

Biodegradation of 17 α -ethynylestradiol using an Isolated Mixed Culture from Activated Sludge of a Pharmacy Wastewater Treatment Unit

Mahsa Sedighi*

Energy and Environment Research Center, Niroo Research Institute, Tehran, Iran, msedighi@nri.ac.ir

Simin Nasserri

Center of Water Quality Research, Institute for Environmental Research, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran, nasserisim1123@gmail.com

Abstract

Introduction: Synthetic estrogen, 17 α -ethynylestradiol (EE2), has adverse effects on aqueous environments even at the lowest concentrations. Identification of microorganisms with high degradation capability has always been expected. Biodegradation processes may involve the action of different microorganisms and microbial consortia, during which, either pollutants are consumed for growth or transformed due to co-metabolism. In this study, an enrichment culture of activated sludge from the pharmacy wastewater treatment unit was used for the degradation of EE2 as the sole source of carbon and energy.

Materials and methods: For obtaining the strains with the capability of EE2 degradation, the sludge samples were used as the seed and the enrichment culture was performed using mineral salt medium (MSM) with EE2 as the sole carbon source. To evaluate the EE2 degradability of the mixed culture, EE2 was added to the cultures at initial concentrations of 0-4 mg L⁻¹. The degradation rate of EE2 (using HPLC method) and the biomass concentration (using the spectrophotometry method) were monitored during the biodegradation process and the kinetic results were also investigated.

Results: Two colonies were obtained from the enrichment culture solution of the activated sludge. The obtained mixed culture was able to degrade EE2 at different initial concentrations. Considering the probability of the presence of multi-enzymes systems in the mixed culture which exhibit the property of cooperativity, the allosteric sigmoidal model was matched with the experimental data. The concentration of biomass increased along with EE2 biodegradation. The biological growth kinetics of the microbial consortia followed the Monod model.

Discussion and conclusion: In this study, a mixed culture capable of degrading EE2 as the sole carbon and energy source was isolated from the activated sludge of the pharmacy wastewater treatment unit. EE2 was used as a growth substrate due to the increase in the cell population.

Key words: 17 α -ethynylestradiol, Biodegradation, Activated Sludge, Microbial Consortia, Kinetic Modelling.

* Corresponding author

فصلنامه علمی - پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال هشتم، شماره ۳۰، تابستان ۱۳۹۸، صفحه: ۹۲-۸۱
تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۲/۱۴ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۷/۲۰

تجزیه زیستی استروژن مصنوعی ۱۷ آلفا- اتینیل استرادیول با استفاده از مخلوط میکروبی جداسازی شده از لجن فعال واحد تصفیه پساب داروسازی

مهسا صدیقی*: استادیار گروه پژوهشی محیط‌زیست، پژوهشکده انرژی و محیط‌زیست، پژوهشگاه نیرو، تهران، ایران، msedighi@nri.ac.ir
سیمین ناصری: استاد مرکز تحقیقات کیفیت آب، پژوهشکده محیط‌زیست، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران، nasserisim1123@gmail.com

چکیده

مقدمه: استروژن مصنوعی ۱۷ آلفا- اتینیل استرادیول (EE2) حتی در غلظت‌های بسیار کم نیز آثار نامطلوبی بر محیط‌های آبی دارد و همواره شناسایی موجودات دارای توانایی تخریب این ترکیب اهمیت داشته است. تخریب زیستی شامل فعالیت انواع ریزموجودات و مخلوط‌های میکروبی است که طی آن، آلاینده برای رشد ریزموجود استفاده می‌شود و یا طی فرایند متابولیسم همراه دستخوش تغییر می‌شود. در مطالعه حاضر، مخلوط میکروبی جداسازی شده از لجن فعال واحد تصفیه پساب داروسازی برای تخریب زیستی EE2 به عنوان تنها منبع کربن- انرژی استفاده و مطالعه شد.

مواد و روش‌ها: آزمایش‌های مربوط به تطبیق و غنی‌سازی ریزموجودات در محیط حاوی نمک‌های معدنی شامل EE2 و لجن رقیق شده انجام شدند تا سویه‌هایی دارای توانایی استفاده از EE2 جداسازی شوند. توانایی مخلوط میکروبی جداسازی شده در تخریب EE2 با افزودن آن در غلظت‌های متفاوت (صفر تا ۴ میلی گرم بر لیتر) بررسی شد. پس از بررسی روند رشد مخلوط میکروبی (به روش اسپکتروفتومتری) و روند تخریب EE2 (به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی زیاد)، سینتیک رشد و تخریب با استفاده از مدل‌های متداول ارزیابی شد.

نتایج: مخلوط میکروبی جداسازی شده حاوی دو سویه باکتریایی بود. مخلوط میکروبی توانایی تخریب مؤثر EE2 در غلظت‌های اولیه مختلف را داشت. سینتیک تخریب زیستی EE2 با توجه به حضور چند سیستم آنزیمی از مدل آلوستریک- سیگموئیدال تبعیت کرد. تخریب زیستی EE2 با رشد توده زیستی همراه بود. سینتیک رشد زیستی مخلوط میکروبی از مدل مونود تبعیت کرد.

بحث و نتیجه‌گیری: مخلوط میکروبی جداسازی شده قادر به تخریب زیستی غلظت‌های اولیه مختلفی از EE2 بود. EE2 به عنوان سوسترای حامی رشد توسط مخلوط باکتریایی استفاده شد؛ زیرا تخریب آن به افزایش جمعیت سلولی منجر شد.

واژه‌های کلیدی: ۱۷ آلفا- اتینیل استرادیول، تخریب زیستی، لجن فعال، مخلوط میکروبی، مدل‌سازی سینتیکی

* نویسنده مسئول مکاتبات

Copyright©2019, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

اگرچه تأثیرات زیست محیطی مواد شیمیایی فعال از نظر هورمونی - ترکیبات مختل‌کننده غدد درون‌ریز^۱ - به طور کامل شناخته نشده است، همواره آثار نامطلوب آنها بر موجودات آبی و اکوسیستم‌های حساس امکان‌پذیر است. طول عمر این ترکیبات در محیط‌های آبی تعیین‌کننده شدت آثار آنها روی منابع آب آشامیدنی و خطرهای بالقوه آنهاست. تأثیر این مواد نه تنها از حضور آنها در محیط ناشی می‌شود، به فعالیت زیستی محصولات جانبی حاصل از تخریب آنها نیز مربوط است. نکته درخور توجه اینست که باوجود تمام مشکلات ناشی از حضور این ترکیبات در محیط، بیشتر مردم از اهمیت این موضوع آگاهی ندارند. معمولاً داروهای استفاده‌نشده و منقضی به جای بازگشت به داروخانه‌ها، از طریق زباله‌ها، سرویس‌های بهداشتی و سینک ظرف‌شویی دفع می‌شوند؛ از این رو، تعداد مطالعه‌های علمی روی آثار زیست‌محیطی مواد دارویی و متابولیت‌های آنها رو به افزایش است. مطالعه‌های انجام‌شده عمدتاً روی تأثیر این مواد بر محیط‌های آبی (مرتبط با آب آشامیدنی) تمرکز دارند و بیشتر آنها به کشورهای ایتالیا، اسپانیا، سوئد، سوئیس، هلند، انگلیس، آمریکا، چین، کانادا و آلمان مربوط می‌شوند (۱).

داروهای تجویزی و غیرتجویزی، مواد دافع حشرات، شوینده‌ها، مواد پلاستیکی، مواد اطفاء حریق، آنتی‌بیوتیک‌های انسانی و دامی، مواد دفع آفت‌ها، هورمون‌ها و حلال‌ها متداول‌ترین ترکیبات مختل‌کننده غدد درون‌ریز در جریان‌های آبی‌اند. استروژن‌های طبیعی شامل استرون (E1)، ۱۷-آلفا-استرادیول (E2 α)، ۱۷-بتا-

استرادیول (E2 β) و استریول (E3)، هورمون‌های جنسی‌اند که منشأ انسانی یا حیوانی دارند؛ علاوه‌براین، برخی استروژن‌های مصنوعی نظیر ۱۷-آلفا-اتینیل استرادیول (EE2) برای اهداف ضدبارداری به کار می‌روند. این ترکیبات در غلظت نانوگرم‌درلیتر سبب اختلال عملکرد غدد درون‌ریز در موجودات زنده می‌شوند. از آنجا که گستره وسیعی از مواد شیمیایی مختل‌کننده غدد درون‌ریز در محیط‌زیست حضور دارند، ارزیابی تأثیر هورمون‌ها بر انسان‌ها دشوار است؛ باوجوداین، سیر افزایش سرطان‌های بیضه و پستان و روند کاهش تعداد و کیفیت اسپرم‌ها می‌تواند نتیجه تأثیر استروژن‌ها به‌تنهایی یا در تلفیق با سایر ترکیبات مختل‌کننده غدد درون‌ریز باشد (۱ و ۲).

EE2 ترکیبی مقاوم به تجزیه زیستی است که به میزان درخور توجهی در قرص‌های ضدبارداری استفاده می‌شود. از آنجا که این هورمون حتی در غلظت‌های بسیار کم نیز سبب اختلال در عملکرد غدد درون‌ریز می‌شود، برای موجودات آبی نظیر انواع ماهی‌ها سمی است و آثار نامطلوب درازمدتی بر محیط‌های آبی دارد (۳ و ۴). ترکیب EE2 نسبت به تخریب زیستی در موجودات زنده مقاوم است؛ این ویژگی در زمان دارودرمانی بسیار مفید است، ولی ورود این هورمون به محیط را از طریق پساب تسهیل می‌کند؛ از این رو، توجه به فرایندهای تصفیه بهینه به منظور کاهش استروژن مصنوعی همواره مدنظر بوده است (۵).

روش‌های فیزیکی - شیمیایی متعددی شامل جداسازی غشایی، اکسیداسیون پیشرفته و جذب کربنی برای حذف و کاهش ترکیبات مختل‌کننده غدد درون‌ریز استفاده

استروژن مصنوعی ۱۷ آلفا- اتینیل استرادیول به عنوان تنها منبع کربن- انرژی استفاده شد؛ علاوه بر این، سینتیک واکنش های رشد و تخریب زیستی مطالعه و ارزیابی شد.

مواد و روش ها

لجن فعال و مواد مورد استفاده: نمونه های لجن فعال برای جداسازی گونه های میکروبی توانمند در تخریب زیستی EE2 از واحد تصفیه پساب شرکت داروسازی ابوریحان تهیه شدند؛ بهتر است نمونه های لجن ۲۴ ساعت پیش از آغاز آزمایش ها تهیه شوند. EE2 با خلوص مناسب برای انجام آزمایش ها از شرکت سیگما (Sigma-E4876) خریداری شد. مواد لازم برای تهیه محیط مناسب جداسازی سویه های میکروبی مدنظر و محیط مغذی مناسب برای انجام واکنش های مربوط به تخریب زیستی EE2 توسط سویه های جداسازی شده نیز خلوص زیادی (در سطح آنالیتیک) داشتند و عمدتاً از شرکت مرک تهیه شدند. مواد لازم برای تهیه محیط کشت جداسازی سویه های میکروبی توانمند در تخریب EE2 شامل ۳ گرم عصاره مخمر، ۳ گرم عصاره مالت، ۵ گرم پپتون و ۱۰ گرم دکستروز در هر لیتر است (محیط کشت YM) (۱۳). مواد لازم برای تهیه محیط مغذی مناسب به منظور تخریب زیستی EE2 در جدول ۱ آورده شده است (محیط حاوی نمک های معدنی).

به مواد یادشده، مقدار ۱ میلی لیتر trace elements شامل ترکیبات زیر اضافه شد:

۲ گرم $\text{MnSO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ، NaHCO_3 ، ۰/۳ گرم
 ۰/۲ گرم $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، ۰/۰۲ گرم
 ۰/۱ گرم $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_7$ ، ۰/۵ گرم $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

شده اند (۶)؛ هر چند کاربرد این روش ها با توجه به مشکلاتی مانند هزینه های اضافی، مصرف انرژی و مواد شیمیایی و جریان های دفعی غلیظ محدود است و روش های زیستی برای چنین ترکیباتی مناسب ترند (۷). با توجه به فعالیت زیستی زیاد، حضور فراگیر، سمیت و مقاوم بودن این ترکیبات، ارزیابی موجودات دارای توانایی کاهش یا تخریب آنها در محیط بسیار اهمیت دارد. فرایندهای تخریب زیستی شامل فعالیت قارچ ها، جلبک ها و به ویژه باکتری ها و مخلوط های میکروبی است که طی آن، آلاینده ها برای رشد ریزموجودات استفاده می شوند یا طی فرایند متابولیسم همراه^۲، دستخوش تغییر می شوند (۳، ۸-۱۰). مطالعه های انجام شده درباره تخریب زیستی هورمون های استروژنیک نشان می دهند EE2 با استفاده از کشت های میکروبی مخلوط حذف می شود (۱۱)؛ همچنین جداسازی سویه های خالص باکتریایی دارای توانایی تخریب EE2 نظیر گونه های اسفینگوموناس^۳، رودوکوکوس^۴، پروتئوباکتیریا^۵، اکتینوباکتیریا^۶، باکترئوایدتر^۷ و نیتروسوموناس^۸ گزارش شده است (۱۲-۱۵).

در مطالعه های اندکی به سینتیک تخریب زیستی استروژن ها پرداخته شده است (۱۶ و ۱۷). مدل های مختلفی شامل مدل های درجه یک، درجه صفر، لاجستیک، مونود و لگاریتمی برای بیان رفتار سینتیکی تخریب کاتالیستی آلاینده به کمک ریزموجودات یا آنزیم ها استفاده شده اند (۱۸ و ۱۹).

در مطالعه حاضر، مخلوط میکروبی جداسازی شده از لجن فعال واحد تصفیه پساب کارخانه داروسازی ابوریحان (شامل دو سویه باکتریایی) برای تخریب زیستی

نمک‌های معدنی به ارلن‌ها اضافه شد. به منظور تهیهٔ لجن رقیق شده از سرم فیزیولوژیک استفاده شد؛ به این ترتیب که ابتدا ۱۰ میلی‌لیتر لجن در ۹۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژیک ریخته و به مدت ۳۰ دقیقه هم زده شد؛ سپس از مایع رویی برای تلقیح استفاده شد.

آزمایش‌ها به شکل سه‌تایی در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد و با سرعت چرخش ۱۵۰ دور در دقیقه انجام شدند. نمونه‌ها به مدت دو هفته گرمخانه‌گذاری شدند و پس از دو هفته، نمونه‌گذاری مشابهی انجام شد؛ با این تفاوت که در این مرحله، تلقیح با استفاده از نمونه‌های تطبیق یافته انجام شد. این روند تا ۱۰ بار تکرار شد تا ریز موجوداتی جداسازی شدند که توانایی استفاده از EE2 به‌عنوان تنها منبع کربن را داشتند (مخلوط میکروبی) (۱۷). به منظور اطمینان یافتن از توانمندی مخلوط میکروبی جداسازی شده در تخریب EE2، ارلن‌های دارای کدورت بیشتر انتخاب شدند و از آنها روی محیط حاوی EE2 به‌عنوان تنها منبع کربن کشت داده شد. آزمایش‌های شاهد نیز به موازات آزمایش‌های اصلی و بدون افزودن EE2 به محیط انجام شدند. عدم رشد میکروبی و مشاهدهٔ کدورت در نمونه‌های شاهد بیان‌کنندهٔ جداسازی سویه‌هایی بود که قابلیت رشد بر EE2 و تخریب زیستی این هورمون را دارند.

خالص‌سازی سویه‌های میکروبی توانمند در تخریب

زیستی EE2 به‌عنوان تنها منبع کربن: پس از جداسازی مخلوط میکروبی توانمند در تخریب زیستی EE2، از مخلوط میکروبی به‌دست آمده پلیت تهیه شد. از نمونهٔ پلیت ناخالص حاوی باکتری، سری رقت متوالی تا 10^{-2} به روش Spreading Plate روی محیط کشت نوترینت آگار

گرم $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ و $0/5$ گرم $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ ، $0/05$ گرم $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ در هر لیتر. گفتنی است اسیدیتهٔ محیط یادشده در حدود ۷ تنظیم شد و محیط پیش از انتقال لجن یا گونه‌های میکروبی جداسازی شده به مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو با دمای ۱۲۰ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفت و استریل شد.

جدول ۱- مواد موجود در محیط مغذی مناسب برای تخریب زیستی

EE2 (۱۳)

| ماده شیمیایی | مقدار (گرم بر لیتر) |
|----------------------|---------------------|
| KH_2PO_4 | ۱/۵ |
| K_2HPO_4 | ۳/۵ |
| $(NH_4)_2SO_4$ | ۰/۵ |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | ۰/۱۵ |
| NaCl | ۰/۵ |
| عصارهٔ مخمر | ۰/۰۵ |
| آگار (جهت کشت جامد) | ۱۵ |

جداسازی سویه‌های میکروبی توانمند در تخریب

زیستی EE2 به‌عنوان تنها منبع کربن: آزمایش‌های مربوط به تطبیق و غنی‌سازی ریز موجودات در ارلن‌های استریل شده با حجم ۲۵۰ میلی‌لیتر انجام شدند. هر ارلن با ۹۰ میلی‌لیتر محیط حاوی نمک‌های معدنی شامل ۵ میلی‌گرم بر لیتر EE2 به‌عنوان تنها منبع کربن و ۱۰ میلی‌لیتر لجن رقیق شده به‌عنوان مایهٔ تلقیح پر و در شیکراکوباتور قرار داده شد. به منظور افزودن EE2 به محیط حاوی نمک‌های معدنی، ابتدا محلول استاندارد EE2 از EE2 در متانول تهیه و سپس حجم مشخصی از محلول استاندارد (باتوجه به غلظت مدنظر) در ارلن‌ها ریخته شد و پس از تبخیر متانول در جریان هوای آرام، محیط حاوی

بررسی تخریب زیستی EE2 توسط مخلوط میکروبی جداسازی شده و مطالعه های سینتیکی: آزمایش های مربوط به بررسی توانایی سویه های جداسازی شده به شکل کشت مخلوط در استفاده و تخریب زیستی EE2 به عنوان تنها منبع کربن با افزودن غلظت های متفاوت (صفر تا ۴ میلی گرم برلیتر) EE2 به مخلوط میکروبی جداسازی شده انجام شدند. غلظت توده زیستی اولیه در تمام آزمایش ها یکسان بود و تخریب زیستی EE2 با نمونه گیری طی فرایند تخریب و سنجش غلظت EE2 بررسی شد؛ علاوه بر سنجش غلظت EE2، غلظت توده زیستی نیز طی فرایند تخریب بررسی و سنجیده شد. در این فاز، پس از بررسی روند رشد کشت میکروبی و روند تخریب EE2، سینتیک رشد و تخریب با استفاده از مدل های متداول بررسی شد و شاخص های سینتیکی (که با استفاده از نرم افزار گرافدپریزم ۵ محاسبه شدند) ارزیابی شدند (۱۰ و ۱۳).

تخریب کاتالیتیک (آنزیمی) ترکیبی خاص با استفاده از سلول های میکروبی به عنوان کاتالیست از مدل های سینتیکی تبعیت می کند. مدل های گوناگونی شامل مدل های درجه یک، درجه صفر، لاجستیک، مونود و لگاریتمی برای بیان سینتیک تخریب زیستی (در سیستم های همراه با رشد یا بدون رشد) استفاده می شوند. اگرچه مدل های شبه سینتیکی پتانسیل زیادی برای پیش بینی رفتار سینتیکی واکنش تخریب زیستی دارند، این مدل ها عمومی نیستند و تنها برای موارد خاص کاربرد دارند؛ در نتیجه، توانایی آنها برای مقایسه نتایج به دست آمده با نتایج مشابه محدود است. استفاده از مدل های عمومی نظیر مدل مونود یا هلدین، امکان

(NA) انجام شد. پس از خالص سازی جدایه ها، نمونه مدنظر حاوی دو سویه متفاوت باکتریایی بود. از آنجا که ویژگی های کلنی و ریخت شناسی سلول ها به شرایط و محیط کشت بستگی دارند، به منظور مقایسه ویژگی های کلنی و لام گرم سویه ها با یکدیگر از محیط کشت NA (جدول ۲) و گرماگذاری در شرایط مشابه استفاده شد. گسترشی از کشت جامد باکتری ها در محیط NA روی لام میکروسکوپی تهیه و به روش Hucker رنگ آمیزی گرم شد. مشاهده لام با عدسی چشمی ۱۰۰ میکروسکوپ نوری انجام و برای بررسی واکنش گرم سویه ها از آزمون هیدروکسیدپتاسیم ۳ درصد استفاده شد؛ همچنین با استفاده از خلال چوب استریل، کلنی باکتری از کشت تازه آن روی محیط جامد به لام منتقل و فعالیت کاتالازی آن با افزودن هیدروژن پراکسید ۳ درصد ارزیابی شد.

جدول ۲- ترکیب محیط کشت NA

| مقدار (گرم برلیتر) | ماده شیمیایی |
|--------------------|--------------|
| ۲ | عصاره مخمر |
| ۵ | پپتون |
| ۱ | عصاره گوشت |
| ۵ | NaCl |
| ۱۵ | آگار |

تک کلنی های به دست آمده روی محیط حاوی EE2 کشت شدند. آزمایش های شاهد نیز به موازات آزمایش های اصلی و بدون افزودن EE2 به محیط انجام شدند و کلنی هایی که کدورتی در نمونه های شاهد آنها مشاهده نشد، سویه های خالص توانمند در تخریب زیستی EE2 انتخاب شدند.

مربوط به بررسی توانایی مخلوط میکروبی جداسازی شده (حاوی دو سویه باکتریایی) در استفاده و تخریب زیستی EE2 به‌عنوان تنها منبع کربن با افزودن غلظت‌های متفاوت (صفر تا ۴ میلی‌گرم بر لیتر) EE2 انجام شد. غلظت توده زیستی اولیه در تمام آزمایش‌ها یکسان بود (OD اولیه = ۰/۰۳) و تخریب زیستی EE2 با نمونه‌گیری طی فرایند تخریب و سنجش غلظت EE2 بررسی شد؛ علاوه بر سنجش غلظت EE2، غلظت توده زیستی طی فرایند تخریب بررسی و سنجیده شد.

نتایج تخریب زیستی EE2 در غلظت‌های مختلف با استفاده از کشت مخلوط (حاوی دو سویه باکتریایی) در شکل ۲ نشان داده شده است. آزمایش‌های شاهد نیز به موازات آزمایش‌های اصلی و بدون افزودن توده زیستی یا با توده زیستی استریل شده انجام شدند تا امکان حذف شیمیایی یا جذب زیستی مشخص شود. در شرایط مورد مطالعه، هیچ‌گونه تغییر در خور توجهی در غلظت EE2 در نمونه‌های شاهد مشاهده نشد.

مدل سازی سینتیکی تخریب زیستی EE2 با استفاده از مخلوط میکروبی جداسازی شده: در پژوهش حاضر به‌منظور به‌دست آوردن نرخ تخریب ویژه^{۱۲} (SDR) و بیان سینتیک تخریب در قالب یک مدل، تغییرات غلظت EE2 طی فرایند تخریب بررسی و سنجش شد؛ با تقسیم سرعت تخریب به غلظت توده زیستی اولیه، نرخ تخریب ویژه به دست آمد و با توجه به روند تغییرات منحنی نرخ تخریب ویژه، مدل منطبق بر داده‌های به‌دست آمده و شاخص‌های سینتیکی مرتبط با آن مشخص شدند. نرخ تخریب ویژه برای غلظت‌های اولیه مختلفی از EE2 با استفاده از کشت مخلوط (حاوی دو سویه باکتریایی) در شکل ۳ نشان داده شده است.

مقایسه رفتارهای سینتیکی متفاوت را فراهم می‌کند (۲۰). سینتیک تخریب استروژن‌ها در مطالعه‌های اندکی بررسی شده است (۱۶ و ۱۷). در مطالعه حاضر، از مدل مونود برای بررسی رشد مخلوط میکروبی و با توجه به حضور چند سیستم آنزیمی در مورد کشت مخلوط، از مدل آلوستریک-سیگموئیدال برای بررسی تخریب زیستی EE2 استفاده شد.

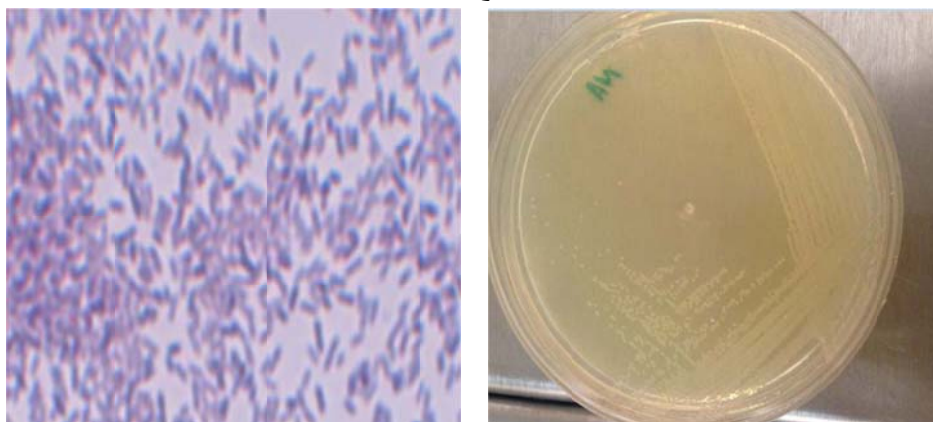
روش‌های سنجش: به‌منظور سنجش غلظت EE2، هر بار ۱ میلی‌لیتر نمونه گرفته شد و پس از عبور از فیلتر ۰/۲ میکرومتر، ۲۰ میکرولیتر از آن به دستگاه HPLC^{۱۱} تزریق شد. شرایط دستگاه به شرح زیر بود: ستون C18، شناساگر UV (جذب در ۲۱۰ نانومتر)، فاز حامل شامل آب و استونیتریل با نسبت ثابت ۴۰/۶۰ و فلوی ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه (۲۱). به‌منظور سنجش غلظت توده زیستی از روش کدورت‌سنجی و تعیین دانسیته نوری^{۱۱} (OD) استفاده شد. دانسیته نوری نمونه‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

نتایج

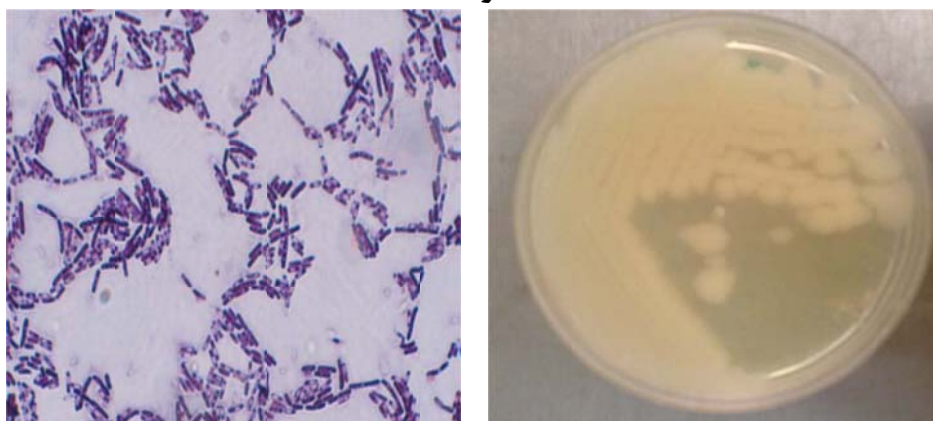
جداسازی و خالص‌سازی سویه‌های میکروبی توانمند در تخریب زیستی EE2 به‌عنوان تنها منبع کربن: همان‌طور که در بخش مواد و روش‌ها گفته شد، پس از خالص‌سازی جدایه‌ها، نمونه مدنظر حاوی دو سویه متفاوت باکتریایی بود. نتایج واکنش گرم سویه‌ها نشان دادند سویه ۱، گرم منفی و سویه ۲، گرم مثبت است. شکل ۱، عکس میکروسکوپی و ماکروسکوپی هر یک از سویه‌ها را نشان می‌دهد.

بررسی توانایی مخلوط میکروبی جداسازی شده در استفاده از EE2 به‌عنوان تنها منبع کربن: آزمایش‌های

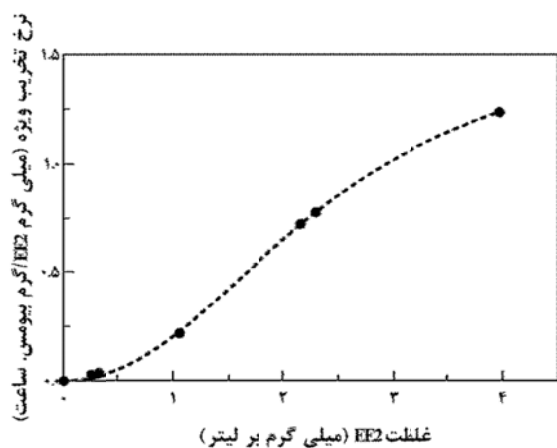
سویه ۱



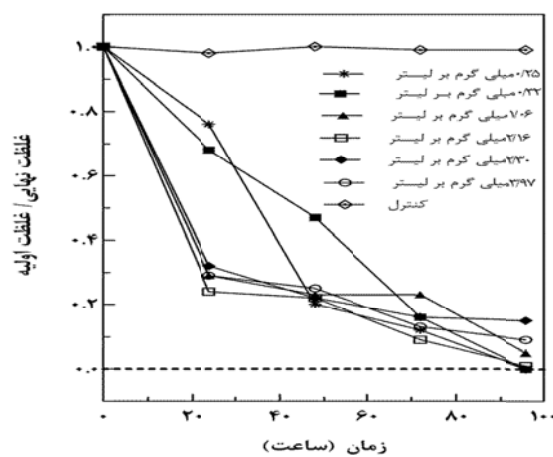
سویه ۲



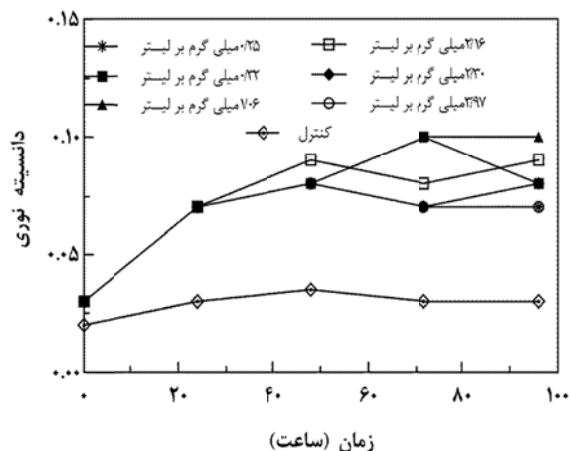
شکل ۱- عکس میکروسکوپی و ماکروسکوپی هریک از سویه‌ها



شکل ۳- تغییرات نرخ تخریب ویژه با غلظت اولیه EE2 با استفاده از کشت مخلوط

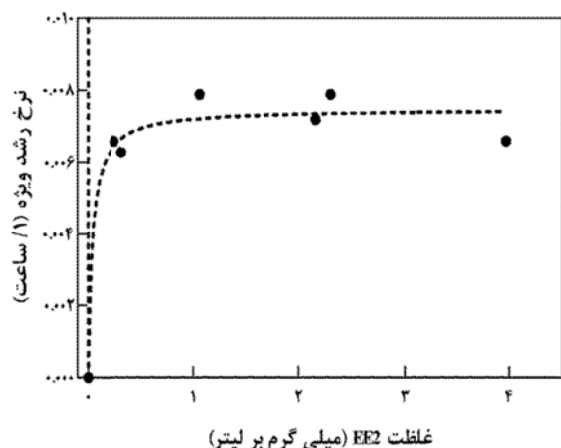


شکل ۲- تأثیر غلظت‌های مختلف EE2 بر بازده حذف پس از ۹۶ ساعت با استفاده از کشت مخلوط



شکل ۴- تغییرات زمانی دانسیته نوری در غلظت‌های مختلف EE2 با استفاده از کشت مخلوط

در هر غلظتی از EE2، نرخ رشد ویژه محاسبه شد و سپس با توجه به روند تغییرات منحنی نرخ رشد ویژه، مدل سینتیکی منطبق بر داده‌ها و شاخص‌های مرتبط با آن به دست آمد و تفسیر و ارزیابی شد. نرخ رشد ویژه برای غلظت‌های اولیه مختلفی از EE2 با استفاده از کشت مخلوط در شکل ۵ نشان داده شده است.



شکل ۵- تغییرات نرخ رشد ویژه با غلظت اولیه EE2 با استفاده از کشت مخلوط

در زمینه کشت مخلوط، با توجه به حضور چند سیستم آنزیمی و روند تغییرات منحنی نرخ تخریب ویژه، مدل آلوستریک-سیگموئیدال که در قالب رابطه ۱ بیان می‌شود، بر داده‌های به دست آمده تطبیق یافت.

$$\text{رابطه ۱} \quad SDR = \frac{q_m S^h}{K_s + S^h}$$

در رابطه ۱، S غلظت آلاینده (میلی گرم بر لیتر)، q_m بیشترین نرخ تخریب ویژه (میلی گرم بر گرم بر ساعت)، K_s ثابت نصف سرعت (میلی گرم بر لیتر) و h شیب منحنی است. تطبیق داده‌های تجربی با مدل آلوستریک-سیگموئیدال دقت خوبی دارد؛ زیرا مقدار R^2 برای کشت مخلوط برابر با ۰/۹۹ به دست آمده است. شاخص‌های مدل به شرح زیر محاسبه شدند:

$$q_m = 1/668$$

$$K_s = 7/282$$

$$h = 2/207$$

شکل نهایی مدل برای تخریب زیستی EE2 توسط

کشت مخلوط به شکل زیر بیان می‌شود:

$$\text{رابطه ۲} \quad \frac{dS}{dt} = -SDRX = -\frac{q_m S^h X}{K_s + S^h} = \frac{1.668 S^h X}{7.282 + S^h}$$

در این رابطه، X بیان‌کننده غلظت توده زیستی (گرم بر لیتر) است.

مدل سازی سینتیکی رشد زیستی مخلوط میکروبی جداسازی شده توانمند در تخریب زیستی EE2 به عنوان تنها منبع کربن: تخریب زیستی EE2 با رشد و افزایش وزن توده زیستی همراه بود. شکل ۴، رشد میکروبی را در غلظت‌های اولیه مختلفی از EE2 نشان می‌دهد.

بحث و نتیجه‌گیری

مخلوط‌های میکروبی که عمدتاً از واحدهای تصفیه پساب یا منابع مشابه به دست می‌آیند، بسیار در تخریب زیستی آلاینده‌های گوناگون استفاده شده‌اند. با توجه به مقاومت استروژن‌های طبیعی و مصنوعی به ویژه EE2 نسبت به تبدیل میکروبی، همواره شناسایی دقیق ریزموجودات توانمند در تبدیل این ترکیب و تعیین مسیرهای متابولیکی منجر به کاهش فعالیت استروژنی، ضروری و مدنظر بوده است. در پژوهش حاضر، مخلوط میکروبی جداسازی شده از نمونه لجن فعال با قابلیت تخریب زیستی EE2 به عنوان تنها منبع کربن حاوی دو سویه متفاوت باکتریایی بود. در مطالعه‌های متعددی از مخلوط‌های میکروبی برای حذف و تبدیل زیستی EE2 استفاده شده است. مولر^{۱۳} و همکاران تخریب زیستی EE2، E1 و EE2 را با استفاده از مخلوط باکتریایی به دست آمده از لجن فعال بررسی کردند (۱۷). بررسی‌ها با استفاده از هورمون‌ها به عنوان تنها منبع کربن و با استفاده از استونیتریل به عنوان منبع کربن اضافی انجام شدند. در تخریب زیستی EE2 به عنوان تنها منبع کربن، زمان وقفه و زمان لازم برای حذف کامل هورمون کمتر از کشت‌های حاوی منبع کربن اضافی گزارش شد. همچنین زمانی که از EE2 به عنوان تنها منبع کربن استفاده شد، نرخ تخریب ویژه آن ۲۰ برابر بیشتر بود. یی^{۱۴} و همکاران از لجن فعال نیترا ته برای تخریب زیستی EE2 استفاده کردند (۲۲)؛ به این منظور، دو نمونه لجن گرفته شده از راکتور غشایی و لجن حاصل از راکتورهای ناپیوسته متوالی بررسی شدند و نتایج نشان دادند در غلظت‌های کمتر از ۴۸ میلی‌گرم برلیتر آمونیوم، سازوکار جذب زیستی دارای اهمیت بیشتری است، اما در

منحنی نرخ رشد ویژه را می‌توان به دو قسمت تقسیم کرد: در غلظت‌های کم EE2، نرخ رشد ویژه با افزایش غلظت زیاد می‌شود (معادله درجه یک)؛ ولی زمانی که غلظت EE2 از حد مشخصی (۰/۵۶ میلی‌گرم برلیتر) بیشتر می‌شود، نرخ رشد ویژه تقریباً ثابت می‌ماند (معادله درجه صفر). با توجه به روند تغییرات منحنی نرخ رشد ویژه، مدل مونود که در قالب رابطه ۳ بیان می‌شود، بر داده‌های به دست آمده تطبیق یافت.

$$\mu = \frac{\ln\left(\frac{X_2}{X_1}\right)}{(t_2 - t_1)} = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S} \quad \text{رابطه ۳}$$

در این رابطه، S غلظت آلاینده (میلی‌گرم برلیتر)، μ_{\max} بیشترین نرخ رشد ویژه (بر ساعت)، K_s ثابت نصف سرعت (میلی‌گرم برلیتر)، X_1 وزن خشک سلولی در ابتدای فاز رشد نمایی (t_1) و X_2 وزن خشک سلولی در انتهای فاز رشد نمایی (t_2) است. تطبیق داده‌های تجربی با مدل مونود دقت خوبی دارد؛ زیرا مقدار R^2 برابر با ۰/۹۶ به دست آمده است. شاخص‌های مدل به شرح زیر محاسبه شدند:

$$\mu_{\max} = 0.0075$$

$$K_s = 0.040$$

شکل نهایی مدل مونود برای رشد سلولی سیستم

زیستی مورد استفاده به شکل زیر بیان می‌شود:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X = \frac{\mu_{\max} SX}{K_s + S} = \frac{0.0075SX}{0.040 + S} \quad \text{رابطه ۴}$$

در این رابطه، X بیان‌کننده غلظت توده زیستی (گرم برلیتر) است.

در زمینه کشت مخلوط به دست آمده (شکل ۳)، باتوجه به حضور چند سیستم آنزیمی و روند تغییرات منحنی نرخ تخریب ویژه، مدل آلوستریک-سیگموئیدال بر داده‌های حاصل تطبیق یافت. مدل‌های گوناگونی برای بیان سینتیک تخریب زیستی آلاینده‌ها استفاده شده‌اند که بیشتر آنها مانند مدل‌های شبه‌درجه یک یا دو که توانایی زیادی در پیش‌بینی رفتار سینتیکی در فرایند تخریب زیستی دارند، مدل‌های شبه‌سینتیکی^{۱۵} هستند؛ هرچند این مدل‌ها عمومیت ندارند و تنها برای موارد خاص به کار می‌روند و این مسئله سبب می‌شود مقایسه نتایج این مدل‌ها با دیگر داده‌های سینتیکی با محدودیت روبه‌رو شود. استفاده از مدل‌های سینتیکی عمومی نظیر مونود یا هلدین، امکان مقایسه رفتارهای سینتیکی متفاوت را فراهم می‌کند.

به‌منظور بررسی بهتر عملکرد سیستم میکروبی مورد استفاده در تخریب زیستی EE2، شاخص‌های سینتیکی حاصل از تطبیق داده‌های مربوط به سرعت تخریب ویژه EE2 بر مدل‌های سینتیکی ارزیابی شدند. نسبت $\frac{q_m}{K_s}$ بیان‌کننده ثابت سرعت درجه یک در غلظت‌های کم EE2 است؛ این نسبت برای کشت مخلوط (حاوی دو سویه باکتریایی) ۰/۲۳ است. زیلز^{۱۶} و همکاران در بررسی تخریب زیستی EE2 با استفاده از لجن فعال سیستم تصفیه پساب، سینتیک تخریب زیستی EE2 در یک بیوراکتور آزمایشگاهی را با استفاده از مدل شبه‌درجه یک ارزیابی کردند. آنها ثابت سرعت درجه یک برای تخریب زیستی EE2 در بازه دمایی ۱۸ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد را ۰/۲۱ تا ۰/۷۸ (لیتر بر گرم بر ساعت) گزارش کردند (۲۴). استرادا و میجایلو^{۱۷} نیز در پژوهشی

غلظت‌های بیش از ۴۸ میلی‌گرم بر لیتر، تخریب زیستی اهمیت دارد.

نتایج تخریب زیستی غلظت‌های مختلف (صفر تا ۴ میلی‌گرم بر لیتر) EE2 با استفاده از کشت مخلوط (حاوی دو سویه باکتریایی) در شکل ۲ ارائه شدند. نتایج نشان می‌دهند در هر غلظت، بازده حذف با گذشت زمان افزایش می‌یابد، حذف کامل EE2 در غلظت‌های کمتر از ۲ میلی‌گرم بر لیتر حاصل می‌شود و با افزایش غلظت اولیه EE2، بازده حذف کاهش می‌یابد.

کاهش بازده حذف در غلظت‌های اولیه زیاد (بیشتر از ۲ میلی‌گرم بر لیتر) می‌تواند به بازدارندگی آلاینده و اشباع شدن باکتری (از نظر ظرفیت حذف) مربوط باشد. در غلظت‌های اولیه کم، باکتری با سوبسترا اشباع نشده است، ولی افزایش تدریجی غلظت تأثیر بیشتری روی مدت زمان انجام واکنش دارد تا روی بیشترین بازده حذف؛ به‌همین علت، EE2 در غلظت‌های کمتر از ۲ میلی‌گرم بر لیتر به‌طور کامل تخریب می‌شود. با افزایش غلظت اولیه EE2، اشباع شدن باکتری با سوبسترا سبب کاهش بازده حذف می‌شود و زمان بیشتری برای رسیدن به بازده‌های مشابه غلظت‌های کمتر از ۲ میلی‌گرم بر لیتر لازم است.

در مخلوط‌های میکروبی ممکن است بازده حذف زیستی به علت وجود ظرفیت‌های متابولیکی متعدد و آثار مکمل گونه‌های درگیر افزایش یابد؛ هرچند سازوکارهای مورد استفاده گونه‌های تخریب‌کننده بسیار پیچیده است و در برخی موارد، یک گونه میکروبی می‌تواند درگیر حذف متابولیت‌های سمی تولیدشده توسط گونه‌های دیگر شود که این امر متعاقباً مانع فعالیت میکروبی مناسب در کل مخلوط میکروبی می‌شود (۲۳).

مصنوعی EE2 بررسی شد. EE2 در غلظت‌های اولیه مختلف توسط کشت مخلوط به‌دست آمده تخریب شد. اطلاعات سینتیکی حاصل از تخریب زیستی EE2 توسط کشت مخلوط به‌دست آمده با مدل آلوستریک-سیگموئیدال مطابقت یافت. EE2 به‌عنوان سوبسترای حامی رشد توسط مخلوط باکتریایی استفاده شد؛ زیرا تخریب زیستی آن به افزایش جمعیت سلولی منجر شد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوریان کشور (INSF) برای حمایت مالی از پروژه حاضر تشکر و قدردانی می‌کنند.

References

- (1) Caliman FA., Gavrilesu M. Pharmaceuticals, personal care products and endocrine disrupting agents in the environment- A review. *Clean* 2009; 37(4): 277-303.
- (2) Combalbert S., Hernandez-Raquet G. Occurance, fate and biodegradation of estrogens in sewage and manure. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2010; 86(6): 1671-1692.
- (3) Clouzot L., Marrot B., Doumenq P., Roche N. 17 α -ethinylestradiol: An endocrine disrupter of great concern. Analytical methods and removal processes applied to water purification. A review. *Environmental Progress* 2008; 27(3): 383-396.
- (4) Zaharin Aris A., Soraya Shamsuddin A., Mangala Praveena S. Occurrence of 17 α -ethinylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: a review. *Environment International* 2014; 69(1): 104-119.

که روی تخریب زیستی هورمون‌های استروژنیک E1، E2 و EE2 با استفاده از لجن فعال بیوراکتور غشایی انجام دادند، از مدل مونود برای بیان سینتیک تخریب زیستی هورمون‌های مدنظر استفاده کردند. آنها ثابت سرعت تخریب زیستی EE2 را ۰/۵۱ (لیتر بر گرم بر ساعت) گزارش کردند (۲۵). چنانچه مشاهده می‌شود نتایج پژوهش‌های انجام‌شده و نتایج پژوهش حاضر در محدوده مشابهی قرار دارند.

به‌منظور آگاهی از این امر که مخلوط میکروبی، EE2 را به‌عنوان سوبسترای حامی رشد استفاده می‌کند، غلظت توده زیستی طی تخریب زیستی اندازه‌گیری شد و نتایج گویای افزایش درخور توجه توده زیستی بودند (شکل ۴). بررسی رشد باکتریایی طی تخریب هورمون‌های استروژنیک در مطالعه‌های متعددی مدنظر قرار گرفته است. مولر و همکاران از کشت مخلوط باکتریایی جداشده از لجن فعال برای تخریب E1، E2 و EE2 استفاده کردند (۱۷) و هیچ افزایشی در میزان توده زیستی مشاهده نکردند. پاول^{۱۸} و همکاران در تخریب E1 و EE2 توسط گونه‌ای از آسنیتوباکتر^{۱۹}، افزایش درخور توجه غلظت مولکول‌های ATP را مشاهده کردند (۲۰). غلظت مولکول‌های ATP پس از ۱۱۲ ساعت همراه با کاهش غلظت‌های E1 و EE2 کاهش یافت. در مطالعه حاضر، مخلوط میکروبی مورد استفاده توانست EE2 را به‌عنوان سوبسترای حامی رشد استفاده کند؛ زیرا رشدی در نمونه‌های شاهد بدون منبع کربن مشاهده نشد.

در مطالعه حاضر، مخلوط میکروبی (حاوی دو سویه باکتریایی) به‌دست آمده از لجن فعال واحد تصفیه پساب کارخانه داروسازی برای تخریب زیستی استروژن

- (5) Rozalska S., Bernat P., Michniki P., Dlugonski J. Fungal transformation of 17 α -ethinylestradiol in the presence of various concentrations of sodium chloride. *International Biodeterioration and Biodegradation* 2015; 103(1): 77-84.
- (6) Liu Z., Kango Y., Mizutani S. Removal mechanisms for endocrine disrupting compounds (EDCs) in wastewater treatment-physical means, biodegradation, and chemical advanced oxidation: A review. *Science of the Total Environment* 2009; 407(2): 731-748.
- (7) He H., Huang B., Fu G., Xiong D., Xu Z., Wu X., Pan X. Electrochemically modified dissolved organic matter accelerates the combining photodegradation and biodegradation of 17 α -ethinylestradiol in natural aquatic environment. *Water Research* 2018; 137: 251-261.
- (8) Cajthaml T., Kresinova Z., Svobodova K., Sigler K., Rezanka T. Microbial transformation of synthetic estrogen 17 α -ethinylestradiol. *Environmental Pollution* 2009; 157(12): 3325-3335.
- (9) Sedighi M., Zamir SM., Vahabzadeh F. Cometabolic degradation of ethylmarcaptan by phenol-utilizing *Ralstonia eutropha* in suspended growth and gas-recycling trickle-bed reactor. *Journal of Environmental Management* 2016; 165(1): 53-61.
- (10) Amani F., Safari Sinangani AA., Ebrahimi F., Nazarian S. Biodegradation of chlorpyrifos and diazinon organophosphates by two bacteria isolated from contaminated agricultural soils. *Biological Journal of Microorganism* 2019; 7(28): 27-39.
- (11) Weber S., Leuschner P., Kampfer P., Dott W., Hollender J. Degradation of estradiol and ethinylestradiol by activated sludge and by a defined mixed culture. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2005; 67(1): 106-120.
- (12) Vader JS., Ginkel CG., Sperling F. MGM., Jong J., Boer W., Graaf JS., Most M., Stokman PGW. Degradation of ethinylestradiol by nitrifying activated sludge. *Chemosphere* 2000; 41(8): 1239-1243.
- (13) Yoshimoto T., Nagai F., Fujimoto J., Watanabe K., Mizukoshi H., Makino T., Kimura K., Saino H., Sawada H., Omura H. Degradation of estrogens by *Rhodococcus zopfii* and *Rhodococcus equi* isolates from activated sludge in wastewater treatment plants. *Applied and Environmental Microbiology* 2004; 70(9): 5283-5289.
- (14) Roh H., Chu-KH A. 17 β -estradiol utilizing bacterium, *Sphingomonas* strain KC8: part I- characterization and abundance in wastewater treatment plants. *Environmental Science and Technology* 2010; 44(13): 4943-4950.
- (15) Yu Y., Huang Q., Cui J., Zhang K., Tang C., Peng X. Determination of pharmaceuticals, steroid hormones, and endocrine-disrupting personal care products in sewage sludge by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical Bioanalytical Chemistry* 2011; 399(2): 891-902.
- (16) Li F., Yuasa A., Obara A., Mathews AP. Aerobic batch degradation of 17 β -estradiol (E2) by activated sludge: Effects of spiking E2 concentrations, MLVSS and Temperatures. *Water Research* 2005; 39(10): 2065-2075.
- (17) Muller M., Patureau D., Godon JJ., Delgenes JP., Hernandez-Raquet, G. Molecular and kinetic characterization of mixed cultures degrading natural and synthetic estrogens. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2010; 85(3): 691-701.
- (18) Okpokwasili GC., Nweke CO. Microbial growth and substrate utilization kinetics. *African Journal of Biotechnology* 2005; 5(4): 305-317.
- (19) Simkins S., Alexander M. Models for

- mineralization kinetics with the variables of substrate concentration and population density. *Applied and Environmental Microbiology* 1984; 47(6): 1299-1306.
- (20) Sedighi M., Vahabzadeh F., Zamir SM., Naderifar A. Ethanethiol degradation by *Ralstonia eutropha*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 2013; 18(4): 827-833.
- (21) Pauwels B., Wille K., Noppe H., Brabander HD., Van de Wiele T., Verstraete W., Boon N. 17 α -ethinylestradiol cometabolism by bacteria degrading estrone, 17 β -estradiol and estriol. *Biodegradation* 2008; 19(5): 683-693.
- (22) Yi TW., Harper WF., Holbrook RD., Love NG. Role of particle size and ammonium oxidation in removal of 17 α -ethinylestradiol in bioreactors. *Journal of Environmental Engineering- ASCE* 2006; 132(11): 1527-1529.
- (23) Cerqueira VS., Hollenbach EB., Maboni F., Vainstein MH., Camargo FAO., Peralba MCR., Bento FM. Biodegradation potential of oily sludge by pure and mixed bacterial cultures. *Bioresource Technology* 2011; 102(23): 11003-11010.
- (24) Ziels RM., Lust MJ., Gough HL., Strand SE., Stensel HE. Influence of bioselector processes on 17 α -ethinylestradiol biodegradation in activated sludge wastewater treatment systems. *Environmental Science and Technology* 2014; 48(11): 6160-6167.
- (25) Estrada-Arriaga EB., Mijaylova MPA. comparison of biodegradation kinetic models applied to estrogen removal with nitrifying activated sludge. *Water Science and Technology* 2010; 62(9): 2183-2189.

¹- Endocrine Disrupting Compounds (EDCs)

²- Cometabolism

³- *Sphingomonas*

⁴- *Rhodococcus*

⁵- *Proteobacteria*

⁶- *Actinobacteria*

⁷- *Bacteroidetes*

⁸- *Nitrosomonas*

⁹- GraphPad Prism 5

¹⁰- High Performance Liquid Chromatography

¹¹- Optical Density

¹²- Specific Degradation Rate

¹³- Muller

¹⁴- Yi

¹⁵- pseudo-kinetic

¹⁶- Ziels

¹⁷- Estrada and Mijaylova

¹⁸- Pauwels

¹⁹- *Acinetobacter*