

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

Farzaneh Javan¹,
Mohammad Ali Zazouli²,
Esmail Babanezhad³,
Fathollah Gholami-Borujeni⁴

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 H₂O₂, the antibiotics, and enzyme, and reaction pH on the performance of pure HRP enzyme in the presence of H₂O₂, 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)

کارایی آنزیم هورس رادیش پراکسیداز (HRP) در حذف آنتی بیوتیک های تتراسایکلین و سیپروفلوکساسین از فاضلاب مصنوعی

فرزانه جوان¹

محمد علی ززولی²

اسماعیل بابانژاد اوریمی³

فتح اله غلامی بروجنی⁴

چکیده

سابقه و هدف: تاکنون روش های مختلفی برای حذف باقیمانده آنتی بیوتیک ها در محیط های آبی مورد مطالعه قرار گرفتند، در این مطالعه کارایی سیستم آنزیمی هورس رادیش پراکسیداز (HRP) در حضور آب اکسیژنه در حذف تتراسایکلین و سیپروفلوکساسین در یک سیستم ناپیوسته بررسی شد.

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

یافته ها: نتایج نشان داد در شرایط بهینه غلظت اولیه آنتی بیوتیک ها (10 mg/l)، زمان تماس 10 دقیقه، pH تتراسایکلین برابر 4 و pH سیپروفلوکساسین برابر 7، راندمان حذف آنتی بیوتیک تتراسایکلین و سیپروفلوکساسین به ترتیب 40 و 95 درصد بوده است. نتایج نشان داد که راندمان حذف آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین بیش از دو برابر تتراسایکلین بود. **استنتاج:** فرآیند آنزیمی HRP آزاد در حضور آب اکسیژنه را می توان به عنوان یک فرآیند موثر برای حذف آنتی بیوتیک های تتراسایکلین و سیپروفلوکساسین 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 در نظر گرفته شده اند و برای

E-mail: fa.gholami@mazums.ac.ir

مؤلف مسئول: فتح اله غلامی بروجنی - ساری: دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دانشکده بهداشت

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

فرایند برای حذف آنتی‌بیوتیک‌ها مورد مطالعه قرار گرفته است. از جمله روش‌های متداول (فرآیندهای بیولوژیکی، فیلتراسیون، کواگولاسیون، فرآیندهای غشایی، جذب و فرآیند اکسیداسیون پیشرفته و استفاده از نانو کامپوزیت‌ها (10) می‌باشد، که فرآیند اکسیداسیون پیشرفته نیاز به افزودن کاتالیزور و اکسیدان‌های 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 از محققان 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 در صنایع شیمیایی، زیست محیطی، دارویی و بیوتکنولوژی کاربرد دارند (13). پراکسیدازها از بسیاری از گونه‌های گیاهان، حیوانات و میکروارگانیسم‌ها جدا شده‌اند (14). مزایای تصفیه آنزیمی ویژگی بستر گسترده است و غیرفعال‌سازی قابل توجه آنزیم ممکن است در مرحله پلیمریزاسیون نیز رخ دهد. رادیکال‌های آزاد تولید شده 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 بیش تری برای درک پارامترهای فرآیند مانند pH، H_2O_2 ، رنگ و غلظت آنزیم در طی فرآیند تخریب رنگ با استفاده از آنزیم انجام شد و

سالانه به‌طور متوسط 100 تا 200 هزار تن آنتی‌بیوتیک در جهان استفاده می‌شود که به دلیل پایداری در محیط، اثرات مخربی بر محیط 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 از طریق 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 معمولاً 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 آبی‌پروری است و در استفاده و تولید جهانی رتبه دوم بین آنتی‌بیوتیک‌ها را دارد (6). حضور آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین در فاضلاب در غلظت‌های 0/11 - 1560 میکروگرم در لیتر گزارش شده است (7). وجود تتراسایکلین و سایر آنتی‌بیوتیک‌ها در محیط‌های 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 در سراسر جهان در داروهای انسانی و همچنین برای حیوانات به منظور کنترل عفونت‌های میکروبی مورد استفاده قرار می‌گیرد (4). سیپروفلوکساسین یک آنتی‌بیوتیک شیمی درمانی است که به گروه فلوئورکینولون‌های دارویی تعلق دارد. سیپروفلوکساسین در غلظت‌های بین 0/7-1245/5 میکروگرم در لیتر در پساب بیمارستان گزارش شده است (9). برای جلوگیری از آلودگی ماتریس‌های محیطی، چندین

استوک تتراسایکلین و سیپروفلوکساسین با گرید آزمایشگاهی 99 درصد (1000 میلی گرم برلیتر) تهیه شد و در دمای 4 درجه سلسیوس تا زمان استفاده نگهداری گردید.

روش انجام آزمایشات

جهت انجام مطالعه محلول‌ها با غلظت‌های مورد نظر با استفاده از محلول استوک تهیه شد. به منظور تعیین متغیرهای مستقل غلظت پراکسید هیدروژن (1، 2، 3، 4 و 5 میلی گرم در لیتر)، همچنین پراکسید هیدروژن 30 درصد مورد استفاده قرار گرفت، غلظت آنزیم (0/1، 0/3، 0/5، یونیست در لیتر)، غلظت اولیه آنتی بیوتیک تتراسایکلین و سیپروفلوکساسین (10 mg/l، 20، 30، 40، 50)، زمان تماس (0 تا 60 دقیقه)، pH (4، 7، 10) در نظر گرفته شد و برای تنظیم pH از اسید کلریدریک و سودیک نرمال استفاده گردید. تمامی مطالعات درمقیاس آزمایشگاهی و در دمای آزمایشگاه صورت گرفت.

اندازه گیری غلظت آنتی بیوتیک باقی‌مانده

غلظت آنتی بیوتیک‌ها با استفاده از HPLC مجهز به یک ستون فاز معکوس (C-18، 5 درصد میکرومتر، 250×4/6 میلی‌متر) اندازه‌گیری شد. سرعت جریان 4 میلی‌لیتر در دقیقه و حجم 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 فاز متحرک سیپروفلوکساسین استونیتریل 0/01 مولار و بافر فسفات (8:92) و طول موج 220 نانومتر بود. پیش از سنجش باقی‌مانده آنتی بیوتیک منحنی کالیبراسیون دستگاه با استفاده از غلظت‌های تتراسایکلین و سیپروفلوکساسین مورد آزمایش ترسیم شد. که این منحنی‌ها در نمودارهای شماره 1 و 2 نشان داده شده است.

آنزیم تثبیت شده عملکرد پایین تری 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 داد که تجزیه رنگ Lanset blue 2R 94 درصد و برای تجزیه پساب‌های نساجی 52 درصد بود (15). Tatsumi و همکاران از فرآیند HRP 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 آنزیم HRP و آب اکسیژنه جهت حذف آلکیل بنزیل سولفونات خطی (LAS) از محیط‌های آبی استفاده نمودند و بر اساس نتایج مطالعه آن‌ها راندمان حذف درجنت آنیونی بیش از 98 درصد بعد از 60 دقیقه زمان تماس بود (20). هدف از انجام مطالعه حاضر، بررسی کارایی آنزیم HRP در حذف آنتی بیوتیک‌های تتراسایکلین و سیپروفلوکساسین از فاضلاب سنتتیک است.

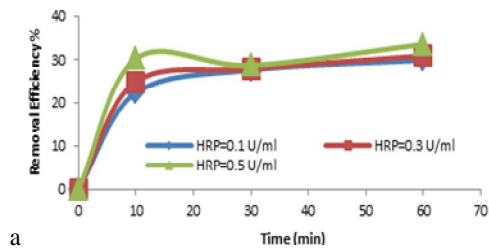
مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع تجربی - کاربردی بود که به صورت ناپیوسته در مقیاس آزمایشگاهی بر روی غلظت‌های مختلفی از محلول سنتتیک حاوی آنتی بیوتیک تتراسایکلین و سیپروفلوکساسین انجام گرفت.

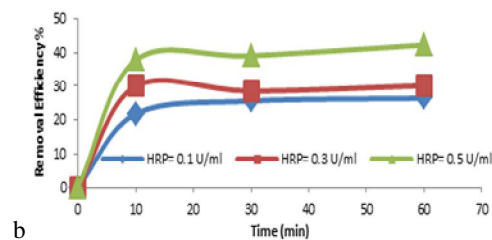
مشخصات مواد مورد استفاده

آنتی بیوتیک تتراسایکلین، سیپروفلوکساسین، متانول، تری فلورواستیک اسید، KH_2PO_4 مورد نیاز و سایر مواد شیمیایی مورد استفاده در این پژوهش از شرکت Sigma-Aldrich خریداری شد. محلول

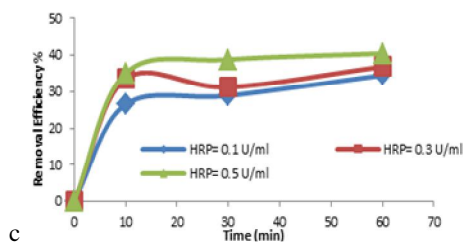
سطوح فاکتورها در نمودارهای های شماره 8-3 آورده شده است.



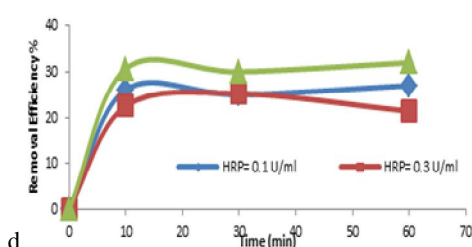
a



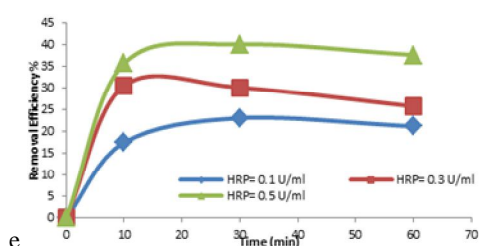
b



c

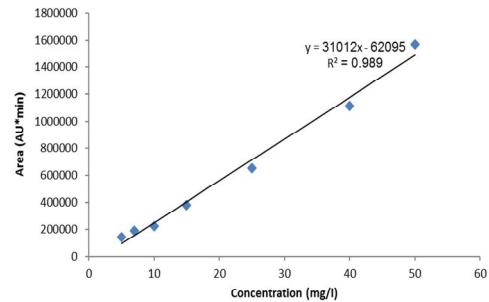


d

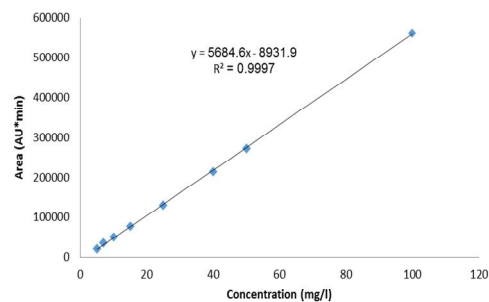


e

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 ، H₂O₂=3 mg/l :c ، H₂O₂=2 mg/l :b ، H₂O₂=1 mg/l :a ، H₂O₂=5 mg/l :e ، H₂O₂=4 mg/l :d



نمودار شماره 1: منحنی کالیبراسیون دستگاه HPLC مورد استفاده در سنجش تتراسایکلین



نمودار شماره 2: منحنی کالیبراسیون دستگاه HPLC مورد استفاده در سنجش سیپروفلوکساسین

محاسبه راندمان حذف آنتی بیوتیک ها

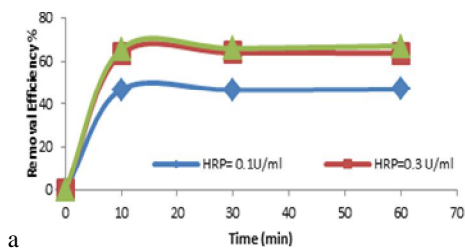
پس از انجام فرایند اکسیداسیون آنزیمی، غلظت ثانویه آنتی بیوتیک ها آنالیز شد و راندمان حذف با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$Efficiency(\%) = \frac{C_{out} - C_{in}}{C_{out}} \times 100$$

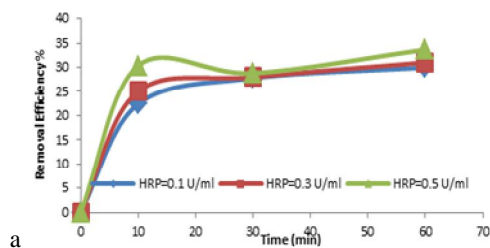
که در این معادله C_{in} غلظت آنتی بیوتیک اولیه و C_{out} غلظت آنتی بیوتیک ثانویه می باشد.

یافته ها

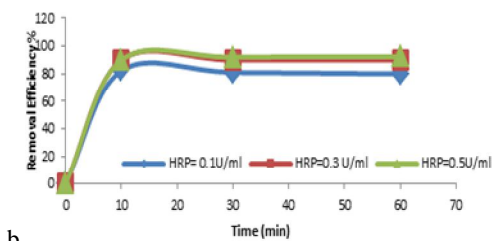
به منظور تعیین سطح بهینه زمان تماس، غلظت آلاینده، غلظت آنزیم، غلظت آب اکسیژنه و pH فرایند آنزیمی با استفاده از روش آزمایش یک فاکتور مستقل برای هر کدام از آنتی بیوتیک های مورد مطالعه، با ثابت نگه داشتن هر کدام از متغیرها، سطح بهینه فرایند آنزیمی، حذف آنتی بیوتیک ها به دست آمد. نتایج هر کدام از



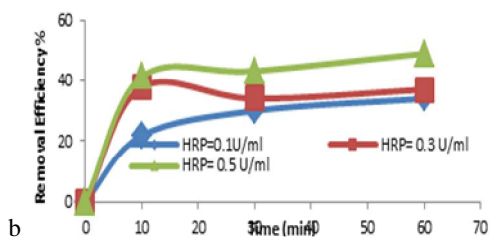
a



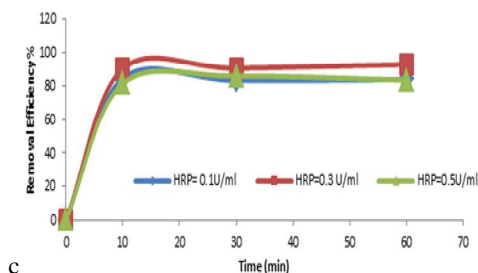
a



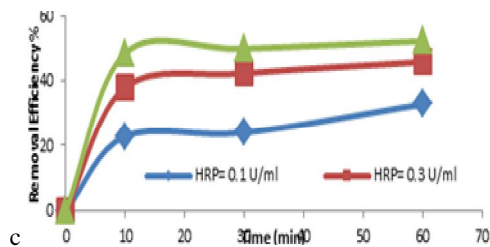
b



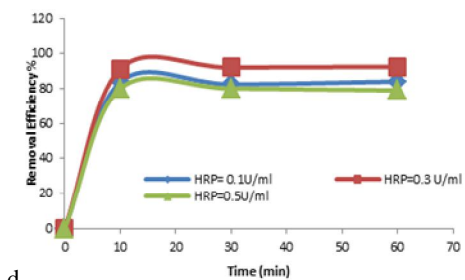
b



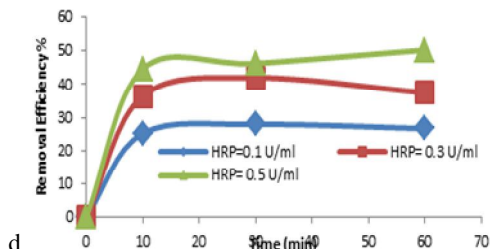
c



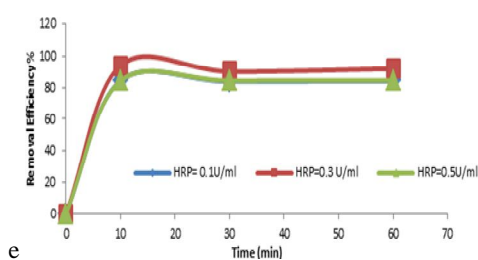
c



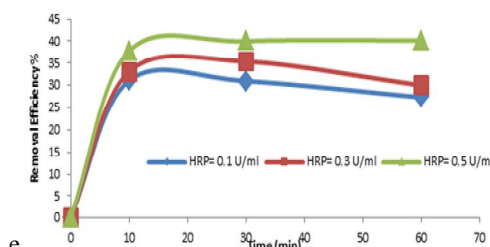
d



d



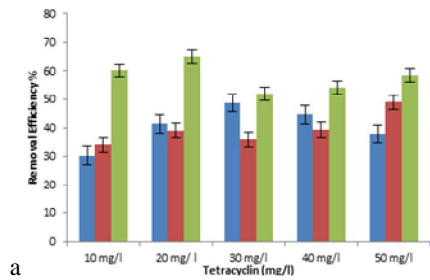
e



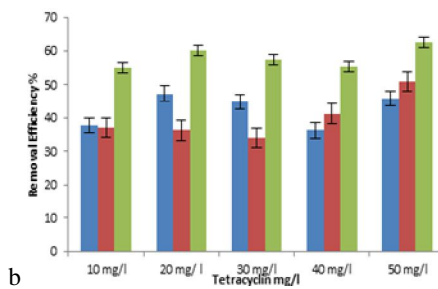
e

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

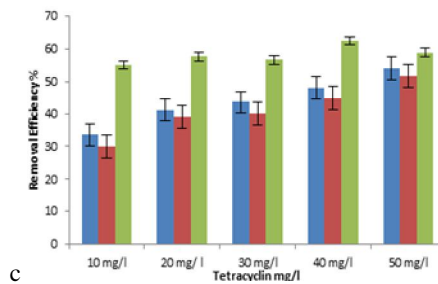
نمودار شماره 5: اثر زمان تماس، غلظت آب اکسیژنه و غلظت آنزیم بر راندمان حذف سیپروفلوکساسین در غلظت اولیه 10 mg/l و pH=7
 (H₂O₂=1 mg/l :a) ، H₂O₂=2 mg/l :b ، H₂O₂=3 mg/l :c
 (H₂O₂=4 mg/l :d) ، H₂O₂=5 mg/l :e



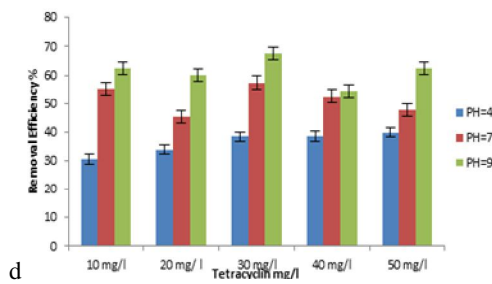
a



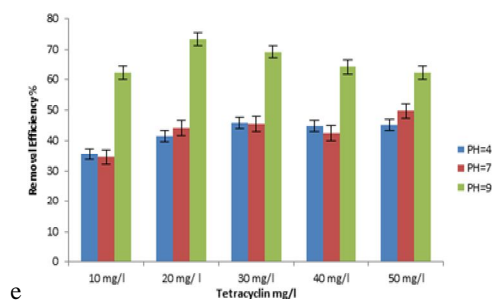
b



c

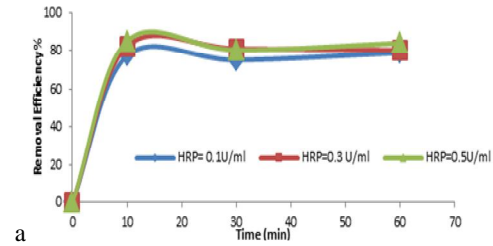


d

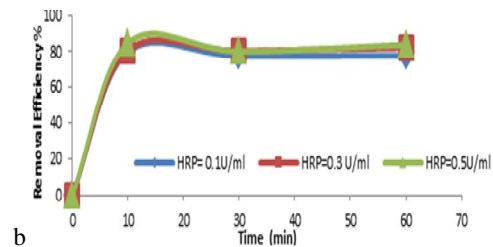


e

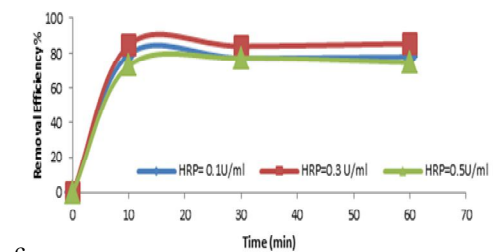
نمودار شماره 6: اثر غلظت سیروفلوکساسین و آنزیم بر راندمان حذف سیروفلوکساسین در غلظت ثابت اولیه آب اکسیژنه 1 mg/l و pH=7 (a: Cipro=10 mg/l, b: Cipro=20 mg/l, c: Cipro=30 mg/l, d: Cipro=40 mg/l, e: Cipro=50 mg/l).
 نمودار شماره 7: تاثیر همزمان متغیرهای pH و غلظت آنتی بیوتیک بر فرایند آنزیمی حذف تتراسایکلین در زمان تماس 10 دقیقه و غلظت آنزیم 0/5 U/ml (a: H₂O₂=1 mg/l, b: H₂O₂=2 mg/l, c: H₂O₂=3 mg/l, d: H₂O₂=4 mg/l, e: H₂O₂=5 mg/l)



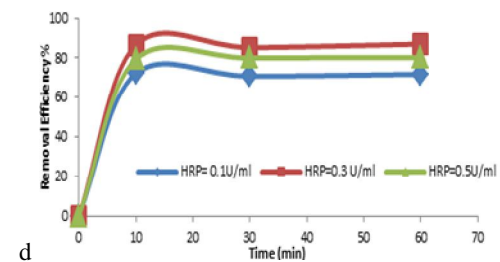
a



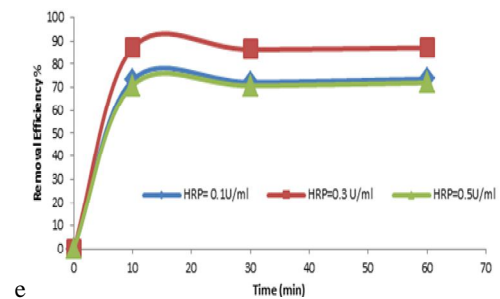
b



c



d



e

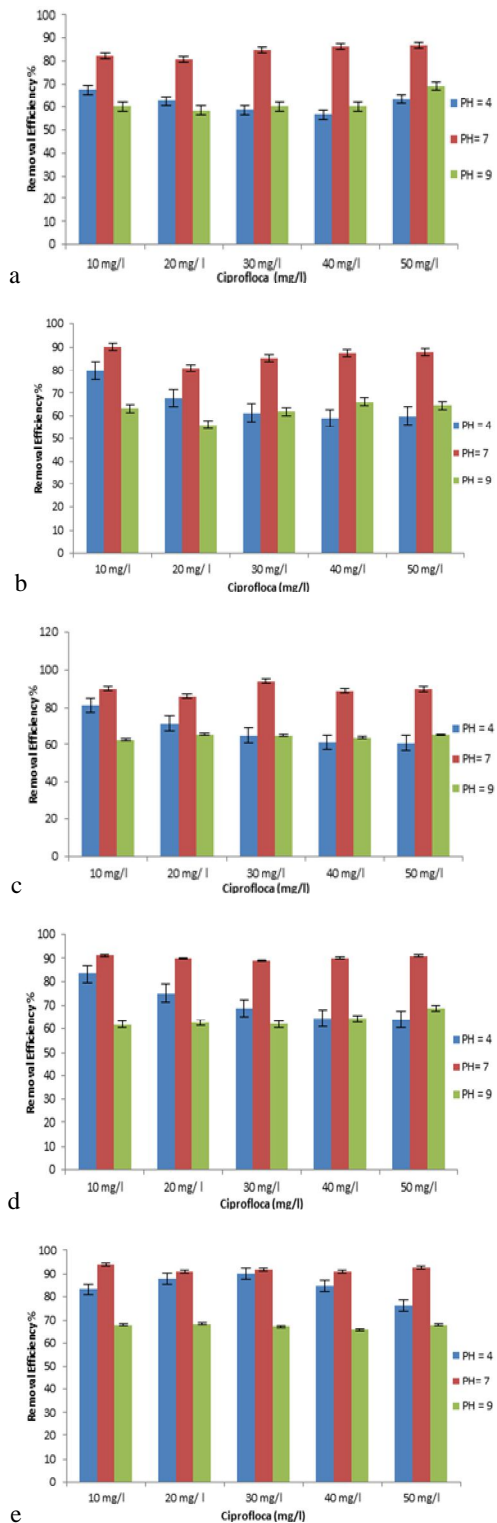
نمودار شماره 6: اثر غلظت سیروفلوکساسین و آنزیم بر راندمان حذف سیروفلوکساسین در غلظت ثابت اولیه آب اکسیژنه 1 mg/l و pH=7 (a: Cipro=10 mg/l, b: Cipro=20 mg/l, c: Cipro=30 mg/l, d: Cipro=40 mg/l, e: Cipro=50 mg/l).

به منظور بررسی تاثیر غلظت آنزیم، غلظت های مختلف در گستره (0/1، 0/3، 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 در زمان تماس 10 دقیقه به بیش ترین مقدار می رسد و پس از آن با افزایش زمان تماس اختلاف معنی داری در حذف دیده نمی شود. به منظور بررسی تاثیر آب اکسیژنه در غلظت مختلف (1، 2، 3، 4 و 5 mg/l) مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج نشان داد که افزایش غلظت آب اکسیژنه باعث افزایش راندمان حذف آنتی بیوتیک تتراسایکلین شده است و نسبت بهینه آنزیم به آب اکسیژنه برابر 0/1 به دست آمد.

در این مرحله آزمایش غلظت های متغیر تتراسایکلین (10، 20، 30، 40، 50 mg/l) و آنزیم با ثابت نگه داشتن آب اکسیژنه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آزمایشات (نمودار شماره 4) نشان داد غلظت 10mg/l آنتی بیوتیک تتراسایکلین حداکثر کارایی حذف در مدت زمان 10 دقیقه برابر با 40 درصد را داشته است. با افزایش غلظت آنزیم و تتراسایکلین به دلیل ثابت بودن آب اکسیژنه، راندمان حذف بعد از 10 دقیقه ابتدایی واکنش، تغییر معنی داری نداشته است.

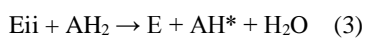
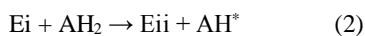
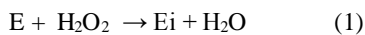
به منظور بررسی تاثیر غلظت آنزیم، غلظت های مختلف در گستره (0/1، 0/3، 0/5 U/ml) استفاده شد. نتایج در نمودار شماره 5 آورده شده است. آزمایش بر روی غلظت سیپروفلوکساسین 10 mg/l در pH=7 انجام شد و نتایج به دست آمده نشان داد که راندمان حذف سیپروفلوکساسین در زمان تماس 10 دقیقه به بیش ترین مقدار می رسد و پس از آن با افزایش زمان تماس اختلاف معنی داری در حذف دیده نمی شود.

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



نمودار شماره 8: تاثیر همزمان متغیرهای pH، H₂O₂ و غلظت آنتی بیوتیک بر فرایند آنزیمی حذف سیپروفلوکساسین در زمان تماس 10 دقیقه و غلظت 0/3 U/ml آنزیم HRP (a: H₂O₂=1 mg/l، H₂O₂=2؛ b: H₂O₂=3 mg/l، H₂O₂=4؛ c: H₂O₂=5 mg/l؛ d: H₂O₂=3 mg/l؛ e: H₂O₂=4 mg/l)

می دهند که پراکسیدازها متعاقب فعال شدن با پراکسید هیدروژن می توانند بسیاری از مواد آروماتیک را اکسید کنند. این آنزیم ها واکنش های زیادی را کاتالیز می کنند 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 می کند. مکانیزم فعالیت آنزیم پراکسیداز به شکل زیر می باشد (18):



در این فرمول ها: E: آنزیم، E_i: ترکیب میانی 1، E_{ii}: ترکیب میانی 2، AH₂: ترکیب حلقوی، AH⁰: رادیکال آزاد است.

آنزیم با استفاده از آب اکسیژنه اکسید شده و به فرم ترکیب میانی فعال 1 (E_i) تبدیل می شود. این ترکیب نیز یک مولکول از ترکیب حلقوی را روی سایت فعال خود دریافت می کند و پس از واکنش، ترکیب حلقوی اکسید شده و یک رادیکال آزاد تولید می شود 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 برمی گردد و چرخه فعالیت آنزیم دوباره تکرار می گردد. در طی واکنش، حذف آنتی بیوتیک تتراسایکلین و سیپروفلوکساسین در شرایط بهینه در 10 دقیقه اول ایجاد شد و در بعد از آن تغییرات معنی داری مشاهده نمی شد و ثابت بود که می تواند 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 آنتی بیوتیک تتراسایکلین برابر 4 و آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین برابر 7 بوده است.

نتایج نشان داد نسبت بهینه HRP/H₂O₂=0/5 بیشترین راندمان را در حذف آلاینده ها دارد. در یک

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.

در این 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 حداکثر کارایی حذف در مدت زمان 10 دقیقه برابر با 95 درصد را داشته است.

در فرآیند آنزیمی، pH می تواند در حذف آلاینده ها تاثیر گذار باشد، میزان حذف در pH قلیایی بیشترین بود. به منظور بررسی تاثیر pH در راندمان حذف غلظت های مختلف آنتی بیوتیک تتراسایکلین، آزمایش در pH=9 (غلظت 0.5U/ml آنزیم HRP و زمان تماس 10 دقیقه، غلظت آنتی بیوتیک 20 mg/l H₂O₂= 5 mg/l) درصد حذف 70 درصد بدست آمد (نمودار شماره 7).

در فرآیند آنزیمی pH می تواند در حذف آلاینده ها تاثیر گذار باشد نتایج مطالعه نشان داد میزان حذف در pH خنثی بیشترین مقدار بوده است (نمودار شماره 8). نتایج آزمایش نشان داد در pH:7 (غلظت 0.3U/ml آنزیم HRP و زمان تماس 10 دقیقه، غلظت آنتی بیوتیک 10 mg/l، 5 mg/l H₂O₂) حذف 95 درصد 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 آنتی بیوتیک، pH، غلظت آب اکسیژنه، غلظت بهینه آنزیم مورد بررسی قرار گرفت. آنزیم HRP در بسیاری از مطالعات برای تبدیل بسیاری از ترکیبات سمی صنعتی، مانند فنل، آتیلین (17)، رنگ آزو (18) روغن (16)، سولفونامید (15)، آلکیل بنزیل سولفونات خطی (19) مورد مطالعه قرار گرفته است. مطالعات نشان

نتایج این مطالعه نشان داد، غلظت اولیه آنتی بیوتیک‌ها در نهایت پس از 10 دقیقه تماس تاثیر معنی داری 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 معنی دار 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 آنتی سیروفلوکساسین از فاضلاب مورد استفاده قرار گیرد. در این شرایط بازده حذف آنتی بیوتیک تتراسایکلین از فاضلاب سنتتیک 40 درصد و برای آنتی بیوتیک سیروفلوکساسین بیش از 95 درصد بود. شرایط بهینه زمان ماند 10 دقیقه و pH آنتی بیوتیک تتراسایکلین برابر 9 و سیروفلوکساسین برابر 7، غلظت آب اکسیژنه 5 میلی گرم در لیتر در دمای محیط به دست آمد. نتایج نشان داد که کارایی آنزیم آزاد در حذف آنتی بیوتیک سیروفلوکساسین بیش تر از آنتی بیوتیک 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 می‌نمایند.

References

1. Shokoochi 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.

مطالعه تاثیر pH بر فعالیت لاکاز آزاد و تثبیت شده در محدوده 8.5 - 2.5 pH بررسی شد و نتایج نشان داد حداکثر فعالیت آنزیم لاکاز آزاد در pH= 5.5 موفقیت آمیز بود و شرایط بیش از حد اسید (pH<3.5) و بیش از حدقلایی (pH>7.5) هر دو برای فعالیت لاکاز آزاد و تثبیت شده مناسب نبودند (20). بررسی‌ها نشان می‌دهد pH بر فعالیت آنزیم لاکاز تاثیر می‌گذارد 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 0/5 - 13 میلی گرم بر لیتر تحت همان فعالیت آنزیم و غلظت پراکسید هیدروژن افزایش یافته است (21).

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

- 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 Engineering* 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, et al. 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, Nejatizadeh F, Mahvi A. Oxidative degradation and detoxification of textile azo dye by horseradish peroxidase enzyme. *Fresenius Environmental Bulletin* 2013; 22(3): 739-744.

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, Nejat-zadeh F, Jamalán 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, Nasserí 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, Nejat-zadeh 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.