min, and time=23-30 min and for ARGs it included nZVI=28-30 mg/l, Q_{N2} =7-7.8l/min, and time=30-38 min.

Conclusion: Zero Valent Iron Nanoparticles can degrade and eliminate heterotrophic bacteria, and decompose and eliminate the genetic components of bacteria and antibiotic resistance genes. Unlike the chlorination units of sewage treatment plants that increase antibiotic resistance among effluent bacteria, iron significantly reduces the populations of antibiotic resistant bacteria. Compared to *TetW* and *CmlA1*, the *Ctx-m-32* genes have high stability and durability against nZVI.

Keywords: wastewater treatment, antibiotic resistance, heterotrophic bacteria, nanoparticles, PCR

J Mazandaran Univ Med Sci 2018; 28 (160): 28-44 (Persian).

بررسی اثر نانوذرات آهن صفر ظرفیتی بر حذف ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری های هتروتروف پساب فاضلاب شهری

جابر یگانه^۱

ناصر مهردادی^۲

غلامرضا نبی بیدهندی^۲

مجید بغدادی^۳

رحیم عالی^۴

چکیده

سابقه و هدف: استفاده از نانومواد برای از بین بردن آلاینده های مختلف، مواد دارویی و غیرفعال سازی باکتری های مختلف آب یا فاضلاب در حال پیشرفت است، اما توانایی تخریب و یا حذف اجزای ژنتیکی باکتری ها توسط نانوذرات در پی آن امکان کنترل گسترش مقاومت آنتی بیوتیکی در تصفیه خانه ها به عنوان یک مبحث جدید نیاز به بررسی دارد. هدف اصلی این تحقیق حذف اجزای ژنتیکی (پلاسمیدها و کاسمیدهای حامل ژن های مقاومت دارویی) باکتری های هتروتروف از پساب، توسط نانوذرات آهن صفر ظرفیتی است.

مواد و روش ها: سنجش توانایی نانوذرات آهن صفر ظرفیتی در حذف اجزای ژنتیکی باکتری به روش سلولی مولکولی و ژن های انتخابی *TetW* (تتراسایکلین) *Ctx-m-32*، (سفنازیدیم) و *CmlA1* (کلرامفنیکل) بود. برای تشخیص ژن های مقاوم از واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) و پرایمرهای اختصاصی استفاده شد.

یافته ها: میانگین غلظت HPC و ARBs در پساب اولیه 1.05×10^6 cfu/ml و 2.58×10^4 بود. میانگین ARGs بعد از انجام آزمایشات $(TetW) = 33.71 \pm 10.66$ ng/ μ l، $(Ctx-m-32) = 37.71 \pm 4.85$ ng/ μ l و $(CmlA1) = 57.71 \pm 11.60$ ng/ μ l حاصل شد. مدل پیشنهادی نرم افزار برای HPC و ARBs شامل $nZVI = 20-23$ mg/l، $Q_{N2} = 7-7.8$ l/min، $time = 23-30$ min و برای ARGs نیز $nZVI = 28-30$ mg/l و $Q_{N2} = 7-7.8$ l/min و $time = 30-38$ min بود.

استنتاج: $nZVI$ قادر است علاوه بر تخریب و حذف باکتری های هتروتروف، اجزای ژنتیکی باکتری ها و ژن های عامل مقاومت آنتی بیوتیکی را تخریب و تجزیه نماید و بر خلاف تاسیسات کلر زنی تصفیه خانه های فاضلاب که منجر به افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی در بین باکتری های پساب خروجی می شوند، کاهش محسوسی در جمعیت میکروبی باکتری های مقاوم آنتی بیوتیکی به وجود آورد. ژن های *Ctx-m-32* در برابر $nZVI$ نسبت به *TetW* و *CmlA1* مقاومت بالایی دارند.

واژه های کلیدی: تصفیه فاضلاب، مقاومت آنتی بیوتیکی، باکتری های هتروتروف، نانو ذرات، PCR

مقدمه

باقیمانده آنتی بیوتیک های دفع شده به محیط زیست
به صورت مستقیم و غیر مستقیم بر ساختار ژنتیکی بعضی
از میکروارگانیسم های غیرمقاوم اثر گذاشته و باعث
ایجاد مقاومت آنتی بیوتیکی در آن ها می شود (۱-۳).

E-mail: jabber.yeganeh@ut.ac.ir

مؤلف مسئول: جابر یگانه - تهران: دانشگاه تهران، دفتر پردیس بین الملل دانشگاه تهران

۱. دانشجوی دکتری مهندسی محیط زیست، پردیس بین الملل دانشگاه تهران، تهران، ایران

۲. استاد، گروه مهندسی مهندسی محیط زیست، دانشکده محیط زیست، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۳. استادیار، گروه مهندسی محیط زیست، دانشکده محیط زیست، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۴. استادیار، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده علوم پزشکی خوی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۶/۲۷ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات:

۱۳۹۶/۷/۳ تاریخ تصویب: ۱۳۹۶/۸/۲۲

دارد. توانمندی آن در از بین بردن آلاینده های آلی، باکتری ها و برخی از آلاینده های معدنی در درجه اول مربوط به خاصیت اهدا الکترونی به عنوان احیا کننده و یا کاتالیزوری قوی است (۱۲،۱۱) مکانسیم حذف باکتری ها توسط نانوذرات آهن صفر ظرفیتی، آسیب فیزیکی و اختلال در یکپارچگی غشای سلولی، تراوش محتویات داخل سلولی، آسیب پروتئین های باکتری و DNA و تداخل با تنفس باکتری می باشد (۱۳). برخی محققان این سمیت را اعمال یک سری تنش اکسیداتیو توسط رادیکال های آزاد شده ROS^۵ می دانند (۱۵،۱۴). واکنش پذیری بالای الکترون های آزاد موجود در سطح این نانوذرات، ذرات بدون پوشش را در مقابل فاکتورهای محیطی حساس تر کرده (۱۶). و واکنش پذیری و کارایی آن ها را تحت تأثیر قرار می دهد (۱۷). برای پایدار سازی نانوذرات آهن صفر ظرفیتی فعال با نیمه عمر بالا، از پوشش های مختلف سطحی و پلیمرهای زیستی از قبیل نشاسته، کربوکسی متیل سلولز^۶ و صمغ گوار^۷ استفاده می شود (۱۸،۱۲). این مواد کارایی و فعالیت نانوذرات را تا حدود زیادی کاهش (زمان های تماس طولانی، غلظت های بالا) می دهند. از طرفی استفاده از نانوذرات آهن ساپورت شده و روکش دار منجر به افزایش زمان ماند هیدرولیکی و افزایش حجم تاسیسات گندزدایی و تولید لجن مازاد می شود که خود منجر به افزایش اثرات منفی آن ها بر محیط زیست (تجمع و رسوب بر روی سطح ریشه گیاهان و ...) خواهد شد (۱۹-۲۱).

با توجه به این که نانوذرات آهن صفر ظرفیتی، به شدت واکنش پذیر بوده و در مجاورت هوا سریعاً اکسید می شوند، بهترین شرایط کاری برای nZVI تحت شرایط بی هوازی است (۲۲). کاهش اکسیژن محلول و افزایش پتانسیل اکسیداسیون و احیا^۸ (ORP) (ORP ≤ -400mV) شرایط ایده آلی به وجود می آورد که تا حدود زیادی اکسیداسیون سریع nZVI را به تاخیر می اندازد. به

فاضلاب های شهری یکی از منابع عمده تخلیه باقیمانده آنتی بیوتیک ها و باکتری های دارای مقاومت آنتی بیوتیکی به محیط می باشند. واحدهای فرایندی و عملیاتی تاسیسات تصفیه فاضلاب شهری در ایجاد مقاومت در باکتری های محیطی و انتقال ژن های مقاوم باکتریایی نقش مهمی را ایفا می کنند، ترکیبات آلی و معدنی را نیز از فازی به فاز دیگر منتقل می کنند و بر کاهش و یا حذف باکتری های مقاوم آنتی بیوتیکی^۱ (ARB) و ژن های کد کننده مقاومت آنتی بیوتیکی^۲ (ARGs) تأثیری ندارند. تنها واحدی که امکان حذف این عوامل آلاینده را داراست واحد گندزدایی می باشد (۴). واحد گندزدایی نیز الزاماً منجر به کاهش این عوامل نشده بلکه در برخی مواقع به علت فشار بر این باکتری ها باعث تشدید مقاومت و انتشار بیش تر آن ها می شود. متأسفانه باکتری های آسیب دیده به وسیله این فرایند نیز می توانند زنده بمانند و تحت دوز پائین کلر مجدداً رشد کنند (۵، ۶) و لیکن پاره شدن دیواره باکتری ها و حتی کشته شدن آن ها پایان راه نبوده و پلاسمیدها و کاسمیدهای حامل ژن های مقاومت دارویی توسط انتقال افقی ژن^۳ (HGT) در مسیری غیر از انتقال عمودی ژن ها^۴ در بین گونه ها و نسل های مختلف باکتری های هتروترف منتقل می شود که یکی از مهم ترین عوامل گسترش مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری هاست (۷-۹). نانوذره آهن صفر ظرفیتی (nZVI) به دلیل ساختار مولکولی و اتمی، بسیار واکنش پذیر بوده و از ویژگی های مغناطیسی، مکانیکی، الکتریکی، کاتالیتیکی و شیمیایی ویژه ای برخوردار است (۱۰،۸). مزایای آن فراوانی، واکنش سریع، هزینه نسبتاً پایین و عدم تشکیل ترکیبات سمی است. nZVI در واقع از یک هسته از آهن صفر و مخلوط اکسید آهن (II) و آهن (III) ظرفیتی روی پوسته آن تشکیل گردیده است. این نانوذره، توان حذف و کاهش آلاینده های مختلف را

5. Reactive oxygen species
6. Carboxymethylcellulose
7. Guar gum
8. oxidation reduction potential

1. Antibiotic Resistance Bacteria
2. Antibiotic Resistance Genes
3. Horizontal gene transfer
4. vertical transfer

باکتری‌های هتروتروف از پساب، توسط نانوذرات آهن صفر ظرفیتی بود.

مواد و روش‌ها

سنتز نانوذره آهن صفر ظرفیتی

برای سنتز نانوذره آهن صفر ظرفیتی از NaBH_4 و $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (ساخت شرکت Merck آلمان) و گاز نیتروژن با خلوص ۹۹/۹۹ درصد (شرکت گازهای طبی ارومیه) استفاده گردید. در ابتدا مقدار ۲۴ آب دو بار تقطیر و ۶ ml اتانول با 0.2 mol (۰/۲ gr) (0.5406) کلرید آهن هیدراته $(\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O})$ مخلوط و در داخل بالنی با گاز N_2 اکسیژن زدایی گردید. محلول حاصل، با 0.1 mol (۰/۳۷۸۳ gr) بوروهیدرید سدیم (NaBH_4) که در ۱۰۰ ml آب دو بار تقطیر حل شده و با گاز N_2 اکسیژن زدایی شده بود، با شدت ۳۰-۴۰ قطره در دقیقه بر روی دستگاه استیرر (ساخت jenway انگلستان) و با دور ۱۵۰ rpm مخلوط و پس از افزودن تمام بوروهیدرید سدیم، مجدداً به مدت ۳۰ دقیقه به هم زده شد تا واکنش کامل گردد. نانوذرات آهن شکل گرفته از محلول سنتز شده تحت سانتریفوژ ۳۰۰۰ rpm به مدت ۵ min جداسازی و سه مرتبه با اتانول ۹۶ درصد شستشو و رسوبات حاصله توسط دستگاه آون خلا آزمایشگاهی تحت خلاء و در دمای 50°C در مدت ۲۴ ساعت خشک شد (۲۶، ۲۷).

شناسایی مولکولی ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی

جهت انتخاب ژن‌های کد کننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی، از بین سه گروه پرمصرف، سه ژن مقاومت در نظر گرفته شد. سعی شد ژن‌های انتخابی از مطالعات مختلف مقاومت آنتی‌بیوتیکی در محیط‌های کلینیکال کشور باشد. ژن‌های انتخابی شامل ژن $TetW$ عامل مقاومت به تتراسایکلین (۲۸، ۲۹) ژن $Ctx-m-32$ عامل مقاومت به سفنازیدیم (۳۰) و ژن $CmlA1$ عامل مقاومت

کارگیری یک گاز بی اثر مانند نیتروژن جهت همراهی nZVI در تزریق آن به محیط‌های آبی منجر به کاهش اکسیژن محلول در این محیط‌ها شده و تزریق پنوماتیک آن نیز شرایط اختلاط سریع nZVI را در محیط‌های آبی فراهم می‌نماید (۲۳). در این صورت به طور قابل توجهی حجم مواد مصرفی کاهش یافته و تحرک و پراکندگی نانو ذره آهن صفر ظرفیتی در پساب فاضلاب‌های شهری افزایش می‌یابد (۲۴). به واقع نیتروژن گازی بی‌اثر، بی‌رنگ و غیر قابل اشتعال است و عمدتاً به عنوان پرکننده در صنایع مختلف استفاده می‌شود. در مطالعات مربوط به آب‌های زیرزمینی یا محیط‌های آبی نیز از گاز نیتروژن تحت فشار ۲-۳ بار استفاده شده است (۲۳). در این تحقیق از تزریق پنوماتیک گاز نیتروژن، جهت پایدار سازی نانوذرات، کاهش اکسیژن محلول و غلبه بر دو فرایند هم‌آوری^۱ و ته‌نشینی^۲ نانو ذره آهن صفر ظرفیتی در پساب فاضلاب‌های شهری و نهایتاً افزایش راندمان حذف باکتری در کم‌ترین زمان ممکن استفاده شده است. در نهایت nZVI به Fe_2O_3 و Fe_3O_4 تبدیل می‌شود که به طور بالقوه برای محیط زیست خوش خیم است و به وفور بر روی زمین وجود دارد (۲۵).

در این تحقیق، طراحی آزمایشات توسط نرم افزار Design Expert 10 و به روش سطح پاسخ^۳ RSM و متد مرکب مرکزی^۴ CCD انجام شد. استفاده از نانو مواد برای از بین بردن آلاینده‌های مختلف، مواد دارویی و غیرفعالسازی باکتری‌های مختلف آب یا فاضلاب در حال پیشرفت است و محققین به نتایج خوبی دست یافته اند، اما توانایی تخریب و یا حذف اجزای ژنتیکی باکتری‌ها توسط نانوذرات و در پی آن امکان کنترل گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در تصفیه‌خانه‌ها به عنوان یک مبحث جدید نیاز به بررسی دارد. هدف اصلی این تحقیق حذف اجزای ژنتیکی (پلاسمیدها و کاسمیدهای حامل ژن‌های مقاومت دارویی)

1. Aggregation
2. Settling
3. response surface methodology
4. Central Composite Design

به کلرامفنیکل (۷، ۲۸، ۳۰) بود. در پساب راکتور ناپیوسته متوالی^۱ (SBR) مربوط به تصفیه خانه فاضلاب شهری، حضور ژن های مقاومت به آنتی بیوتیک های مورد نظر در باکتری های مقاوم توسط آزمایش HPC اصلاح شده تایید شد. محیط کشت مصرفی R₂A (Merck آلمان) بود. ۱۵ g/lit از آن در آب مقطر حل و بعد از استریلیزاسیون، آنتی بیوتیک خالص از هر گروه به صورت مجزا بر اساس استاندارد CLSI اضافه گردید (۳۱، ۳۲). هم چنین ماده ضد قارچ نیستاتین^۲ با غلظت ۲۰۰ µl/mL برای جلوگیری از رشد قارچ اضافه گردید (۳۳، ۳۴). نمونه های پساب SBR تا رقت ۱۰^{-۴} و برای نمونه های اخذ شده از پایلوت تا رقت ۱۰^{-۲} انجام و ۱۰۰ µl از هر رقت کشت داده شد. پلیت ها به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ °C انکوبه شدند. پس از شمارش کلنی های رشد یافته بر روی پلیت های بلانک و حاوی آنتی بیوتیک، از کلنی های تپیک و رشد یافته برای استخراج پلاسمید استفاده شد. مقدار مناسبی از کلنی های ایزوله شده در تیوب حاوی ۳۰۰ µl DDH₂O جمع آوری گردید. نمونه ها در ۸۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ min سانتریفوژ گردید. عمل شستشو دو بار تکرار و در ۱۴۰۰۰ rpm به مدت ۳ min سانتریفوژ گردید. مایع رویی دور ریخته شد و مواد ته نشین شده در ۵۰ µl DDH₂O معلق شدند. استخراج DNA باکتری ها و پلاسمیدهای آن ها از کیت های استخراج plasmid Tissue و DNA extraction mini kit (FAPDE050 Genomic DNA Extraction Mini Kit yektatajhezazma (YTA) شرکت (FATGK001) ساخت ایران) و طبق دستور العمل شرکت مربوطه و در سه مرحله انجام یافت. در مرحله لیز شدن دیواره سلولی باکتری، ۲۰۰ µl محلول حاوی (RNase A و Glucose / Tris/ EDTA = GTE) به توده باکتری اضافه و مخلوط گردید. سپس ۲۰۰ µl محلول (NaOH / SDS solution) و ۳۰۰ µl محلول (3M Sodium Acetate)

اضافه و به منظور خنثی کردن لیفات سوپرناتانت حاصل به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۸۰۰۰ rpm سانتریفوژ گردید. در مرحله ترسیب پروتئین، محلول رویی به ستون حاوی فیلتر سرامیکی انتقال و با اضافه نمودن ۱ µl ۴۰۰ از بافر ترسیب W1 به ستون و سانتریفوژ نمودن آن، مخلوط زیر ستون تخلیه، مجدداً ۷۰۰ µl بافر شستشوی حاوی اتانول (۹۶ درصد) به ستون اضافه و سانتریفوژ گردید. در مرحله ترسیب DNA، ستون به میکروتیوب جدید انتقال و با تخلیه ۵۰ µl، Elution Buffer به مرکز غشایی ستون و سانتریفوژ آن، DNA پلاسمیدی به میکروتیوب جدید منتقل گردید. DNA استخراج شده به مدت یک شب در دمای ۴ °C نگهداری و سپس در ۲۰ °C - تا زمان آزمایشات مولکولی نگهداری شدند. برای تشخیص ژن های مقاوم از واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) و پرایمرهای اختصاصی آن ها استفاده شد. مشخصات پرایمرها، توالی آن ها و نیز طول قطعه تکثیر شده در جدول شماره ۱ آورده شده است. پرایمرها با سفارش به شرکت تکاپوزیست در کره جنوبی تهیه و جرم لیوفیلیزه هر یک از آن ها با رقیق سازی های مورد نیاز به محلول کاری ۱۰ µM تبدیل گردیده و در واکنش PCR با غلظت ۰/۲ µM مورد استفاده قرار گرفتند. مدل دستگاه ترمال سایکلر به کار رفته در این تحقیق (EnglandXP Thermal Cycler) بود.

جدول شماره ۱: مشخصات پرایمرها و توالی آن ها مورد استفاده در

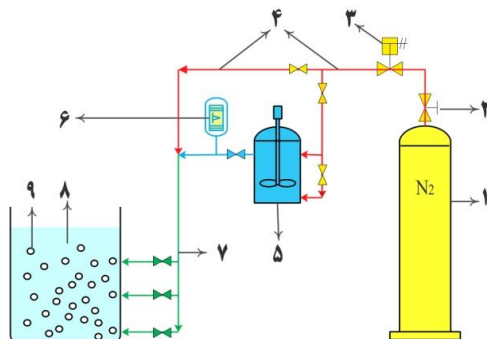
PCR		
ژن	جفت پرایمر	توالی (Sequences)
Tet W	tet(W)-F	GAGAGCCTGCTATATGCCAGC
	tet(W)-R	GGGCGTATCCACAATGTAAAC
Ctx-m32	CTX-m-32-F	CGTCACGCTGTGTAGGAA
	CTX-m-32-R	CGCTCATCAGCACGATAAAG
CmlA1	CML-F	TAGTTGGCGGTACTCCCTTG
	CML-R	GAATTGTGCTCGCTGTCGTA

بررسی محصول PCR بر روی ژل الکتروفورز^۳ با بافر TAE ۱/۵ درصد و رنگ آمیزی DNA Safe stain انجام شد. عمل الکتروفورز، در ولتاژ ۱۰۰ ولت و زمان ۳۰ دقیقه تنظیم، بعد از مدت زمان یاد شده، برای

3. Electrophoresis

1. Sequencing Batch Reactors
2. Nystatin

تنظیم فلوی جریان گاز از مانومتر و شیرهای پنوماتیک استفاده شد.



تصویر شماره ۱: شماتیک راکتور مورد استفاده در فرایند

۱- کپسول گاز N_2 ، ۲- شیرآلات پنوماتیک، ۳- مانومتر و سیستم کنترل فشار جریان گاز، ۴- لوله های پنوماتیک انتقال گاز N_2 ، ۵- تانک اختلاط نانوذره با گاز N_2 ، ۶- مانومتر و سیستم کنترل فلوی جریان مخلوط گاز N_2 و نانوذره، ۷- ترمینال توزیع گاز، ۸- راکتور اختلاط نانوذره با پساب، ۹- حباب های گاز N_2 بعد از تنظیم نانوذره و فلوی جریان، طبق زمان های مقرر در جدول شماره ۳، از پساب داخل راکتور به میزان ۵۰ ml نمونه برداری و استخراج پلاسمید از نمونه های اصلی انجام گرفت (۳۱). به لحاظ ممانعت از تاثیر احتمالی نانوذره در مراحل استخراج DNA پلاسمیدی، جهت جداسازی باکتری و اجزای آن از نانوذرات احتمالی موجود در نمونه، براساس تفاوت جرم حجمی باکتری (وزن تقریبی هر باکتری 5.6×10^{-13} g) (۳۵) و نانوذره، نمونه مذکور با شدت ۳۰۰۰ rpm به مدت ۳ min سانتریفوژ و سوپرناتانت حاصله به لوله فالکون جدید، منتقل و مجدداً جهت کاهش حجم

مشاهده حرکت DNA روی ژل، از دستگاه آشکارساز UV الکترو لومیناتور (Syngene gel doc G:BOX LF) استفاده شد. تعیین غلظت نتایج PCR به روش اسپکتوفتومتری و با استفاده از دستگاه بیوفتومتر (Ependorf) مقدار DNA در دو طول موج ۲۶۰ nm و ۲۸۰ محاسبه و ثبت گردید.

آزمایشات غیر فعال سازی

با توجه به هزینه های بالای آزمایشات سلولی مولکولی و نانو، طراحی آزمایش توسط نرم افزار به صورت Small انجام و تعداد آزمایشات برای یافتن نواحی بهینه پاسخ، ۱۵ آزمایش به دست آمد. نقاط مرکزی آزمایشات، شامل زمان، فلوی جریان گاز N_2 و (nZVI)، متغیرهای مستقل و تاثیر گذار بودند. برای این که عملکرد راکتور بازده معنی داری داشته باشد، محدوده متغیرهای مستقل در آزمایشات ابتدایی قبل از طراحی آزمایش مشخص و تعداد آزمایشات ۱۷ عدد تعیین شد. جدول شماره ۲، متغیرهای مستقل طراحی آزمایش به روش مرکب مرکزی را نشان می دهد.

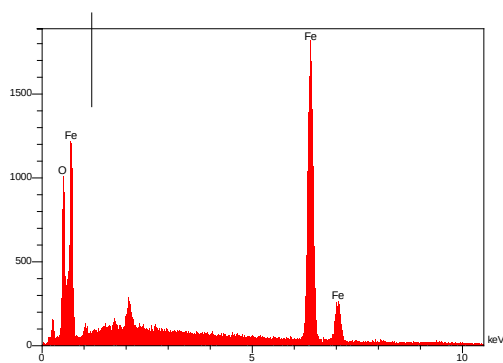
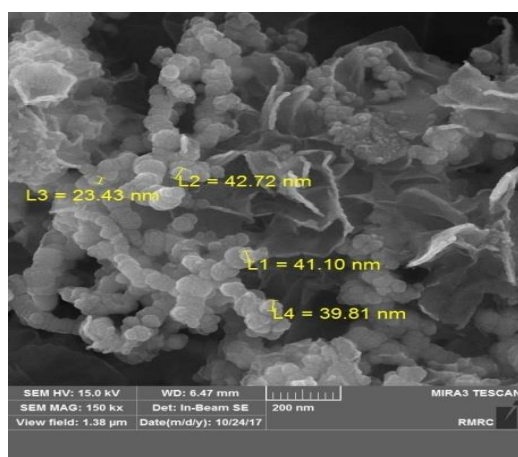
شماتیک راکتور مورد استفاده در تصویر شماره ۱ آمده است. راکتور از ۳ قسمت تشکیل شده است. قسمت اول مخزن حاوی گاز N_2 تحت فشار ۱۳۵ bar به حجم ۱۰ لیتر و سیستم تزریق پنوماتیک و کاهش فشار اولیه به ۵-۶ bar، قسمت دوم مخزن اختلاط نانوذره با گاز N_2 و ایجاد توربلانت جهت تزریق پنوماتیک و یکنواخت نانوذره در پساب به همراه سیستم کنترل فلوی گاز ۲-۱۰ lit/min و تنظیم فشار به ۵-۱۵ psi و قسمت سوم مخزن، اختلاط گاز N_2 حامل نانوذره با پساب فاضلاب می باشد. جهت ثابت نگهداشتن و

جدول شماره ۲: متغیرهای مستقل طراحی آزمایش به روش مرکب مرکزی جهت غیر فعال سازی باکتری های مقاوم آنتی بیوتیکی

Std. Dev.	Maximum	+۱	Mean	-۱	Minimum	Units	Name	Factor
۳/۷۱	۳۲	۳۰	۲۵	۲۰	۱۸	mg/L	nZVI	A
۳/۰۲۳	۱۲	۱۰	۶	۲	۰/۵	L/min	N_2	B
۱۸/۲۵	۶۲	۵۵	۳۰	۵	۰	Min	Time	C

تأیید سنتز نانوذره

مورفولوژی و اندازه دانه های نانوذرات آهن صفر ظرفیتی (nZVI) سنتز شده توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی FESEM با مدل MIRA3TESCAN-XMU مرکز پژوهش متالورژی رازی در شکل شماره ۳ مشاهده می گردد. نانوذرات به رنگ سیاه با اندازه متوسط ۲۳ nm تا ۴۳ بودند. هر یک از پیک های نشان داده شده در نمودار EDX نیز به یک اتم خاص اختصاص دارد. پیک های با ارتفاع بیش تر به معنی غلظت بیش تر عنصر مورد نظر در نمونه است. در این نمودار، ۹۳/۴۹ درصد وزنی عناصر به Fe و ۶/۵۱ درصد وزنی به O مربوط می شود که حکایت از سنتز عالی نانوذره آهن صفر دارد.



تصویر شماره ۳: تصویر FESEM و EDX مربوط به B-nZVI سنتز شده مورد استفاده در فرایند

پاسخ سیستم آزمایشی

مدل مرکب مرکزی برای توصیف پاسخ آزمایش تنظیم و نتایج اخذ شده از متغیرهای وابسته و سطح های

نمونه و تغلیظ باکتری های باقیمانده، سوپرناتانت به مدت ۱۰ min در ۸۰۰۰ rpm سانتریفوژ گردید. مایع رویی دور ریخته شد و رسوب حاصل با ۲۰۰ μl DDH₂O مخلوط گردید. ادامه استخراج DNA پلاسمیدی با استفاده از کیت (YTA) صورت گرفت.

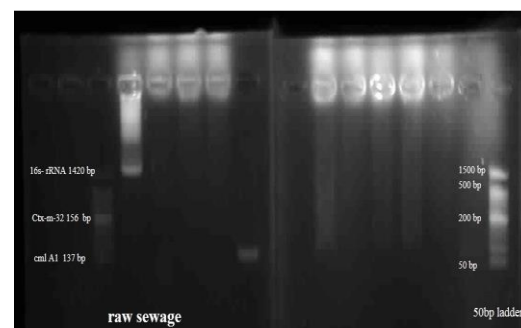
یافته ها

تأیید حضور ARB و ARGs در پساب فاضلاب:

نتایج بررسی HPC و ARB برحسب cfu/ml با استفاده از روش میلز و میسرا محاسبه گردید (۳۶).

$$cfu/ml = \frac{no.ofcolonies \times dilutionfactor}{volumeofcultureplate}$$

از کلنی های ایزوله شده بر روی پلیت ها، ژن *TetW*، *Ctx-m-32* و *CmlA1* شناسایی شدند. حضور هر سه ژن در پساب فاضلاب، توسط باندهای تشکیل شده بر روی ژل الکتروفورز محصول PCR تایید گردید. در تصویر شماره ۲، تصویر یک نمونه از باندهای تشکیل شده بر روی ژل الکتروفورز مشاهده می گردد. در این تصویر، ژن *Cml-A1* با ۱۳۷ جفت باز مربوط به کلرامفنیکل، ژن *Ctx-m-32* با ۱۵۶ جفت باز مربوط به سفتازیدیم و ژن *TetW* با ۱۶۹ جفت باز مربوط به تتراسیکلین و سکانس عمومی 16s-rRNA با ۱۴۲۰ جفت باز مشاهده می گردد.



تصویر شماره ۲: عکس مربوط به شناسایی ژن های مقاوم به آنتی بیوتیک های مورد بررسی:

(*TetW*, bp:169)، (*Ctx-m-32*, bp:156)، (*Cml-A1*, bp:137) و (16s-rRNA, bp: 1420)

پاسخ این آزمایش، وارد نرم افزار گردید. در جدول شماره ۳، نتایج پاسخ‌های اخذ شده از انجام آزمایشات ملاحظه می‌گردد. بر اساس آزمون آنالیز واریانس انجام یافته توسط نرم افزار، مدل به لحاظ آماری برای ARB و ARGs با شرایط درجه دوم رابطه معنی‌داری داشت.

بر اساس آزمون واریانس ANOVA مدل آماری طبق پیشنهاد نرم افزار Quadratic انتخاب گردید، زیرا کم‌ترین میزان انحراف استاندارد (Std.Dev) مقادیر بالای R-Squared و مقدار کم PRESS را داشت. نتایج آنالیز واریانس ANOVA در جدول شماره ۴ ملاحظه می‌گردد. آنالیز رگرسیون چند وجهی بر روی داده‌های آزمایش انجام شد. ضرایب محاسبه شده برای مدل با p-value مربوطه برای هر کدام از پاسخ‌ها در جدول شماره ۵ ملاحظه می‌گردد.

جدول ANOVA یک آزمون سودمند از توانایی مدل در توضیح تأثیر هر متغیر در متغیر وابسته می‌باشد

که مستقیماً به شدت رابطه توجه ندارد. اما جدول شماره ۵، خلاصه شدت رابطه بین مدل و متغیر وابسته را گزارش می‌نماید. ضریب تعیین (Rsquare)، مقدار مربع ضریب همبستگی چندگانه است و قابلیت پیش‌بینی کلی مدل را بیان می‌کند. در صورتی خوب است که به ۱ نزدیک تر باشد. ستون ۶ جدول شماره ۵، برازش بسیار خوبی برای داده‌های پاسخ ایجاد و حکایت از آن دارد که حذف HPC و ARG و ARGs توسط نانوذرات به وسیله این مدل تعریف می‌شود. درصد نشان داده شده توسط ضریب تعیین تعدیل شده (Adjusted R square) حاصل تأثیر واقعی متغیرهای مستقل مدل بر وابسته است و نه همه متغیرهای مستقل و می‌توان به مقدار برآورد شده ضریب تعیین تعدیل در مناسب بودن متغیرها برای مدل اعتماد و استنتاج کرد که مدل داده‌های آزمایشات را به صورت رضایت بخشی متناسب کرده است (ستون ۷ جدول شماره ۵)، اما تفاوت بین ضریب تعیین تعدیل

جدول شماره ۳: ماتریکس طراحی آزمایشات در سطوح مختلف و نتایج پاسخ‌های اخذ شده

ARG(cfb) ng/μl	ARG (chl) ng/μl	ARG(tet) ng/μl	PG (HPC) ng/μl	ARB cfu/ml	HPC cfu/ml	C:time min	B:N ₂ L/min	A:NZVI mg/L	Run
۲۵	۴۵	۴۴	۶۰	۳۸	۱۴۴	۳۰	۶	۲۵	۱
۶۳	۱۰۸	۶۰	۱۵۰	۱۲۱	۴۶۲	۵	۱۰	۲۰	۲
۲۵	۴۵	۲۰	۶۰	۷۹	۲۱۰	۱۰	۶	۱۸	۳
۴۴	۷۵	۴۲	۱۰۴	۱۹۰	۴۶۲	۵۵	۲	۳۰	۴
۱۷	۳۰	۲۳	۴۰	۴۵	۱۲۳	۳۰	۶	۲۵	۵
۶۸	۱۰۱	۶۲	۱۶۲	۲۰۰	۴۶۲	۱۰	۲	۳۰	۶
۲۲	۳۹	۱۲	۵۲	۱۰۸	۲۰۰	۱۰	۶	۳۲	۷
۱۵	۸	۶	۳۶	۲۱	۱۰۰	۵۵	۱۰	۲۰	۸
۱۶	۲۲	۱۹	۳۸	۵۰	۱۱۹	۳۰	۶	۲۵	۹
۲۵	۸۰	۶۴	۶۰	۴۳	۱۸۴	۱۰	۶	۲۵	۱۰
۱۲	۲۱	۴۶	۳۰	۱۸	۱۴۶	۵۵	۱۰	۳۰	۱۱
۱۴	۱۰	۶	۳۲	۳۹	۹۶	۳۰	۶	۲۵	۱۲
۸۸	۴	۰	۲۱۰	۱۲۷	۳۲۰	۳۰	۱۲	۲۵	۱۳
۷۸	۱۱۳	۵۲	۱۸۶	۱۴۲	۴۶۵	۵	۱۰	۳۰	۱۴
۶۳	۱۳۳	۸۶	۱۵۰	۲۰۰	۴۶۲	۵	۲	۲۰	۱۵
۱۶	۴۴	۱۹	۳۸	۴۵	۱۱۹	۳۰	۶	۲۵	۱۶
۵۰	۱۰۳	۱۲	۱۲۰	۱۹۰	۴۳۸	۶۲	۲	۲۰	۱۷

جدول شماره ۴: نتایج آنالیز واریانس داده‌های مورد آزمایش در سطوح مختلف

ARG(cfb)	ARG (chl)	ARG(tet)	ARB	HPC	Source
سطح معنی داری	F	سطح معنی داری	F	سطح معنی داری	F
<۰/۰۰۰۱	۴۸/۳۱	۰/۰۰۰۲	۲۲/۲۴	۰/۰۰۴۰	۹/۱۵
۰/۰۵۶۰	3.2E-3	۰/۰۲۸۲	۱/۳۶	۰/۰۱۳	۲/۹۳
۰/۰۰۳۵	۱۸/۶۳	۰/۰۰۱۵	۲۵/۲۲	۰/۲۶۰۹	۱/۵۰
<۰/۰۰۰۱	۱۲۲/۲۴	۰/۰۰۰۱	۵۸/۷۴	۰/۰۰۱۱	۲۸/۱۰
۰/۳۷۴۶	۰/۹۰	۰/۰۴۰۰	۵/۶۶	۰/۴۱۷۲	۰/۷۴
۰/۱۶۱۱	۲/۴۶	۰/۸۸۶۶	۰/۰۲۱	۰/۰۰۹۳	۱۲/۶۳
۰/۰۰۰۸	۳۱/۵۴	۰/۰۰۴۳	۱۷/۱۹	۰/۲۹۶۷	۱/۲۷
۰/۰۷۸۵	۰/۸۸	۰/۰۱۱۲	۱۱/۶۷	۰/۰۰۴۲	۱۷/۳۰
<۰/۰۰۰۱	۳۰۸/۶۸	۰/۰۱۳۷	۱۰/۶۷	۰/۵۹۰۲	۰/۳۲
۰/۰۴۸۳	۵/۷۰	<۰/۰۰۰۱	۶۴/۵۷	۰/۰۰۰۴	۴۰/۶۹
۰/۰۱۶۵	۱۶/۶	۰/۰۵۰۸	۹/۶۴۶	۰/۰۴۵	۹/۷۶۵
					۰/۴۵۷
					۶/۹۷
					۰/۲۰۹
					۳/۶۷
					Lack of Fit

جدول شماره ۵: ضرایب رگرسیون مدل پاسخ سطحی برای حذف HPC، ARB و ARGs

پارامتر	Mean	Std. Dev.	F	سطح معنی داری	Rsquare	Adjusted R square	Predicted R square	Adeq Precision	C.V. %
۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰
HPC	۲۶۵/۴۱	۲۴/۹۶	۶۸/۶۹	<۰/۰۰۰۱	۰/۹۸۸۸	۰/۹۷۴۴	۰/۷۸۶۰	۱۹/۱۴۶	۹/۴۰
ARB	۹۷/۴۱	۹/۳۰	۹۱/۵۶	<۰/۰۰۰۱	۰/۹۹۱۶	۰/۹۸۰۷	۰/۸۱۵۳	۲۶/۲۱۳	۹/۵۵
ARG(tet)	۳۳/۷۱	۱۰/۶۶	۹/۱۵	۰/۰۰۴۰	۰/۹۲۱۶	۰/۸۲۰۸	۰/۸۱۰۸	۱۰/۴۰۹	۳۱/۶۳
ARG (chl)	۵۷/۷۱	۱۱/۶۰	۲۲/۲۴	۰/۰۰۰۲	۰/۹۶۶۲	۰/۹۲۲۸	۰/۹۱۹۰	۱۴/۱۸۷	۲۰/۱۰
ARG(cfz)	۳۷/۷۱	۴/۸۵	۴۸/۳۱	<۰/۰۰۰۱	۰/۹۸۴۲	۰/۹۶۳۸	۰/۸۳۶۵	۲۰/۶۰۹	۱۲/۸۶

شده و ضریب تعیین پیش بینی شده^۱ (ستون ۸ جدول شماره ۵) کم تر از ۰/۲، نشان دهنده عدم وجود مشکل احتمالی در مدل و یا داده های آزمایش می باشد. معنی داری مدل برای حذف هر یک از پارامترها به وسیله مقدار F (ستون ۴ جدول شماره ۵) بیان شده است و فقط یک احتمال ۰/۰۱ درصد وجود دارد که مقدار F به این بزرگی به علت نویز رخ دهد، به عبارتی هرچقدر مقدار نویز کم تر باشد، به همان میزان بهترین و قوی ترین شرایط کاری را معین می نماید. دقت کافی^۲ مدل که محدوده مقادیر پیش بینی شده را در نقاط طراحی نسبت به متوسط خطای پیش بینی شده مقایسه می کند، برای کلیه پارامترها از ۴ بزرگ تر می باشد که مطلوب توصیف می شود و تأیید می کند که مدل برای توصیف فضای طراحی قابل استفاده و مدل درجه دوم را اثبات می کند. بنابراین معادله رگرسیون به خوبی داده های آزمایشگاهی را پوشش می دهد. ضریب واریانس (CV%) مدل برای HPC و ARBs زیر ۱۰ می باشد که مورد تایید بوده و برای کلیه ARGs بزرگ تر از ۱۰ و تجدیدپذیر است.

تأیید مدل پاسخ سطح

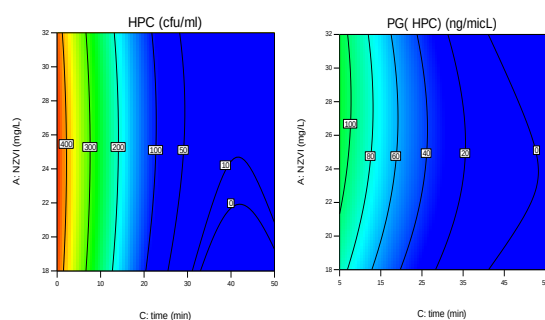
به منظور اطمینان از این که مدل انتخابی تقریب کافی برای مجموعه واقعی فراهم کرده است یا نه، از نمودارهای خطایاب استفاده گردید. ترسیم توزیعی داده های آزمایش در مقابل مقادیر پیش بینی شده توسط مدل در نمودار شماره ۱ آورده شده است که نشان دهنده قابل قبول بودن مدل می باشد. در این نمودار به صورت نمونه، نمودارهای خطایاب مربوط به ARB و Ctx m32 ملاحظه می گردد. در نمودار شماره ۱ الف،

میزان احتمال نرمال برحسب باقیمانده نشان داده می شود. این نمودار نشانگر تبعیت داشتن یا نداشتن مقادیر باقیمانده از یک توزیع نرمال است. در توزیع نرمال، نقاط در امتداد یک خط راست قرار می گیرند (۳۷). در نمودار شماره ۱ الف، انحرافی در نرمال بودن باقیمانده ها دیده نمی شود. این نمودار، دارای توزیع نرمال بوده لذا نتایج و مدل ارائه شده را قابل اعتماد ارزیابی می کند. نمودار شماره ۱-ب نیز نمودار مقایسه مقادیر پیش بینی شده توسط نرم افزار بر حسب مقادیر واقعی برای پاسخ را نشان می دهد. به کمک این نمودار نیز مقدار یا گروهی از مقادیر را می توان تشخیص داد که به راحتی از طریق مدل پیش بینی نمی شوند زیرا داده ها باید حول خط ۴۵ درجه باشند. پراکندگی منظم داده های حاصل از آزمایش بیانگر معتبر بودن مدل انتخابی و قابلیت آن در پیش بینی نقاط آزمایش است و بر اساس این نمودار نیز مقادیر پیش بینی شده با مقادیر واقعی همبستگی بسیار نزدیک داشتند و این مدل به خوبی توانسته است این مقادیر را پوشش دهد؛ نتیجه این که پاسخ های اخذ شده دارای توزیع نرمال و فرض برابری واریانس ها تأیید می گردد (۳۸).

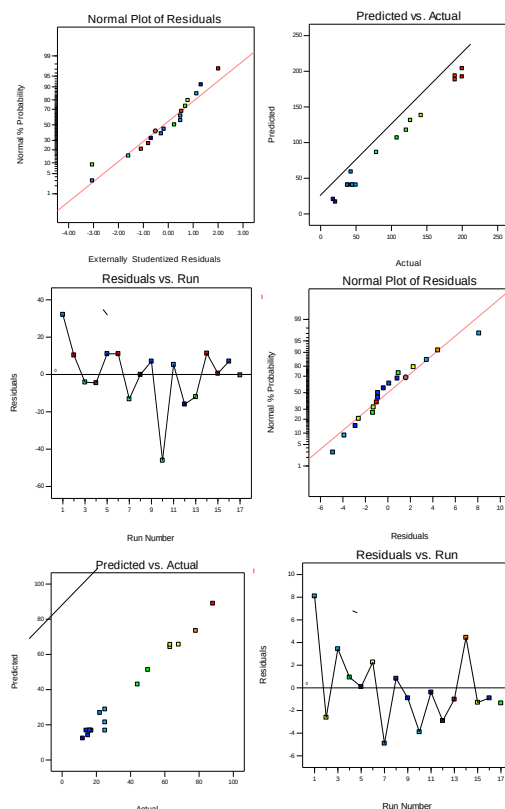
نمودار شماره ۱-ج نیز که نمودار پراکنش باقیمانده ها نسبت به ترتیب زمان جمع آوری داده ها می باشد، برای بررسی استقلال بین باقیمانده ها است. در صورت مشاهده نشدن هرگونه روندی مانند سینوسی بودن در این نمودار، فرض مورد نظر نیز پذیرفته می شود (۳۹). در این نمودار، روند خاصی که بتوان با آن فرض استقلال باقیمانده ها را رد کرد، دیده نمی شود. بنابراین با توجه به تحلیل نمودارهای فوق و مورد قبول واقع شدن فرض های مورد نظر، مدل انتخاب شده برای تحلیل داده ها مناسب است.

1. Predicted R-Squared
2. Adequate Precision (AP)

ملاحظه می گردد. نمودارها نشان می دهند که نانوذرات آهن صفر در حذف باکتری های هتروتروف و اجزای ژنتیکی آن ها موثرند، به طوری که روند کاهش DNA پلاسمیدی نسبت به باکتری های هتروتروف اندکی با تاخیر صورت گرفته و برای حذف شان، نانوذره بیش تری مصرف شد. نمودار شماره ۳، کنتورهای دو بعدی حذف DNA پلاسمیدی حاوی هریک از ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی را نشان می دهد. حذف پلاسمیدهای حاوی ژن های مقاوم اندکی تفاوت نشان داد. در نمودارهای فلوی جریان گاز ثابت، پلاسمیدهای Ctx-m-32 نسبت به دو ژن دیگر مقاومت بالایی را در برابر نانوذرات آهن نشان دادند. در نمودارهای nZVI، ثابت روند تغییرات کاهشی Ctx-m-32 با دو ژن دیگر متفاوت می باشد.

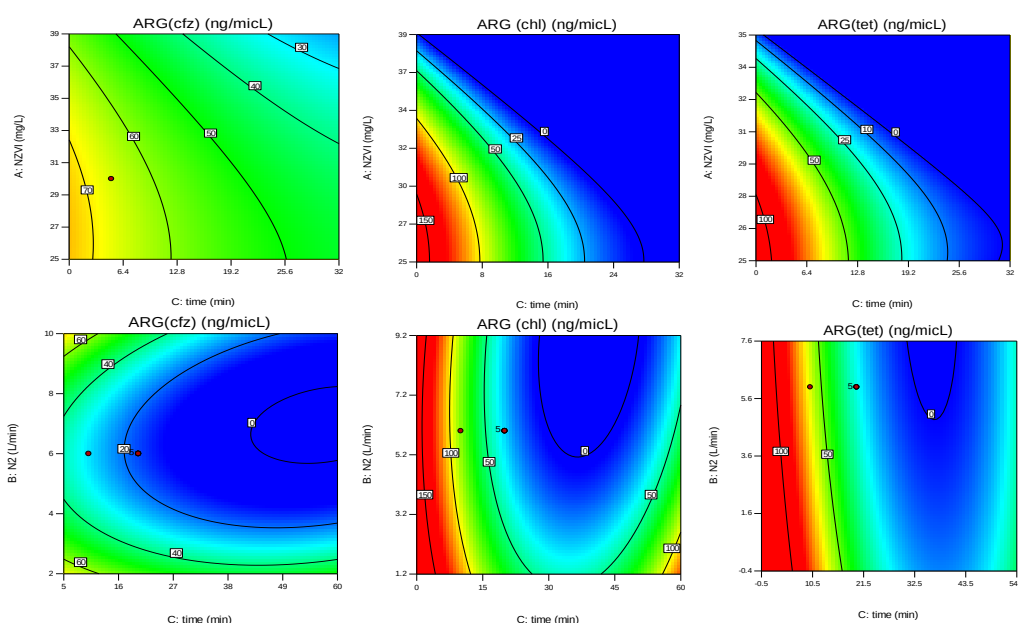


نمودار شماره ۲: کنتورهای دو بعدی مقایسه حذف باکتری های هتروتروف و DNA پلاسمیدی آن ها



نمودار شماره ۱: ترسیم توزیعی و نمودارهای خطایاب داده های آزمایش در مقابل مقادیر پیش بینی شده توسط مدل مربوط به Ctx m32 و ARB، HPC

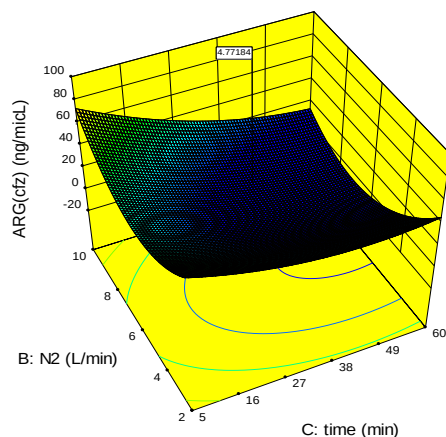
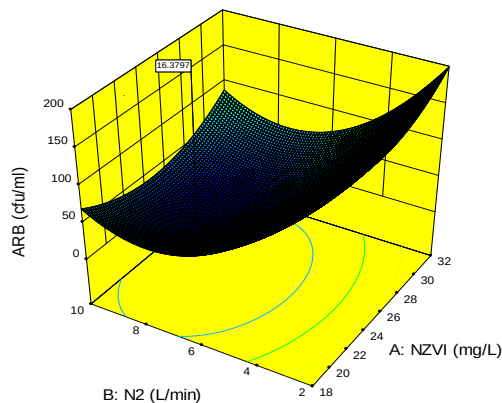
در نمودار شماره ۲، کنتورهای دو بعدی حذف باکتری های هتروتروف و حذف DNA پلاسمیدی آن ها



نمودار شماره ۳: کنتورهای دو بعدی حذف DNA پلاسمیدی حاوی ژن های مقاوم

بهینه سازی مدل سطح پاسخ

با اپتیمایز نمودن متغیرهای مستقل و یافتن نقاط بهینه برای متغیرهای وابسته در غیرفعال سازی HPC و ARGs با استفاده از تعیین ضرایب تاثیر ترم های مهم در فرایند، با $p\text{-value} < 0.0001$ اقدام به بهینه سازی عددی گردید. مدل های پیشنهادی نرم افزار برای HPC و ARBs با میزان مطلوبیت ۱ شامل $nZVI = 20-23 \text{ mg/l}$ و $Q_{N2} = 7-7.5 \text{ l/min}$ و $\text{time} = 23-30 \text{ min}$ بود که در این صورت می توان به $\text{HPC} = 36/3 \text{ cfu/ml}$ رسید. اما مدل پیشنهادی نرم افزار برای ARGs نیز با میزان مطلوبیت ۱ شامل $nZVI = 28-30 \text{ mg/l}$ و $Q_{N2} = 7-7.5 \text{ l/min}$ و $\text{time} = 30-38 \text{ min}$ بود که در این صورت می توان به $\text{ARG}(\text{TetW}) = 0 \text{ ng/}\mu\text{l}$ ، $\text{PG}(\text{HPC}) = 11/3 \text{ ng/}\mu\text{l}$ ، $\text{ARG}(\text{Ctx-m-32}) = 4/7 \text{ ng/}\mu\text{l}$ ، $\text{ARG}(\text{Cml-A1}) = 0 \text{ ng/}\mu\text{l}$ رسید. بر اساس ترم های موثر در هر یک از متغیرهای وابسته، کنتورهای دو بعدی و 3D مربوطه بررسی گردید و صحت نتایج اخذ شده با میزان مطلوبیت ارائه شده تایید شدند. در نمودار شماره ۴، کنتورهای 3D مربوط به ARG، براساس N_2 و $nZVI$ با ارائه نقطه بهینه پیش بینی شده توسط مدل، کنتور 3D مربوط به ARG(Ctx-m-32) بر اساس ترم های N_2 و time با ارائه نقطه پیش بینی شده توسط مدل ملاحظه می گردد.



نمودار شماره ۴: کنتورهای 3D مربوط به اپتیمایز مدل بر اساس ترم های موثر در ARG و ARG(Ctx-m-32)

بحث

مطالعه ARG و ARB در این تحقیق ثابت نمود در پساب خروجی از تصفیه خانه SBR، باکتری ها و ژن های مقاوم به سه گروه آنتی بیوتیکی به وفور وجود دارند. میانگین کلی غلظت HPC و ARBs در پساب اولیه به ترتیب $1.68 \times 10^5 \text{ cfu/ml}$ و $2.58 \times 10^4 \text{ cfu/ml}$ بود. میانگین کلی ARG و ARB های مقاوم به تتراسایکلین (Tet^r W)، کلرامفنیکل (Cml-A1) و سفنازیدیم (Ctx-m32) به ترتیب 2.96×10^4 ، 2.11×10^4 و $2.85 \text{ ng/}\mu\text{l}$ و 312 و 220 بود. الگوی فراوانی کلی ARG و ARB در پساب اولیه $\text{TE} > \text{CHL} > \text{CAZ}$ بود که با نتایج Munir و Kümmerer و Bouki همخوانی دارد [31، 40، 42]. بالا بودن غلظت ARBs در پساب تصفیه خانه به دلیل بار جمعیت باکتریایی بالا و انتقال افقی عوامل ژنتیکی (HGT) (پلاسمیدها و کاسمیدهای حامل ژن های مقاومت دارویی) در بین گونه ها و نسل های مختلف باکتری های هتروتروف می باشد (31، 43). حذف باکتری های هتروتروف و باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک از پساب SBR توسط نانوذرات آهن صفر ظرفیتی به خوبی انجام می شود. اثر تغییرات

غلظت nZVI بر روی HPC و ARB تحت شرایط بدون اکسیژن و در مجاورت گاز ازت مورد بررسی قرار گرفت. در بین آزمایشات طراحی شده توسط نرم افزار، آزمایشاتی که کلیه متغیرهای آن به جز غلظت یکسان بودند، مورد قیاس قرار گرفتند تا اثر غلظت nZVI بررسی شود. اثر غلظت nZVI متأثر از زمان بوده و تا ۲۵ دقیقه، افزایش غلظت، تاثیر محسوسی در کاهش HPC و ARB نداشت اما از دقیقه ۲۵ به بعد، اثرات nZVI در کاهش لگاریتمی HPC مشاهده گردید و در شرایط آزمایشات با غلظت یکسان nZVI، ترم های $N_2 > time > N_2 > time^2$ با $p\text{-value} < 0.0001$ به ترتیب دارای بالاترین ضریب تاثیر در غیر فعال سازی HPC و ترم های $N_2 > time > N_2 > time^2$ با $p\text{-value} < 0.0001$ بالاترین ضریب تاثیر در غیر فعال سازی ARBs داشتند. در غلظت ثابت nZVI، فرایند غیر فعال سازی HPC بیش تر وابسته به زمان و در مورد ARB بیش تر وابسته به فلوی جریان گاز N_2 بود. راندمان حذف HPC و ARB به ترتیب ۹۹/۸۴ درصد ($2/79 \text{ LOG}$) و ۹۹/۶۳ درصد ($2/42 \text{ LOG}$) بوده است. نتایج حاصل با مطالعات انجام یافته توسط Lee, Boxall (۹، ۴۶-۴۴) از آن جا که باکتری ها دارای بار سطحی منفی و نانوذرات آهن صفر ظرفیتی فاقد نیروی دافعه الکترواستاتیکی نسبت به سطح دیواره باکتری هستند، می توانند به سطح باکتری جذب شده و نسبت به نانو ذرات سایر ترکیبات آهن، خواص میکروب کشی قوی تری از خود نشان دهند (۹). مکانیسم های موثر در غیر فعال سازی میکروارگانیزم ها توسط نانوذرات آهن صفر ظرفیتی آسیب دیواره سلولی، اختلال در عملکرد آنزیمی سلول ها و تولید گونه های اکسیژن فعال (ROS) می باشد (۱۴، ۴۷) طبق مطالعات Lee و همکاران، آسیب فیزیکی nZVI به غشای سلولی قابل ملاحظه بوده که منجر به تراوش محتویات داخل سلولی می شود. Auffal و همکاران نیز سمیت nZVI را اعمال یک

سری تنش اکسیداتیو توسط رادیکال های آزاد شده ROS مطرح نمودند که یکی از مکانیسم های فرض شده جهت غیر فعال سازی میکروارگانیزم ها با نانوذرات آهن صفر ظرفیتی، تولید گونه های اکسیژن فعال شامل سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و رادیکال هیدروکسیل می باشد [۴۴]. nZVI جهت تولید ROS از اکسیژن داخل سلولی و تجزیه و احیاء گروه های موجود در پروتئین و لیپوپلی ساکارید غشای سلولی استفاده می کند (۴۸). هم چنین یون های فلزی رها شده از سطح نانوذرات به واسطه اختلال در عملکرد آنزیم های پروتئینی می توانند از رشد باکتری پیشگیری کنند (۴۶).

nZVI علاوه بر تاثیر بر باکتری های هتروتروف و نابودی آن ها قادر است اجزای مقاوم باکتری از جمله پلاسمیدها و کاسمیدهای حامل ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی را نیز حذف کند. در آزمایشات مربوط به ARGs نیز آزمایشات مربوط به غلظت یکسان nZVI (آزمایشات ۱، ۵، ۹، ۱۲ و ۱۳) حذف *Cml-A1* در دقیقه ۴۲-۳۵، با راندمان ۹۶/۹۹ درصد و حذف *TetW* در دقیقه ۳۲-۳۰ با راندمان ۱۰۰ درصد و حذف *Ctx-m32* در دقایق بالاتر از ۴۹ با راندمان ۸۸/۳۶ درصد انجام یافته بود. در آزمایشات فلوی جریان ثابت (۲، ۸، ۱۱ و ۱۴) نیز افزایش غلظت نانوذره تاثیر عکس بر راندمان فرایند حذف *Cml-A1* و *TetW* دارد و در مورد *Ctx-m32* این تاثیر معکوس، نامحسوس بود و در دقایق ۴۸ به بعد خود را نشان می دهد. در آزمایشات زمان ثابت (آزمایشات ۱، ۵، ۶، ۷، ۹، ۱۲ و ۱۳) نیز افزایش فلوی جریان گاز بیش ترین تاثیر را روی *Cml-A1* و سپس *TetW* دارد، به طوری که در مورد *Cml-A1* فلوی جریان ۶ lit/min و در مورد *TetW* نیز در فلوی جریان ۱۰ lit/min راندمان مورد نظر حاصل شده و در مورد *Ctx-m32* اختلاط و فلوی جریان بیش از ۶ lit/min نتیجه عکس می دهد. به عبارتی ترم های موثر در غیر فعال سازی ARG (*TetW*) با $p < 0.0001$ به ترتیب $N_2 > time > N_2 > time^2$ و ————— برای

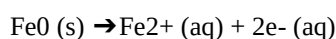
مدل های پیشنهادی نرم افزار برای HPC و ARBs با میزان مطلوبیت ۱ شامل $nZVI=20-23\text{mg/l}$ و $Q_{N2}=7-7.8\text{ l/min}$ و $time=23-30\text{ min}$ بود که در این صورت می توان به $HPC=36/3\text{cfu/ml}$ و $ARBs=16/3\text{cfu/ml}$ رسید. اما مدل پیشنهادی نرم افزار برای ARGs نیز با میزان مطلوبیت ۱ شامل $nZVI=28$ و $Q_{N2}=7-7.8\text{ l/min}$ و $time=30-38\text{min}$ بود که در این صورت می توان به $PG(=11/3\text{ng/}\mu\text{l})$ و $ARG(=0\text{ng/}\mu\text{l})$ ، $ARG(TetW)=0\text{ng/}\mu\text{l}$ ، $HPC(=4/7\text{ng/}\mu\text{l})$ رسید. نتایج این یافته مشابه مطالعات Qi Chen و Yanjun Ma می باشد (۵۰، ۵۱).

نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان می دهد که نانوذره آهن صفر ظرفیتی قادر است علاوه بر تخریب و حذف باکتری های هتروتروف، اجزای ژنتیکی باکتری ها و ژن های عامل مقاومت آنتی بیوتیکی را تخریب و تجزیه نماید و بر خلاف تاسیسات کلر زنی تصفیه خانه های فاضلاب که منجر به افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی در بین باکتری های پساب خروجی می شوند، کاهش محسوسی در جمعیت میکروبی این گونه باکتری ها به وجود آورد.

سپاسگزاری

این مطالعه بخشی از پایان نامه دکتری با عنوان بهینه سازی حذف باکتری های مقاوم از طریق راکتورهای ناپیوسته متوالی (SBR) با استفاد از نانو ذرات، مصوب پردیس بین الملل دانشگاه تهران می باشد که بدین وسیله از شرکت آب و فاضلاب استان آذربایجان غربی، آزمایشگاه نانو دانشگاه پیام نور مرکز خوی، آزمایشگاه دانشکده علوم پزشکی خوی و آزمایشگاه سلولی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه تقدیر و تشکر به عمل می آید.

_____ترتیب ARG(*Cml-A1*) $time2>N_2^2>nZVI.N_2>N_2.time>nZVI^2>N_2>time$ و برای ARG(*Ctx-m-32*) به ترتیب $N_2^2>time^2>N_2>N_2.time>time$ بود. بعد از آسیب دیدن و پاره شدن غشای سلولی باکتری که منجر به تراوش محتویات داخل سلولی در پساب می شود، اجزای باکتری تراوش یافته در پساب در طی یک چرخه بیوژنوشیمی^۱ توسط واکنش های غیر زنده به مواد معدنی تبدیل می شوند (۴۹). در عمل، مواد آلی در حله اول به هیدروژن (H_2) و اسیدهای چرب با وزن مولکولی کم تجزیه می شوند. در واقع آهن عنصری است که با بسیاری از مواد در محیط زیست با توجه به نیمه واکنش اکسیداسیون زیر اکسید می شود:



آهن عنصری دو الکترون آزاد می کند و به آهن فروس اکسید می شود. این الکترون ها در انواع واکنش های آلاینده هدف شروع به فعالیت می کنند. به منظور وقوع واکنش تصفیه، باید بین ذرات $nZVI$ و مولکول آلاینده تماس مستقیم برقرار باشد. پتانسیل اکسیداسیون و احیا (ORP) (oxidation reduction potential) و اکسیژن محلول (DO) می تواند واکنش $nZVI$ را تحت تاثیر قرار دهد. کاهش اکسیژن محلول و افزایش پتانسیل اکسیداسیون و احیا ($ORP \leq -400\text{mV}$) شرایط ایده آل به منظور تسهیل تجزیه آلاینده ها به خصوص در مورد واکنش های حذف بتا به وجود می آورد. ORP بستگی به انتقال الکترون بین گونه های شیمیایی و کاهش پتانسیل محلول آبی دارد. ظرفیت صفر، اندازه کوچک و نسبتاً پایین پتانسیل زتا $nZVI (-30\text{mV} \pm 30\text{mV})$ باعث جذب مواد معدنی با بار منفی یا سطوح مواد آلی و اجزای باکتری تراوش یافته می شود. تزریق گاز نیتروژن باعث کاهش DO محلول شده و تماس مستقیم $nZVI$ با مولکول های آلی ناشی از تجزیه اجزای باکتری می شود.

References

1. Brunton LL, Chabner B, Knollmann BC. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. New York: McGraw-Hill; 2011. Vol 12.
2. Tao R1, Ying GG, Su HC, Zhou HW, Sidhu JP. Detection of antibiotic resistance and tetracycline resistance genes in Enterobacteriaceae isolated from the Pearl Rivers in South China. Environ Pollut 2010; 158(6): 2101-2109.
3. Laroche E, Petit F, Fournier M, Pawlak B. Transport of antibiotic-resistant Escherichia coli in a public rural karst water supply. J Hydrol 2010; 392(1): 12-21.
4. Madaeni S. The application of membrane technology for water disinfection. Water Res 1999; 33(2): 301-308.
5. Öncü NB, Menceloğlu YZ, Akmehtmet Balçioğlu I. Comparison of the effectiveness of chlorine, ozone, and photocatalytic disinfection in reducing the risk of antibiotic resistance pollution. Journal of Advanced Oxidation Technologies 2011; 14(2): 196-203.
6. Ramteke PW1, Gaur A, Pathak SP, Bhattacharjee JW. Antibiotic resistance of coliforms in drinking water in rural areas. Indian J Med Res 1990; 91: 185-188.
7. Aali R, Nikaeen M, Khanahmad H, Hassanzadeh A. Monitoring and comparison of antibiotic resistant bacteria and their resistance genes in municipal and hospital wastewaters. Int J Pre Med 2014; 5(7): 887-894.
8. Dianatitilaki R, Safarpour M. Nitrate Removal from Water by Nano zero Valent Iron in the Presence and Absence of ultraviolet light. J Mazandaran Univ Med Sci 2014; 24(113): 151-161 (Persian).
9. Boxall AB, Tiede K, Chaudhry Q. Engineered nanomaterials in soils and water: how do they behave and could they pose a risk to human health? Nanomedicine (lond) 2007; 2(6): 919-927.
10. Liu A, Liu J, Han J, Zhang WX. Evolution of nanoscale zero-valent iron (nZVI) in water: microscopic and spectroscopic evidence on the formation of nano-and micro-structured iron oxides. J Hazard Mater 2017; 322(pt A): 129-135.
11. Agarwal M, Patel D. Modified Zero valent Iron (ZVI) Nanoparticles for removal of Manganese from water. International Journal of Environmental Research 2015; 9(3): 1055-1068.
12. Mukherjee R, Kumar R, Sinha A, Lama Y, Krishna Saha A. A review on synthesis, characterization, and applications of nano zero valent iron (nZVI) for environmental remediation. Crit Rev Environ Sci Technol 2016; 46(5): 443-466.
13. Fajardo C, Costa G, Nande M, Martin M. Three Functional Biomarkers for Monitoring the Nanoscale Zero-Valent Iron (nZVI)-Induced Molecular Signature on Soil Organisms. Water Air Soil Poll 2016; 227(6): 201.
14. Auffan M1, Achouak W, Rose J, Roncato MA, Chanéac C, Waite DT, et al. Relation between the redox state of iron-based nanoparticles and their cytotoxicity toward Escherichia coli. Environ Sci Technol 2008; 42(17): 6730-6735.
15. Nhiem Tran, Aparna Mir, Dhriti Mallik, Arvind Sinha, Suprabha Nayar, Thomas J Webster. Bactericidal effect of iron oxide nanoparticles on Staphylococcus aureus. Int J Nanomedicine 2010; 5: 277-283.

16. Wei D1, Sun W, Qian W, Ye Y, Ma X. The synthesis of chitosan-based silver nanoparticles and their antibacterial activity. *Carbohydr Res* 2009; 344(17): 2375-2382.
17. EL-Rafie MH, EL Nagar ME, Ramadan MA, Fouda M, Al-Deyab Salem S, Hebeish A. Environmental synthesis of silver nanoparticles using hydroxypropyl starch and their characterization. *Carbohydr Polym* 2011; 86(2): 630-635.
18. Wang Z, Choi F, Acosta E. Effect of Surfactants on Zero-Valent Iron Nanoparticles (NZVI) Reactivity. *J Surfactants Deterg* 2017; 20(3): 577-588.
19. Vance ME, Kuiken T, Vejerano EP, McGinnis SP, Hochella MF Jr, Rejeski D, et al. Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein J Nanotechnol* 2015; 6: 1769-1780.
20. El- Temsah YS, Joner EJ. Impact of Fe and Ag nanoparticles on seed germination and differences in bioavailability during exposure in aqueous suspension and soil. *Environ Toxicol* 2012; 27(1): 42-49.
21. Ma X, Gurung A, Deng Y. Phytotoxicity and uptake of nanoscale zero-valent iron (nZVI) by two plant species. *Sci Total Environ*. 2013; 443: 844-849.
22. Lien HL, Zhang WX. Nanoscale iron particles for complete reduction of chlorinated ethenes. *Colloid Surface A* 2001; 191(1): 97-105.
23. Deng T, Bradley MSA. Determination of a particle size distribution criterion for predicting dense phase pneumatic conveying behaviour of granular and powder materials. *Powder Technology* 2016; 304: 32-40.
24. Müller NC, Nowack B. Nano zero valent iron—The solution for water and soil remediation. Report of the Observatory NANO, 2010: p. 1-34.
25. Cook SM. Assessing the use and application of zero-valent iron nanoparticle technology for remediation at contaminated sites. Jackson State University, 2009.
26. Zarei R, Mosafieri M, Soroush B, Khataee AR, Asfarabadi M. coli Inactivation Efficiency of Zero-Valent Iron Nanoparticles Stabilized by Carboxymethyl Cellulose. *Journal of Health and Hygiene* 2014; 5(3): 214-223 (Persian).
27. Bhatia S. Nanoparticles Types, Classification, Characterization, Fabrication Methods and Drug Delivery Applications. *Natural Polymer Drug Delivery Systems*. 2016, p. 33-93.
28. van Hoek A, Mevius D, Guerra B, Mullany P, Roberts AP, Arts H. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Front Microbiol* 2011; 2: 203.
29. Aali R, Khanahmad H, Kazemi M, Hassanzadeh A. Occurrence of tetracycline resistant bacteria and resistance gene (tetW) in hospital and municipal wastewaters. *Fresenius Environmental Bulletin* 2014; 23(10a): 2560-2566.
30. Gao P, Mao D, Luo Y, Wang L, Xu B, Xu L. Occurrence of sulfonamide and tetracycline-resistant bacteria and resistance genes in aquaculture environment. *Water Res* 2012; 46(7): 2355-2364.
31. Munir M, Wong K, Xagorarakis I. Release of antibiotic resistant bacteria and genes in the effluent and biosolids of five wastewater utilities in Michigan. *Water Res* 2011; 45(2): 681-693.
32. Huang JJ, Hu HY, Lu SQ, Li Y, Tang F, Lu Y, et al. Monitoring and evaluation of antibiotic-resistant bacteria at a municipal

- wastewater treatment plant in China. *Environ Int* 2012; 42: 31-36.
33. Nikolaou A, Meric S, Fatta D. Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments. *Anal Bioanal Chem* 2007; 387(4): 1225-1234.
 34. Martinez JL1, Fajardo A, Garmendia L, Hernandez A, Linares JF, Martínez-Solano L, et al. A global view of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev*. 2008; 33(1): 44-65.
 35. Bratbak G. Bacterial biovolume and biomass estimations. *Appl Environ Microbiol* 1985; 49(6): 1488-1493.
 36. Miles AA, Misra SS, Irwin JO. The estimation of the bactericidal power of the blood. *J Hyg (lond)* 1938; 38(6): 732-749.
 37. Zazouli MA, Veisi F, Veisi A. Modeling bisphenol a removal from aqueous solution by activated carbon and eggshell. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2013; 22(2): 129-138. (persian)
 38. Chou KW, Norli I, Anees A. Evaluation of the effect of temperature, NaOH concentration and time on solubilization of palm oil mill effluent (POME) using response surface methodology (RSM). *Bioresour Technol* 2010; 101(22): 8616-8622.
 39. Yousefi Z, Mohammadpour-Tahamtan RA, Mashayekh-Salehi A. The efficiency of bivalve mollusk shell in removal of lead [Pb (II)] from aqueous solutions by central composite design model (CCD) and optimization of effective parameters. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2014; 23(108): 54-67 (Persian).
 40. Kümmerer K. *Pharmaceuticals in the environment: sources, fate, effects and risks*. Springer Science & Business Media. 2008.
 41. Kümmerer K. The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use—present knowledge and future challenges. *J Environ Manage* 2009; 90(8): 2354-2366.
 42. Bouki C, Venieri D, Diamadopoulos E. Detection and fate of antibiotic resistant bacteria in wastewater treatment plants: a review. *Ecotoxicol Environ Saf* 2013; 91: 1-9.
 43. Aminov RI, Garrigues-Jeanjean N, Mackie RI. Molecular ecology of tetracycline resistance: development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67(1): 22-32.
 44. Lee DY, Seo YS, Rayamajhi N, Kang ML, Lee SI, Yoo HS. Isolation, characterization, and evaluation of wild isolates of *Lactobacillus reuteri* from pig feces. *J Microbiol* 2009; 47(6): 663-672.
 45. Lee C1, Kim JY, Lee WI, Nelson KL, Yoon J, Sedlak DL. Bactericidal effect of zero-valent iron nanoparticles on *Escherichia coli*. *Environ Sci Technol* 2008; 42(13): 4927-4933.
 46. Zhang Y, Tsakalakos T, Muhammed M. Starch-coated superparamagnetic nanoparticles as MR contrast agents. *Chem Mater* 2003; 15: 4343-4351.
 47. Lee C1, Kim JY, Lee WI, Nelson KL, Yoon J, Sedlak DL. Bactericidal effect of zero-valent iron nanoparticles on *Escherichia coli*. *Environ Sci Technol* 2008; 42(13): 4927-4933.
 48. Li Z1, Greden K, Alvarez PJ, Gregory KB, Lowry GV. Adsorbed polymer and NOM limits adhesion and toxicity of nano scale zerovalent iron to *E. coli*. *Environ Sci Technol* 2010; 44(9): 3462-3467.
 49. Daily G. *Enlisting Ecosystem Services: Quantification and Valuation of Ecosystem Services to Inform Base Management*. DoD

- Environmental Security Technology Certification Program (ESTCP), *Project: RC-201113*. 2015.
50. Chen Q, Gao M, Li J, Shen F, Wu Y, Yao M. Inactivation and magnetic separation of bacteria from liquid suspensions using electrosprayed and nonelectrosprayed nZVI particles: observations and mechanisms. *Environ Science Technol* 2012; 46(4): 2360-2367.
51. Ma Y, Metch JW, Vejerano EP, Miller IJ, Leon EC, Marr LC, et al. Microbial community response of nitrifying sequencing batch reactors to silver, zero-valent iron, titanium dioxide and cerium dioxide nanomaterials. *Water Res* 2015; 68: 87-97.