ORIGINAL ARTICLE

# *Removal efficiency of Enzyme Horseradish Peroxidase in Removal of Tetracycline and Ciprofloxacin from Synthetic Wastewater*

Farzaneh Javan[1],
Mohammad Ali Zazouli[2],
Esmaeil Babanezhad[3],
Fathollah Gholami-Borujeni[4]

[1] MSc Student in Environmental Health Engineering, Faculty of Health, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] Professor, Department of Environmental Health Engineering, Faculty of Health, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Environmental Health Engineering, Faculty of Health, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[4] Associate Professor, Department of Environmental Health Engineering, Faculty of Health, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received April 28, 2020 ; Accepted August 2, 2020)

## *Abstract*

**Background and purpose:** So far, different methods have been used to remove residual antibiotics from aquatic environments. This study investigated the efficiency of enzyme horseradish peroxidase (HRP) in presence of hydrogen peroxide in removal of Tetracycline and Ciprofloxacin in a batch system.

**Materials and methods:** In an experimental study on laboratory scale, the effects of contact time, concentrations of $H_2O_2$, the antibiotics, and enzyme, and reaction pH on the performance of pure HRP enzyme in the presence of $H_2O_2$, were investigated. To measure the efficiency of the enzymatic process, the residual antibiotics were measured using HPLC equipped with a reverse phase column (C-18, 5% micrometer, 250 * 4.6 mm). The flow rate was 1 ml/min and the injection volume was 40 µl. The mobile phase of Tetracycline was 0.1 M TFA- methanol (60:40) used at 254 nm and the mobile phase of ciprofloxacin was 0.01 M acetonitrile- phosphate (8:92) at 220 nm. All experiments were performed in a discontinuous system at laboratory temperature.

**Results:** Removal efficiencies of Tetracycline and Ciprofloxacin were 40% and 95%, respectively, at 10 mg/l initial concentrations of antibiotics, 10-min contact time, Tetracycline pH= 4, and Ciprofloxacin pH= 7. The removal efficiency of Ciprofloxacin was two times more than that of Tetracycline.

**Conclusion:** The free HRP could be used as an effective process in removing Tetracycline and Ciprofloxacin from wastewater.

***Keywords:*** enzyme horseradish peroxidase, enzymatic process, Tetracycline, Ciprofloxacin, synthetic wastewater

**J Mazandaran Univ Med Sci 2020; 30 (189): 95-106 (Persian).**

* **Corresponding Author: Fathollah Gholami-Borujeni -** Faculty of Health, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran (E-mail: fa.gholami@mazums.ac.ir)



[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-25 ]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی ام شماره 189 مهر سال 1399 (106-95)

# کارایی آنزیم هورس رادیش پراکسیداز (HRP) در حذف آنتی بیوتیک های تتراسایکلین وسیپروفلوکساسین ازفاضلاب مصنوعی

**فرزانه جوان[1]**
**محمد علی زززولی[2]**
**اسماعیل بابانژاد اوریمی[3]**
**فتح اله غلامی بروجنی[4]**

## چکیده

**سابقه و هدف:** تاکنون روش‌های مختلفی برای حذف باقیمانده آنتی‌بیوتیک‌ها در محیط‌های آبی مورد مطالعه قرار گرفتند، در این مطالعه کارایی سیستم آنزیمی هورس رادیش پراکسیداز (HRP) در حضور آب اکسیژنه در حذف تتراسایکلین و سیپروفلاکساسین در یک سیستم ناپیوسته بررسی شد.

**مواد و روش‌ها:** در یک مطالعه تجربی در مقیاس آزمایشگاهی، اثر متغیرهای زمان تماس، غلظت آب اکسیژنه، غلظت آنتی‌بیوتیک، غلظت آنزیم و pH واکنش بر کارایی آنزیم HRP خالص در حضور آب اکسیژنه بررسی شد. برای سنجش کارایی فرایند آنزیمی و باقیمانده آنتی‌بیوتیک‌ها پس از فرایند، غلظت آنتی بیوتیک ها بااستفاده از HPLC مجهز به یک ستون فاز معکوس (C-18، 5 درصد میکرومتر، 4/6×250 میلی‌متر) اندازه‌گیری شد. سرعت جریان 1میلی‌لیتر در دقیقه وحجم تزریق 40 میکرولیتر بود. فازمتحرک تتراسایکلین TFA 0/1 مولار و متانول (60:40) بود که در طول موج 254 نانومتر مورد استفاده قرار گرفت و فازمتحرک سیپروفلوکساسین استونیتریل 0/01 مولار و بافرفسفات (8:92) و طول موج 220 نانومتر بود. تمامی آزمایشات در سیستم ناپیوسته و در دمای آزمایشگاه انجام شدند.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد در شرایط بهینه غلظت اولیه آنتی‌بیوتیک‌ها (10 mg/l)، زمان تماس 10 دقیقه، pH تتراسایکلین برابر 4 و pH سیپروفلوکساسین برابر 7، راندمان حذف آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین وسیپروفلوکساسین به‌ترتیب 40 و 95 درصد بوده است. نتایج نشان دادکه راندمان حذف آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین بیش از دو برابر تتراسایکلین بود.

**استنتاج:** فرآیند آنزیمی HRP آزاد در حضور آب اکسیژنه را می‌توان به عنوان یک فرآیند موثر برای حذف آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین وسیپروفلوکساسین از فاضلاب استفاده کرد.

**واژه های کلیدی:** آنزیم هورس رادیش پراکسیداز، فرایند آنزیمی، تتراسایکلین، سیپروفلوکساسین، فاضلاب مصنوعی

## مقدمه

امروزه داروها به عنوان بخش بسیار مهم و جدایی ناپذیر زندگی مدرن درنظرگرفته شده‌اند و برای معالجه بیماری‌های انسان وحیوان مورد استفاده قرار می‌گیرند(1).

**مولف مسئول: فتح اله غلامی بروجنی -** ساری: دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دانشکده بهداشت E-mail: fa.gholami@mazums.ac.ir

1. دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، مازندران، ایران
2. استاد، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، مازندران، ایران
3. استادیار، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، مازندران، ایران
4. دانشیار، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، مازندران، ایران

تاریخ دریافت : 1399/2/9 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات :1399/2/10 تاریخ تصویب : 1399/5/12



[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-25 ]

سالانه به‌طور متوسط 100تا200 هزار تن آنتی‌بیوتیک در جهان استفاده می‌شود که به دلیل پایداری در محیط، اثرات مخربی برمحیط زیست دارند(2). اغلب آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی در بدن انسان و حیوان متابولیزه نمی‌شوند و حدود 90 درصد آن‌ها پس از مصرف دفع می‌شود. بنابراین قسمت اصلی این ترکیبات از طریق ادرار و مدفوع از بدن خارج می‌شوند(3). آنتی‌بیوتیک‌های آزاد شده در محیط، آلاینده مهم دارویی هستند که ممکن است ازطریق فاضلاب صنایع دارویی، فاضلاب کلینیکی بیمارستان و دامپزشکی به همراه منابع فاضلاب خانگی و پساب‌های کشاورزی و استخرهای پرورش ماهی وارد منابع آب شوند(4). آنتی‌بیوتیک‌ها معمولا در داروهای انسانی و دامپزشکی استفاده می‌شوند و به عنوان آلاینده‌های نوظهور توجه زیادی از محققین را به خود جلب کرده‌اند(5). تتراسایکلین یکی از پرکاربردترین داروهای آنتی‌بیوتیکی در درمان انسان، دامپزشکی و آبزی پروری است و در استفاده و تولید جهانی رتبه دوم بین آنتی‌بیوتیک‌ها را دارد(6). حضور آنتی بیوتیک تتراسایکلین در فاضلاب در غلظت‌های1560- 0/11 میکروگرم درلیتر گزارش شده است(7). وجود تتراسایکلین و سایر آنتی‌بیوتیک‌ها درمحیط‌های طبیعی می‌تواند باعث ایجاد و انتقال ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در باکتری‌ها شود که به‌طور بالقوه عملکردهای اکوسیستم و سلامت انسان را تهدید می‌کند(8).

سیپروفلوکساسین یک داروی ضد میکروبی است که درسراسر جها در داروهای انسانی و همچنین برای حیوانات به منظور کنترل عفونت‌های میکروبی مورد استفاده قرارمی‌گیرد(4). سیپروفلوکساسین یک آنتی‌بیوتیک شیمی درمانی است که به گروه فلوئورکینولون‌های دارویی تعلق دارد. سیپروفلوکساسین در غلظت‌های بین 1245/5-0/7 میکروگرم در لیتر درپساب بیمارستان گزارش شده است(9). برای جلوگیری ازآلودگی ماتریس‌های محیطی، چندین فرایند برای حذف آنتی‌بیوتیک‌ها مورد مطالعه قرارگرفته است. ازجمله روش‌های متداول (فرآیندهای بیولوژیکی، فیلتراسیون، کواگولاسیون، فرآیندهای غشایی، جذب و فرآیند اکسیداسیون پیشرفته و استفاده از نانوکامپوزیت‌ها(10) می‌باشد، که فرآیند اکسیداسیون پیشرفته نیاز به افزودن کاتالیزور واکسیدان‌های گران قیمت دارد و ممکن است آلودگی ثانویه داشته باشد. این روش‌های حذف دارای محدودیت‌هایی از جمله هزینه بالا، تولید لجن و کارایی پایین می‌باشند(11). تصفیه آنزیمی از دیرباز به دلیل مزایایی که نسبت به سایر روش‌های متداول تصفیه ترکیبات سمی دارد، مورد توجه بسیاری ازمحققان قرار گرفته است. فرآیندهای تصفیه آنزیمی می‌توانند در غلظت‌های بالای آلاینده و دامنه گسترده pH، دما و سطح شوری بالا انجام شوند(12). آنزیم پراکسیداز از مهم‌ترین آنزیم‌های خانواده اکسیدوردوکتازها بوده و با EC:1.11.17 مشخص می‌شوند و درصنایع شیمایی، زیست محیطی، دارویی و بیوتکنولوژی کاربرد دارند(13). پراکسیدازها از بسیاری ازگونه های گیاهان، حیوانات و میکروارگانیسم‌ها جدا شده‌اند(14). مزایای تصفیه آنزیمی ویژگی بسترگسترده است و غیرفعال‌سازی قابل توجه آنزیم ممکن است در مرحله پلیمریزاسیون نیز رخ دهد. رادیکال‌های آزاد تولیدشده در جذب چرخه کاتالیزوری به سایت فعال آنزیم و مانع از دسترسی به ساختارها می‌شود(15). مطالعات زیادی در خصوص یا زمینه روش‌های حذف آنزیمی آلاینده‌ها با استفاده از آنزیم HRP انجام شده است. از جمله این مطالعات، مطالعه Mohan و همکاران است که از فرآیند کاتالیز شده HRP آزاد و تثبیت شده جهت تجزیه رنگ آزو استفاده نمودند. نتایج این مطالعه نشان داد که HRP قابلیت یا توانایی تخریب رنگ در فاز آبی را دارد. مطالعات بیش‌تری برای درک پارامترهای فرآیند مانند pH، $H_2O_2$، رنگ وغلظت آنزیم در طی فرآیند تخریب رنگ با استفاده از آنزیم انجام شد و

[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-25 ]

آنزیم تثبیت شده عملکرد پایین‌تری را نسبت به آنزیم آزاد داشت(16).

de Souza و همکاران از فرآیند آنزیم HRP جهت تجزیه سمیت رنگ‌های نساجی استفاده نمودند و نتایج این مطالعه نشان دادکه تجزیه رنگ Lanset blue 2R 94 درصد و برای تجزیه پساب‌های نساجی 52 درصد بود(15). Tatsumi و همکاران از فرآیندHRP تثبیت شده برای حذف کلروفنل از فاضلاب استفاده نمودند و نتایج مطالعه آن‌ها نشان داد که حذف کل کربن آلی (TOC) و هالوژن آلی قابل جذب (AOX) به ترتیب به بیش از 90 درصد رسید. حذف ۲،۴،۵ تری کلروفنل 36 درصد کم‌ترین میزان حذف را داشت(19).

غلامی و همکاران از فرآیند آنزیمHRP و آب اکسیژنه جهت حذف آلکیل بنزیل سولفونات خطی (LAS) از محیط‌های آبی استفاده نمودند و بر اساس نتایج مطالعه آن‌ها راندمان حذف دترجنت آنیونی بیش از 98 درصد بعد از 60 دقیقه زمان تماس بود(20). هدف از انجام مطالعه حاضر، بررسی کارایی آنزیم نزیم HRP در حذف آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین و سیپروفلوکساسین ازفاضلاب سنتیک است.

## مواد و روش ها

این مطالعه ازنوع تجربی- کاربردی بود که به صورت ناپیوسته در مقیاس آزمایشگاهی برروی غلظت‌های مختلفی از محلول سنتتیک حاوی آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین و سیپروفلوکساسین انجام گرفت.

*مشخصات مواد مورد استفاده*

آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین، سیپروفلوکساسین، متانول، تری فلوئوراستیک اسید، $KH_2PO_4$ مورد نیاز و سایرمواد شیمیایی مورد استفاده در این پژوهش از شرکت Sigma-Aldrich خریداری شد. محلول استوک تتراسایکلین وسیپروفلوکساسین با گرید آزمایشگاهی 99 درصد (1000 میلی‌گرم برلیتر) تهیه شد و در دمای 4 درجه سلسیوس تا زمان استفاده نگهداری گردید.

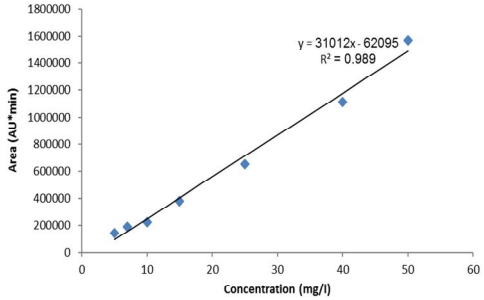
*روش انجام آزمایشات*

جهت انجام مطالعه محلول‌ها باغلظت‌های موردنظر با استفاده از محلول استوک تهیه شد. به منظور تعیین متغیرهای مستقل غلظت پراکسیدهیدروژن (1، 2، 3، 4 و 5 میلی‌گرم در لیتر)، همچنین پراکسیدهیدروژن 30 درصد مورد استفاده قرار گرفت، غلظت آنزیم (0/1، 0/3، 0/5 یونیت در لیتر)، غلظت اولیه آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین و سیپروفلوکساسین (10 mg/l، 20، 30، 40، 50)، زمان تماس (0 تا60 دقیقه)، pH (4،7،10) در نظر گرفته شد و برای تنظیم pH از اسیدکلریدریک و سودیک نرمال استفاده گردید. تمامی مطالعات درمقیاس آزمایشگاهی و در دمای آزمایشگاه صورت گرفت.

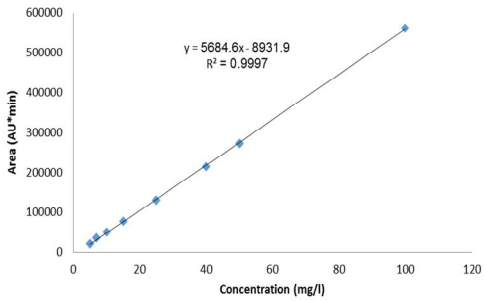
*اندازه گیری غلظت آنتی بیوتیک باقیمانده*

غلظت آنتی بیوتیک ها بااستفاده از HPLC مجهز به یک ستون فاز معکوس (C-18، 5 درصد میکرومتر، 4/6×250 میلی‌متر) اندازه‌گیری شد. سرعت جریان 1میلی‌لیتر در دقیقه وحجم تزریق 40 میکرولیتر بود. فاز متحرک تتراسایکلین TFA 0/1 مولار و متانول (60:40) بود که در طول موج 254 نانومتر مورد استفاده قرار گرفت و فازمتحرک سیپروفلوکساسین استونیتریل 0/01 مولار و بافرفسفات (8:92) و طول موج 220 نانومتر بود. پیش از سنجش باقی‌مانده آنتی‌بیوتیک منحنی کالیبراسیون دستگاه با استفاده از غلظت‌های تتراسایکلین و سیپروفلوکساسین مورد آزمایش ترسیم شد. که این منحنی‌ها در نمودارهای شماره 1و2 نشان داده شده است.

[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-25 ]




**نمودار شماره 1:** منحنی کالیبراسیون دستگاه HPLC مورد استفاده درسنجش تتراسایکلین




**نمودار شماره 2:** منحنی کالیبراسیون دستگاه HPLC مورداستفاده در سنجش سیپروفلوکساسین

*محاسبه راندمان حذف انتی بیوتیک ها*

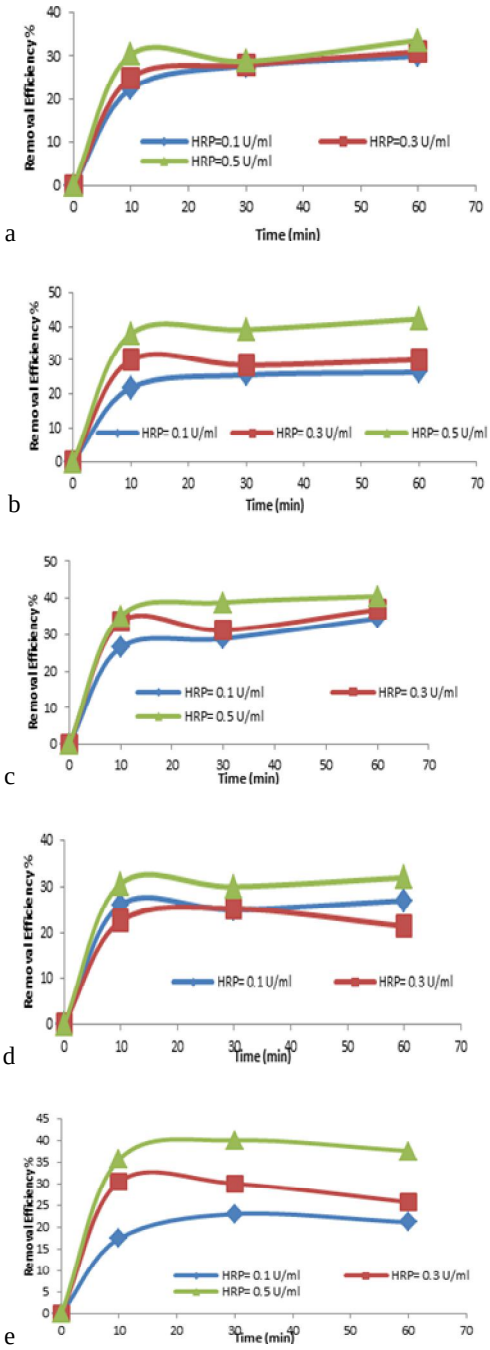
پس از انجام فرایند اکسیداسیون آنزیمی، غلظت ثانویه آنتی‌بیوتیک‌ها آنالیز شد و راندمان حذف با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$Efficiency(\%) = \frac{Cout - Cin}{Cout} \times 100$$

که در این معادله $C_{in}$ غلظت آنتی بیوتیک اولیه و $C_{out}$ غلظت آنتی بیوتیک ثانویه می باشد.

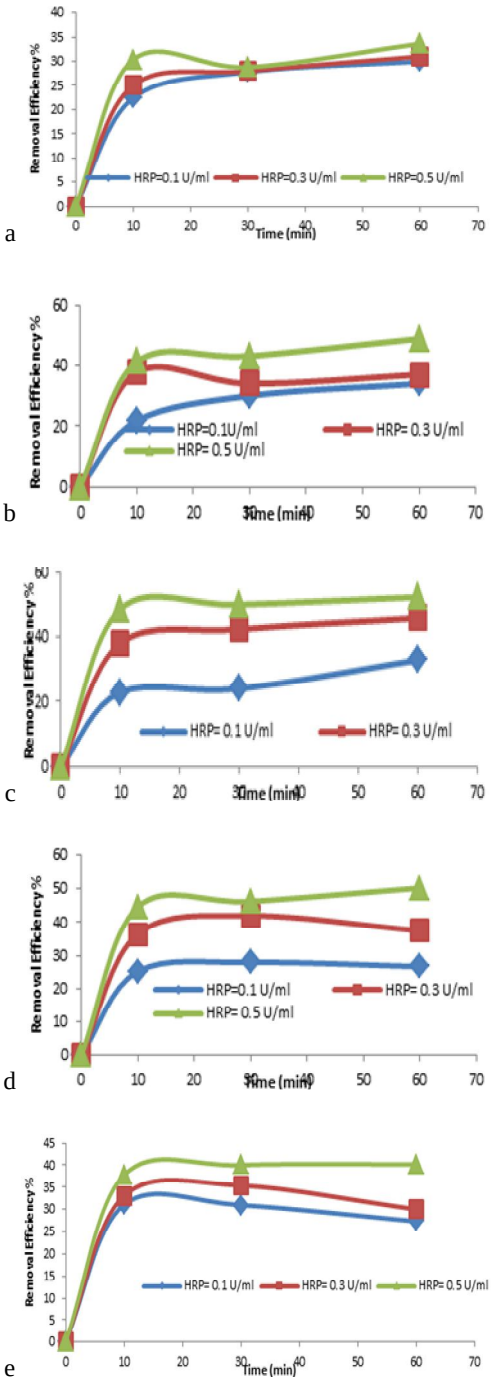
## یافته ها

به‌منظور تعیین سطح بهینه زمان تماس، غلظت آلاینده، غلظت آنزیم، غلظت آب اکسیژنه و pH فرایند آنزیمی با استفاده از روش آزمایش یک فاکتور مستقل برای هر کدام از آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه، با ثابت نگه‌داشتن هرکدام از متغیرها، سطح بهینه فرایند آنزیمی، حذف آنتی‌بیوتیک‌ها به‌دست آمد. نتایج هرکدام از سطوح فاکتورها در نمودارهای‌های شماره 8-3 آورده شده است.

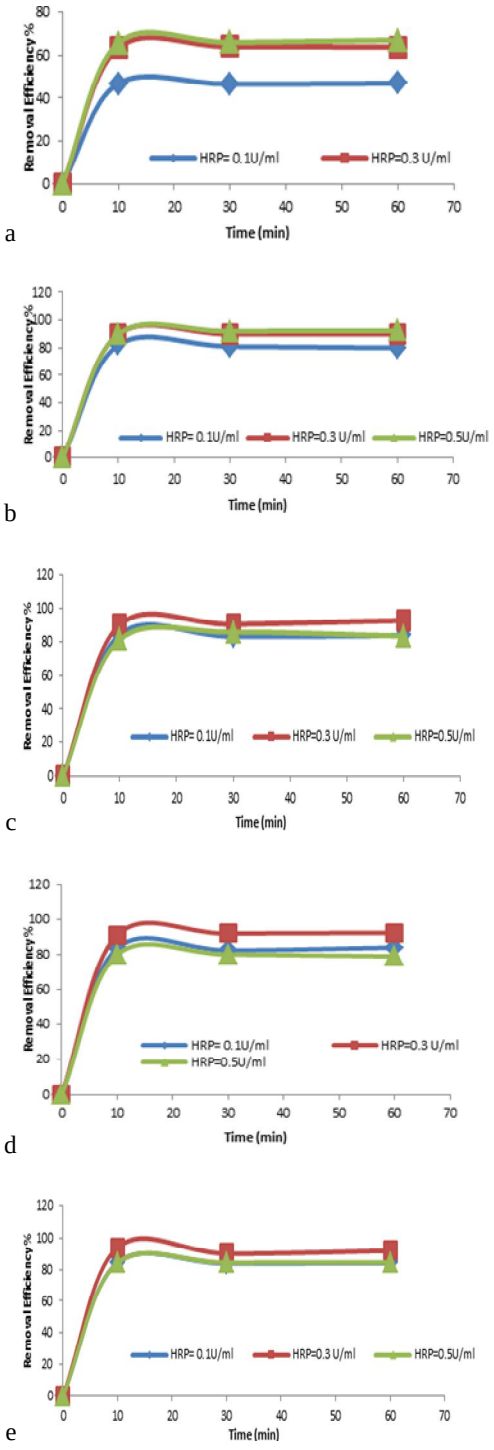



**نمودار شماره 3:** اثر زمان تماس، غلظت آب اکسیژنه و غلظت آنزیم بر راندمان حذف تتراسایکلین در غلظت اولیه 10 mg/l و pH=4 ( a: $H_2O_2$=1 mg/l ، b: $H_2O_2$=2 mg/l ، c: $H_2O_2$=3 mg/l ، d: $H_2O_2$=4 mg/l ، e: $H_2O_2$=5 mg/l )

[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-25 ]

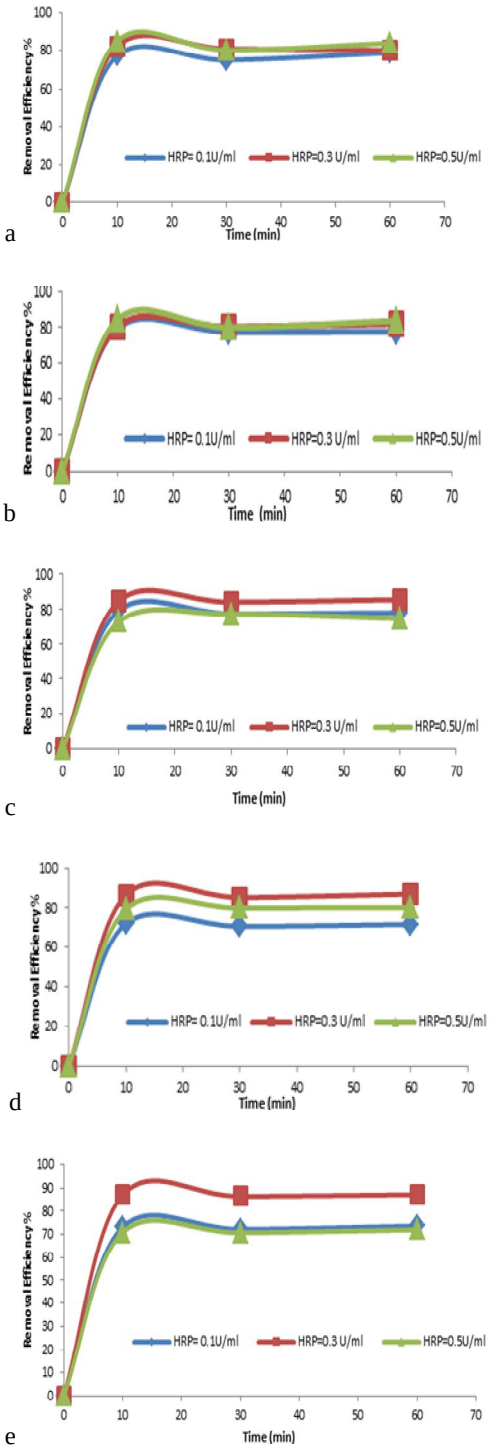



**نمودار شماره 4:** اثر غلظت تتراسایکلین و آنزیم بر راندمان حذف تتراسایکلین در غلظت اولیه ثابت آب اکسیژنه 1 mg/l و pH=4 (a: Tetracycline=10 mg/l، b: Tetracycline=20 mg/l، c: Tetracycline=30 mg/l، d: Tetracycline=40 mg/l، e: Tetracycline=50 mg/l)

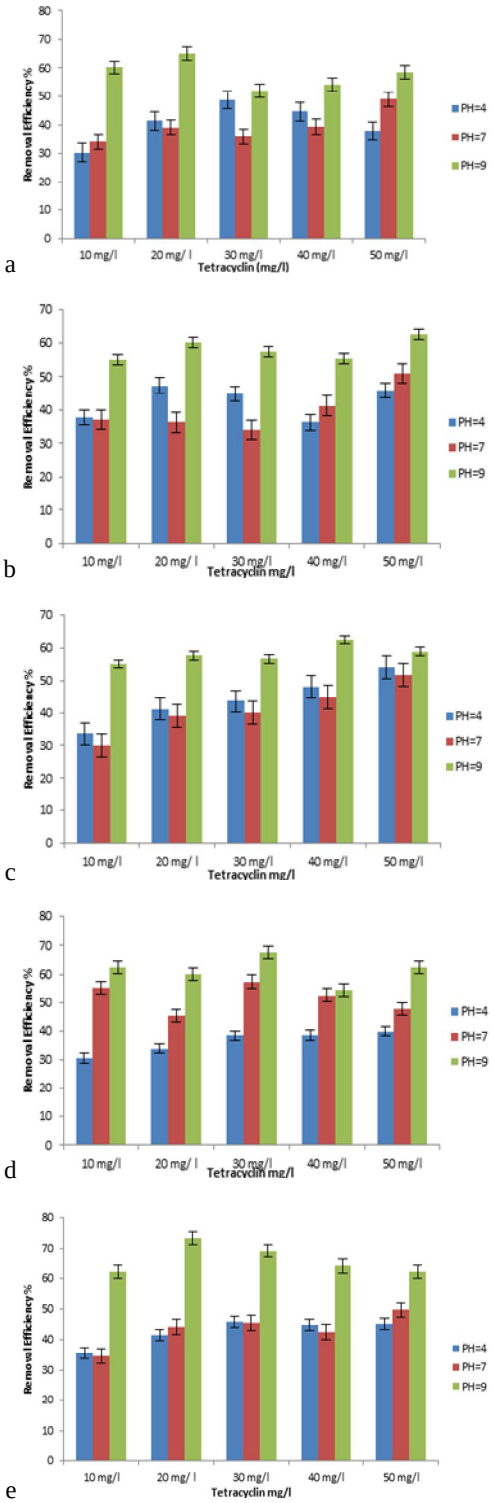



**نمودار شماره 5:** اثر زمان تماس، غلظت آب اکسیژنه و غلظت آنزیم بر راندمان حذف سیپروفلوکساسین در غلظت اولیه 10 mg/l و pH=7 (a: $H_2O_2$=1 mg/l ، b: $H_2O_2$=2 mg/l ، c: $H_2O_2$=3 mg/l ، d: $H_2O_2$=4 mg/l ، e: $H_2O_2$=5 mg/l)

[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-25 ]

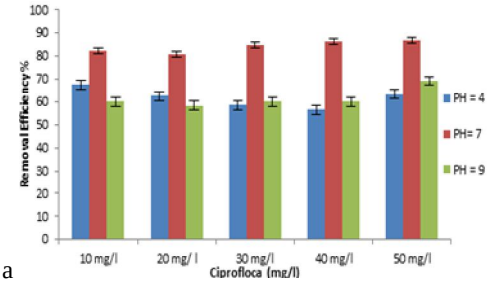



**نمودار شماره 6:** اثر غلظت سیپروفلوکساسین و آنزیم بر راندمان حذف سیپروفلوکساسین در غلظت ثابت اولیه آب اکسیژنه 1 mg/l و pH=7 (a: Cipro=10 mg/l، b: Cipro=20 mg/l، c: Cipro =30 mg/l، d: Cipro =40 mg/l، e: Cipro =50 mg/l)

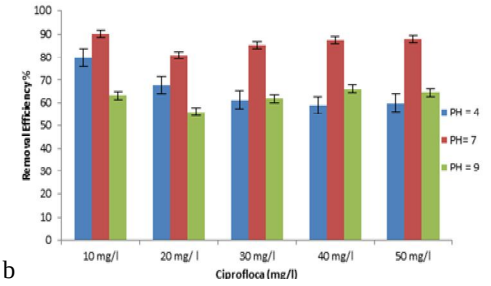



**نمودار شماره 7:** تاثیرهمزمان متغیرهای pH، $H_2O_2$ و غلظت آنتی‌بیوتیک بر فرایند آنزیمی حذف تتراسایکلین در زمان تماس 10 دقیقه و غلظت 0/5 U/ml آنزیم نزیم HRP (a: $H_2O_2$=1 mg/l ، b: $H_2O_2$=2 mg/l ، c: $H_2O_2$=3 mg/l ، d: $H_2O_2$=4 mg/l ، e: $H_2O_2$=5 mg/l)

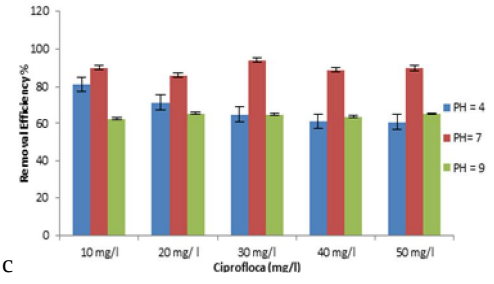
[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-25 ]



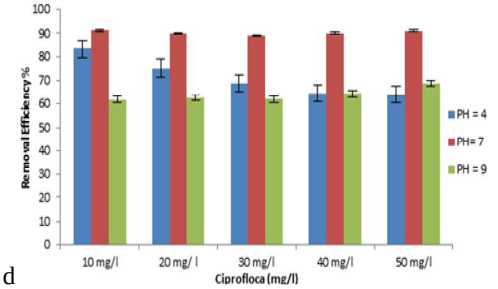
a



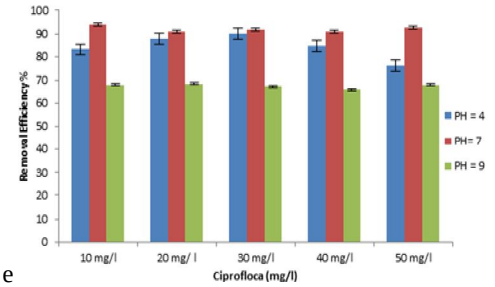
b



c



d



e

**نمودار شماره 8:** تاثیرهمزمان متغیرهای pH، $H_2O_2$ و و غلظت آنتی بیوتیک بر فرایند آنزیمی حذف سیپروفلوکساسین در زمان تماس 10 دقیقه و غلظت 0/3 U/ml آنزیم HRP (a: $H_2O_2$=1 mg/l ، b: $H_2O_2$=2 mg/l ، c: $H_2O_2$=3 mg/l ، d: $H_2O_2$=4 mg/l ، e: $H_2O_2$=5 mg/l)

به منظور بررسی تاثیر غلظت آنزیم، غلظت های مختلف درگستره (0/1، 0/3 و 0/5 U/ml) استفاده شد. نتایج در نمودار شماره 3 آورده شده است. آزمایش بر روی غلظت تتراسایکلین 10 mg/l در pH=4 انجام شد. نتایج به دست آمده نشان داد که راندمان حذف تتراسایکلین درزمان تماس 10 دقیقه به بیش ترین مقدار می‌رسد و پس از آن با افزایش زمان تماس اختلاف معنی‌داری در حذف دیده نمی‌شود. به منظور بررسی تاثیر آب اکسیژنه در غلظت مختلف (1، 2، 3، 4 و 5 mg/l) مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج نشان دادکه افزایش غلظت آب اکسیژنه باعث افزایش راندمان حذف آنتی بیوتیک تتراسایکلین شده است و نسبت بهینه آنزیم به آب اکسیژنه برابر 0/1 به‌دست آمد.

دراین مرحله آزمایش غلظت‌های متغیر تتراسایکلین (10 mg/l، 20، 30، 40، 50) و آنزیم با ثابت نگه داشتن آب اکسیژنه مورد بررسی قرا گرفت. نتایج آزمایشات (نمودار شماره 4) نشان داد غلظت 10mg/l آنتی بیوتیک تتراسایکلین حداکثرکارایی حذف درمدت زمان 10 دقیقه برابر با40 درصد را داشته است. با افزایش غلظت آنزیم و تترا سایکلین به دلیل ثابت بودن آب اکسیژنه، راندمان حذف بعد از 10 دقیقه ابتدایی واکنش، تغییر معنی داری نداشته است.

به منظور بررسی تاثیر غلظت آنزیم، غلظت های مختلف درگستره (0/1 U/ml ، 0/3 و 0/5) استفاده شد. نتایج در نمودار شماره 5 آورده شده است. آزمایش برروی غلظت سیپروفلوکساسین 10 mg/l در pH=7 انجام شد و نتایج به دست آمده نشان داد که راندمان حذف سیپروفلوکساسین درزمان تماس 10 دقیقه به بیش ترین مقدار می‌رسد و پس از آن با افزایش زمان تماس اختلاف معنی‌داری در حذف دیده نمی‌شود.

به منظور بررسی تاثیر آب اکسیژنه در غلظت مختلف(1-5 mg/l) مورد ازمایش قرار گرفت. نتایج نشان داد که افزایش غلظت آب اکسیژنه باعث افزایش راندمان حذف آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین شده

[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-25 ]

است و نسبت بهینه آنزیم به آب اکسیژنه برابر 0/5 بدست آمد و در این نسبت راندمان حذف به 95 درصد در 10 دقیقه ابتدایی واکنش رسید.

دراین مرحله آزمایش غلظت های مختلف آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین و آنزیم (0/1 U/ml ، 0/3 و 0/5) با ثابت نگه داشتن آب اکسیژنه و pH=7 مورد بررسی قرار گرفت. غلظت 10 mg/l آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین حداکثرکارایی حذف درمدت زمان 10 دقیقه برابر با 95 درصد را داشته است.

در فرآیند آنزیمی، pH می تواند در حذف آلاینده‌ها تاثیرگذار باشد، میزان حذف درpH قلیایی بیش‌ترین بود. به‌منظور بررسی تاثیرpH در راندمان حذف غلظت‌های مختلف آنتی بیوتیک تتراسایکلین، آزمایش درpH=9 (غلظت 0.5U/ml آنزیم HRP و زمان تماس 10 دقیقه، غلظت آنتی‌بیوتیک 20 mg/l ، H2O2= 5 mg/l) درصد حذف 70 درصد بدست آمد (نمودار شماره 7).

در فرآیند آنزیمی pH می‌تواند در حذف آلاینده‌ها تاثیرگذار باشد نتایج مطالعه نشان داد میزان حذف در pH خنثی بیش‌ترین مقدار بوده است (نمودار شماره 8). نتایج آزمایش نشان داد درpH:7 (غلظت 0.3U/ml آنزیم HRP وزمان تماس 10 دقیقه، غلظت آنتی‌بیوتیک 10 mg/l، $H_2O_2$ = 5 mg/l) حذف 95درصد بدست آمد.

## بحث

به منظور بررسی راندمان حذف آنتی بیوتیک تتراسایکلین و سیپروفلوکساسین توسط فرآیند آنزیم HRP، اثر پارامترهای مختلف مانند زمان واکنش، غلظت اولیه آنتی‌بیوتیک، pH ، غلظت آب اکسیژنه، غلظت بهینه آنزیم مورد بررسی قرار گرفت. آنزیم HRP دربسیاری از مطالعات برای تبدیل بسیاری از ترکیبات سمی صنعتی، مانند فنل، آنیلین(17)، رنگ آزو(18) روغن(16)، سولفونامید(15)، آلکیل بنزیل سولفونات خطی(19) مورد مطالعه قرار گرفته است. مطالعات نشان می‌دهند که پراکسیدازها متعاقب فعال شدن با پراکسید هیدروژن می‌توانند بسیاری از مواد آروماتیک را اکسید کنند. این آنزیم‌ها واکنش‌های زیادی را کاتالیز می‌کنند ولی همه آن‌ها نیاز دارند به ترکیبی مانند آب اکسیژنه دارند که فعال سازی شوند. آب اکسیژنه ابتدا آنزیم را اکسید کرده که در چرخه اکسیداسیون سوبسترا کمک می‌کند. مکانیزم فعالیت آنزیم پراکسیداز به شکل زیر می‌باشد(18):

$$E + H_2O_2 \rightarrow Ei + H_2O \quad (1)$$

$$Ei + AH_2 \rightarrow Eii + AH^* \quad (2)$$

$$Eii + AH_2 \rightarrow E + AH^* + H_2O \quad (3)$$

در این فرمول‌ها: E: آنزیم، Ei: ترکیب میانی 1، Eii: ترکیب میانی 2، $AH_2$: ترکیب حلقوی، $AH^0$ : رادیکال آزاد است.

آنزیم با استفاده از آب اکسیژنه اکسید شده و به فرم ترکیب میانی فعال 1 (Ei) تبدیل می شود. این ترکیب نیز یک مولکول از ترکیب حلقوی را روی سایت فعال خود دریافت می‌کند و پس از واکنش، ترکیب حلقوی اکسید شده و یک رادیکال آزاد تولید می‌شود و وارد محیط واکنش شده و سپس ترکیب میانی 2 تولید شده یک مولکول دیگر از ترکیب حلقوی را اکسید کرده و رادیکال آزاد دیگری را آزاد می کند و به فرم طبیعی خود برمی‌گردد و چرخه فعالیت آنزیم دوباره تکرار می‌گردد. در طی واکنش، حذف آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین و سیپروفلوکساسین درشرایط بهینه در10 دقیقه اول ایجاد شد و در بعد از آن تغییرات معنی‌داری مشاهده نمی شد و ثابت بود که می‌تواند ناشی از عوامل مختلفی مانند کاهش غلظت عوامل واکنش (آنزیم و آب اکسیژنه) باشد. نتایج این مطالعه نشان داد pH بهینه برای واکنش آنزیمی در حذف آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین برابر 4 و آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین برابر 7 بوده است.

نتایج نشان داد نسبت بهینه $HRP/H_2O_2$=0/5 بیش‌ترین راندمان را در حذف آلاینده‌ها دارد. در یک

[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-25 ]

مطالعه تاثیر pH برفعالیت لاکاز آزاد وتثبیت شده در محدوده pH=2.5 – 8.5 بررسی شد و نتایج نشان داد حداکثر فعالیت آنزیم لاکاز آزاد در pH= 5.5 موفقیت آمیزبود و شرایط بیش از حد اسید (pH<3.5) وبیش از حدقلیایی (pH>7.5) هردو برای فعالیت لاکاز آزاد و تثبیت شده مناسب نبودند(20). بررسی‌ها نشان می‌دهد pH برفعالیت آنزیم لاکاز تاثیرمی‌گذارد و با افزایش pH از 3 به 6 ، میزان حذف آنتی بیوتیک تتراسایکلین و سولفونامیدها افزایش یافته است(11). در مطالعه دیگری، حذف پنتاکلروفنل توسط آنزیم HRP همراه با افزایش غلظت اولیه پنتاکلروفنل در محدوده غلظت 13- 0/5 میلی گرم برلیتر تحت همان فعالیت آنزیم و غلظت پراکسیدهیدروژن افزایش یافته است(21).

درفرآیندهای آنزیمی، انتخاب غلظت $H_2O_2$ متناسب به نوع وغلظت آلاینده ضرورت دارد. به منظور بررسی تاثیر $H_2O_2$ به عنوان عامل فعال‌کننده آنزیم، نتایج این مطالعه نشان داد با افزایش غلظت پراکسیدهیدروژن، راندمان حذف افزایش یافته و نسبت بهینه آب اکسیژنه به آنزیم برای تتراسایکلین و سیپروفلوکساسین به ترتیب 0/1 و 0/5 به‌دست آمد. نتایج سایر مطالعات نشان داد، افزایش غلظت پراکسیدهیدروژن می‌تواند باعث افزایش درصد حذف فنل می‌شود. ابتدا مقدار فنل حذف شده با افزایش پراکسیدهیدروژن تا حد مطلوب به شدت افزایش یافت. پس از تبدیل فنل به نقطه مطلوب رسید و با افزودن پراکسیدهیدروژن به طور قابل توجهی راندمان حذف فنل کاهش پیدا کرد که محققین علت این پدیده را مقدار بیش ازحد پراکسیدهیدروژن ذکر کردند که فعالیت آنزیم را مهار می‌کند وآنزیم توسط پراکسیدهیدروژن غیرفعال می‌شود(22).

نتایج این مطالعه نشان داد، غلظت اولیه آنتی‌بیوتیک‌ها در نهایت پس از 10 دقیقه زمان تماس تاثیر معنی‌داری بر راندمان حذف ندارد و با افزایش زمان تماس به دلیل آزاد شدن مجدد آنزیم تمامی مولکول‌های آلاینده اکسید شدند. ولی در زمان تماس 10 دقیقه اختلاف بین غلظت‌های مختلف آنتی بیوتیک و راندمان حذف معنی‌دار نبوده است. همزمان با افزایش زمان واکنش، فعالیت آنزیم به تدریج کاهش می‌یابد و پس از 2 ساعت اکثر آنزیم‌ها فعالیت خود را از دست می‌دهند(23).

نتایج این مطالعات نشان داد که آنزیم آزاد HRP، می‌تواند به‌عنوان روشی کارآمد برای حذف آنتی‌سیپروفلوکساسین از فاضلاب مورد استفاده قرار گیرد. در این شرایط بازده حذف آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین از فاضلاب سنتتیک 40 درصد و برای آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین بیش از 95 درصد بود. شرایط بهینه زمان ماند 10 دقیقه وpH آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین برابر 9 و سیپروفلوکساسین برابر 7، غلظت آب اکسیژنه 5 میلی گرم درلیتر در دمای محیط به دست آمد. نتایج نشان داد که کارایی آنزیم آزاد در حذف آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین بیش‌تر ازآنتی‌بیوتیک تتراسایکلین بود.

## سپاسگزاری

این مقاله حاصل پایان نامه دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی بهداشت محیط دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی مازندران و طرح پژوهشی مصوب معاونت تحقیقات و فناوری به شماره IR.MAZUMS.REC.1398.4942 می‌باشد. نویسندگان مقاله از حمایت مالی و معنوی آن معاونت تشکر و قدردانی می نمایند.

## References

1. Shokoohi R, Leili M, Dargahi A, Vaziri Y, Khamutian R. Common Antibiotics in Wastewater of Sina and Besat Hospitals, Hamadan, Iran. Arch Hyg Sci 2017; 6(2): 152-159 (Persian).
2. Suda T, Hata T, Kawai S, Okamura H, Nishida T. Treatment of tetracycline antibiotics by laccase in the presence of 1-hydroxybenzotriazole.

[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-25 ]

Bioresource Technology 2011; 103(1): 498-501.

3. Baquero F, Martínez JL, Cantón R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. Curr Opin Biotechnol 2008; 19(3): 260-265.
4. Rakhshandehroo GR, Salari M, Nikoo MR. Optimization of degradation of ciprofloxacin antibiotic and assessment of degradation products using full factorial experimental design by Fenton homogenous process. Global NEST Journal 2018; 20(2): 324-332.
5. Yang J, Lin Y, Yang X, Ng TB, Ye X, Lin J. Degradation of tetracycline by immobilized laccase and the proposed transformation pathway. J Hazard Mater 2017; 322(Pt B): 525-531.
6. Qi N, Wang P, Wang C, Ao Y. Effect of a typical antibiotic (tetracycline) on the aggregation of TiO2 nanoparticles in an aquatic environment. Journal of Hazardous Materials 2018; 341: 187-197.
7. Rahmani K, Rahmani A, Rahmani H, Zare MR. Tetracycline Removal from Aqueous Solution by Nano Zero Valent Iron/UV/H2O2 Process. Journal of Environmental Health Enginering 2015; 2(4): 294-304 (Persian).
8. Liu H, Yang Y, Kang J, Fan M, Qu J. Removal of tetracycline from water by Fe-Mn binary oxide. J Environ Sci 2012; 24(2): 242-247.
9. Alonso JJS, El Kori N, Melián-Martel N, Del Río-Gamero B. Removal of ciprofloxacin from seawater by reverse osmosis. Journal of Environmental Management 2018; 217: 337-345.
10. Ory J, Bricheux G, Togola A, Bonnet JL, Donnadieu Bernard F, Nakusi L, et al. Ciprofloxacin residue and antibiotic-resistant biofilm bacteria in hospital effluent. Environ Pollut 2016; 214: 635-645.
11. Githinji LJ, Musey MK, Ankumah RO. Evaluation of the fate of ciprofloxacin and amoxicillin in domestic wastewater. Water Air and Soil Pollution 2011; 219(1-4): 191-201.
12. Mostafaloo R, Asadi Ghalhari M, Izanloo H, Zayadi A. Photocatalytic degradation of ciprofloxacin antibiotic from aqueous solution by BiFeO3 nanocomposites using response surface methodology. Global Journal of Environmental Science and Management 2020; 6(2): 191-202.
13. Ding H, Wu Y, Zou B, Lou Q, Zhang W, Zhong J, etal. Simultaneous removal and degradation characteristics of sulfonamide, tetracycline, and quinolone antibiotics by laccase-mediated oxidation coupled with soil adsorption. J Hazard Mater 2016; 307: 350-358.
14. Bilal M, Rasheed T, Iqbal HM, Hu H, Wang W, Zhang X. Horseradish peroxidase immobilization by copolymerization into cross-linked polyacrylamide gel and its dye degradation and detoxification potential. Int J Biol Macromol 2018; 113: 983-990.
15. Souza SM UD, Forgiarini E, de Souza AAU. Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP). Journal of Hazardous Materials 2007; 147(3): 1073-1078.
16. Mohan SV, Prasad KK, Rao NC, Sarma P. Acid azo dye degradation by free and immobilized horseradish peroxidase (HRP) catalyzed process. Chemosphere 2005; 58(8): 1097-1095.
17. Gholami Borujeni F, Faramarzi MA, Nejatzadeh F, Mahvi A. Oxidative degradation and detoxification of textile azo dye by horseradish peroxidase enzyme. Fresenius Environmental Bulletin 2013; 22(3): 739-744.

[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-25 ]

18. Yang L, Shi Y, Li J, Fang L, Luan T. Transformation of aqueous sulfonamides under horseradish peroxidase and characterization of sulfur dioxide extrusion products from sulfadiazine. Chemosphere 2018; 200: 164-172.
19. Tatsumi K, Wada S, Ichikawa H. Removal of chlorophenols from wastewater by immobilized horseradish peroxidase. Biotechnology and Bioengineering 1996; 51(1): 126-130.
20. Gholami-Borujeni F, Nejatzadeh F, Jamalan M. Efficacy of horseradish peroxidase (HRP) enzyme process and H2O2 in removal of linear alkyl benzene sulfonate (LAS) from aqueous solution. J Mazandaran Univ Med Sci 2018;27(157):217-229 (Persian).
21. Shan J, Han L, Bai F, Cao S. Enzymatic polymerization of aniline and phenol derivatives catalyzed by horseradish peroxidase in dioxane (II). Polymers for Advanced Technologies 2003; 14(3-5): 330-336.
22. Gholami-Borujeni F, Mahvi A, Nasseri S, Faramarzi MA, Nabizadeh R, Alimohammadi M. Enzymatic treatment and detoxification of acid orange 7 from textile wastewater. Applied Biochemistry and Biotechnology 2011; 165(5-6): 1274-1284.
23. Gholami Borujeni F, Nejatzadeh Barandozi F, Mahvi AH. Application of low purity horseradish peroxidase enzyme to removal of oil from oily wastewater. Desalination and Water Treatment 2016;57(42):19760-19767.

[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-25 ]