The Quarterly Scientific Journal of Applied Biology
Vol.35, No.2, Sering.72,Summer 2022, p. 126-
Article type: Research paper

فصلنامه علمی زیست‌شناسی کاربردی دانشگاه الزهرا(س)
دوره ۳۵، شماره ۲، پیاپی ۷۲، تابستان ۱۴۰۱، ص۱۳۸-۱۲۶
نوع مقاله: مقاله پژوهشی

تاریخ دریافت: تاریخ پذیرش:
وب سایت نشریه: https://jab.alzahra.ac.ir
10.22051/JAB.2021.34309.1398

جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده اگزالی‌پلاتین از پساب صنایع دارویی و به‌کارگیری آنان به‌منظور حذف دارو با استفاده از جمعیت‌های یک و چندگونه‌ای

سید رضا گراکویی[۱] *خسرو عیسی زاد[۲] حجت اله زمانی[۳] روحان رخشایی[۴] مهدی شهریاری نور[۵]

چکیده

مقدمه: *استفاده از باکتری‌ها، رویکردی نوین در کاهش آلاینده‌های دارویی است. در این مطالعه، باکتری‌های تجزیه‌کننده اگزالی‌پلاتین از پساب دارویی، جداسازی و شناسایی شدند و قابلیت آنان در کاهش دارو در تیمارهای یک و چندگونه‌ای بررسی شد.* ***روش‌ها:*** *جداسازی باکتری‌ها به روش فیلتراسیون غشایی انجام پذیرفت و قابلیت کاهش دارو توسط جمعیت‌های یک و چندگونه‌ای با استفاده از HPLC بررسی گردید.* ***نتایج و بحث:*** *پنج گونه با قابلیت کاهش اگزالی‌پلاتین، شامل Enterobacter agglomerans,Citrobacter youngae, Xenorhabdus spp, Bacillus licheniformis, و Moraxella spp شناسایی شدند. باکتری B. licheniformis با کاهش ۵۲ درصدی و E. agglomerans با کاهش ۲۱ درصدی، به ترتیب بیشترین و کمترین قابلیت حذف دارو را نشان دادند. جمعیت باکتریایی شامل B. licheniformis و Xenorhabdus spp و E. agglomerans با کاهش ۷۹ درصدی بهترین عملکرد را در مقایسه با سایر تیمارها داشتند. این مطالعه نشان‌دهنده قابلیت استفاده از باکتری‌های جداسازی شده از پساب دارویی در کاهش آلاینده‌های دارویی است.*

واژه های کلیدی: تجزیه میکروبی، داروی ضدسرطان، زیست پالایی، کروماتوگرافی با فشار بالا

---

۱. گروه میکروبیولوژی، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران
۲. گروه میکروبیولوژی، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران * نویسنده مسئول: issa_kaam@yahoo.com
۳. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
۴. گروه شیمی، دانشکده علوم دانشگاه گیلان، رشت، ایران
۵. گروه میکروبیولوژی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

مقدمه

وجود ترکیبات شیمیایی در پساب صنایع دارویی همواره به‌عنوان یکی از مهم‌ترین چالش‌های زیست-محیطی در نظر گرفته می‌شود. از سویی، با توجه به تولید روزافزون محصولات دارویی، آزادسازی این ترکیبات در اکوسیستم‌های مختلف به‌عنوان تهدید جدی زیست-محیطی مطرح می‌گردد (Jureczko & Kalka., 2020). همچنین، افزایش روزافزون تعداد موارد ابتلا به سرطان منجر به افزایش تولید و مصرف داروهای ضد سرطانی شده است. به دلیل ویژگی‌های سمیتی داروهای ضدسرطانی، آزادسازی چنین ترکیباتی می‌تواند سبب اثرات نامطلوب کوتاه‌مدت و بلندمدت بر روی یوکاریوت‌ها شود (Cristóvão *et al*., 2020). آزادسازی این داروها در اکوسیستم‌های آبی و خاکی به‌طور عمده از طریق پساب‌های خانگی، بیمارستانی و همچنین پساب صنایع دارویی صورت می‌گیرد. با توجه به اینکه این داروها به‌طور طبیعی دارای عملکرد مهار تکثیر سلولی و القاء مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی (آپوپتوز) هستند، آزادسازی آنان در محیط‌زیست می‌تواند حیات همه موجودات زنده به‌ویژه یوکاریوت‌ها را تهدید نماید (Heath *et al*., 2016; Jureczko & Kalka., 2020).

ترکیبات ضد سرطان حاوی پلاتینیوم شامل سیس پلاتین (cis-diamminedichloroplatinum II) و اگزالی‌پلاتین ([(1R,2R)-1,2-cyclohexanediamine-N,NV]oxalate(2-)-O,OV-platinum) وکربوپلاتین (cis-diammine 1,1-cyclobutanedicarboxylato platinum) به‌طور وسیعی در درمان انواع متعدد سرطان‌ها ازجمله سرطان تخمدان، سرطان روده و سرطان خون تجویز می‌شوند (Konate *et al*., 2011; Ghafuria *et al*., 2018). این گروه از داروها قابلیت انحلال بالایی در آب دارند و این ویژگی منجر به افزایش خطرات زیست‌محیطی ناشی از آلودگی با آنان می‌گردد(Ghafuria *et al*., 2018). در مطالعه‌ای که Fonseca و همکاران در سال ۲۰۱۷ انجام دادند نشان دادند که مقادیر زیادی از داروهای حاوی پلاتینیوم از طریق پساب‌های بیمارستانی، و پسماندهای بیمارستانی وارد اکوسیستم‌های آبی می‌گردد (Fonseca *et al*. 2017). از سویی، با توجه با افزایش تولیدات این داروها، آلودگی‌های محیطی ناشی از پساب‌های دارویی، بیش‌ازپیش جدی به نظر می‌رسد.

اگرچه روش‌های متعدد فیزیکی و شیمیایی برای کاهش ترکیبات آلاینده از پساب در دسترس می‌باشند، وجود معایبی ازجمله هزینه بالا، کارایی پایین، پیچیدگی‌های فنی و همچنین تولید ترکیبات جانبی سمی از عوامل محدودکننده در این زمینه به شمار می‌آیند (Zhang *et al*., 2013). به همین دلیل، استفاده از روش‌های مبتنی بر فرایندهای زیستی در کاهش و حذف ترکیبات سمی از پساب‌ها، به‌عنوان یک رویکرد ساده، ارزان و دوستدار محیط‌زیست، بیش‌ازپیش مورد استقبال و توجه قرار گرفته است. علاوه بر این، با توجه به اینکه داروهای ضد سرطان فرایندهای تکثیر سلول‌های یوکاریوتی را مورد هدف قرار می‌دهند، به نظر می‌رسد که

استفاده از باکتری‌ها، به‌عنوان موجودات پروکاریوت، می‌تواند رویکرد مناسبی در این زمینه باشد (Westman *et al*., 2012; Zamani *et al*., 2018).

مطالعات بسیار محدودی در زمینه کاهش یا حذف داروهای ضد سرطانی توسط میکروارگانیسم‌ها انجام شده است. اگرچه، در این مطالعات قابلیت آینده‌دار استفاده از جمعیت‌های میکروبی در کاهش آلاینده‌های دارویی نشان داده شده است (Zamani *et al*., 2018; Kaya *et al*., 2017; Knopp *et al*., 2016). بر این اساس، مطالعه حاضر به‌منظور جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه‌کننده اگزالی‌پلاتین از پساب صنایع دارویی و همچنین بررسی قابلیت کاهش غلظت داروی اگزالی‌پلاتین از نمونه‌های حاوی دارو با استفاده از جمعیت‌های یک و چندگونه‌ای باکتری‌های جداسازی شده انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها:

جداسازی گونه‌های باکتریایی از پساب دارویی

در این مطالعه سویه‌های باکتریایی از پساب شرکت داروسازی سبحان انکولوژی، به‌عنوان یک از واحدهای تولیدکننده داروی اگزالی‌پلاتین، جداسازی شدند. نمونه‌برداری از مخازن پساب دارویی و در مرحله پیش از تصفیه فیزیکی و شیمیایی انجام پذیرفت. نمونه‌های جداسازی شده بلافاصله به آزمایشگاه انتقال داده شدند.

به‌منظور جداسازی باکتری‌های موجود در پساب دارویی و همچنین افزایش شانس جداسازی بیشتر گونه‌ها، ازجمله گونه‌هایی که فراوانی جمعیتی پایین‌تری دارند، از روش فیلتراسیون غشایی استفاده گردید. در ابتدا نمونه‌های برداشته‌شده از فیلترهایی با قطر منافذ ۰/۴۵میکرومتر عبور داده شدند. سپس فیلترها درون محیط‌های کشت TSB و R2A قرار گرفتند و محیط‌های کشت به مدت ۷۲ ساعت و در دمای ۲۲ و ۳۲ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. در پایان دوران گرماگذاری، باکتری‌های کل موجود در نمونه پساب از طریق کشت چمنی در محیط آگار و پاساژ کلنی‌های تک، جداسازی و خالص‌سازی شدند (Mulamattathil *et al*. 2014).

تعیین غلظت مهاری اگزالی پلاتین

به‌منظور ارزیابی اثر مهاری اگزالی‌پلاتین بر روی سویه‌های باکتریایی جداسازی شده، از روش تعیین حداقل غلظت مهاری (MIC) و در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای استفاده شد. به‌طور خلاصه، در ابتدا یک شیب غلظت از داروی اگزالی‌پلاتین (Sigma-Aldrich) با غلظت‌های ۰/۱۵ تا یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در محیط TSB آماده گردید. سپس سویه‌های باکتریایی جداسازی شده با غلظت

۱/۵×۱۰^۶ cfu/mL به هر لوله تلقیح شدند. بعدازآن پلیت‌ها در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۴ تا ۷۲ ساعت گرماگذاری شدند و رشد باکتری‌ها از طریق کدورت سنجی و با استفاده از دستگاه خوانشگر پلیت (Bio-Rad, USA) مورد ارزیابی قرار گرفت.

غربالگری و شناسایی باکتری تجزیه‌کننده اگزالی‌پلاتین

با توجه به نتایج آزمون MIC، سویه‌های باکتریایی که مقاومت مناسبی در برابر غلظت‌های موردنظر اگزالی‌پلاتین داشتند به‌منظور بررسی قابلیت تجزیه‌کنندگی این دارو مورد غربالگری قرار گرفتند. به این منظور، از محیط‌های حداقل نمکی (MSM) حاوی اگزالی‌پلاتین، به‌عنوان تنها منبع کربن، با غلظت ۰/۷۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استفاده گردید. محیط غربالگری مورداستفاده حاوی ترکیبات ذیل هست: (g per L) NH4Cl,1; K2HPO4, 0.1; MgSO4-7H2O, 0.2; FeSO4-7H2O, 0.01; $CaCl_2$-4H2O,0.02 و همچنین ۰/۱ درصد از عناصر کمیاب هست. محلول عناصر کمیاب شامل: (g per L): ZnCl2-7H2O, 0.5; MnSO4-H2O,0.2 and CuSO4-5H2O, 0.5 (Zamani *et al*., 2018).

سویه‌های باکتریایی که قادر به رشد و ایجاد کدورت در محیط MSM بودند به‌عنوان سویه‌های دارای قابلیت تجزیه‌کنندگی اگزالی‌پلاتین در نظر گرفته شده‌اند. به‌منظور شناسایی سویه‌های جداسازی شده، از کیت‌های شناسایی بیوشیمیایی MICROGEN A&B (انگلستان) و مطابق با دستورالعمل‌های سازنده کیت انجام گردید.

بررسی قابلیت کاهش غلظت اگزالی‌پلاتین

به‌منظور بررسی قابلیت هر یک از سویه‌های غربالگری شده، کشت خالص از هر باکتری تهیه شده و با تراکم جمعیتی نهایی ۱/۵×۱۰^۶ cfu/mL به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط MSM و همچنین حاوی داروی اگزالی‌پلاتین با غلظت ۰/۷۸ میلی‌گرم بر لیتر تلقیح شدند. این آزمون در فلاسک های شیشه‌ای با حجم ۲۵۰ میلی‌لیتر انجام پذیرفت. فلاسک ها به مدت ۲۱ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه هم زده شدند. برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد و همچنین تیمار حاوی محیط کشت به‌عنوان کنترل منفی مورد استفاده قرار گرفت.

نمونه‌های هر فلاسک در روزهای ۰، ۷، ۱۴ و ۲۱ نمونه‌برداری شدند. نمونه‌های جداسازی شده با استفاده از سانتریفیوژ یخچال دار و با سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. در پایان از محلول رویی نمونه‌برداری شده و از آن برای آزمون تعیین مقدار ماده مؤثره اگزالی‌پلاتین توسط دستگاه کروماتوگرافی با فشار بالا (HPLC) (Waters E2695, USA) استفاده

گردید. حلال مورد استفاده جهت آنالیز HPLC استونیتریل ۱درصد، حجم تزریق ۲۰ میکرولیتر و سرعت تزریق ۱/۲ میلی‌لیتر بر دقیقه بود. در نهایت کمیت سنجی دارو در طول‌موج ۲۱۰ نانومتر انجام پذیرفت.

تعیین ترکیب جمعیتی بهینه از گونه‌های جداسازی شده

به‌منظور بررسی اثر استفاده هم‌زمان از چند گونه باکتریایی و بر اساس نتایج آزمون‌های غربالگری، چهار تیمار مختلف طراحی گردید که در هر تیمار به‌طور هم‌زمان سه گونه باکتریایی جداسازی شده استفاده گردید. این آزمون در فلاسک های با حجم ۵۰۰ میلی‌لیتر و حاوی محیط MSM (۲۰۰ میلی‌لیتر) حاوی اگزالی‌پلاتین صورت پذیرفت. نسبت جمعیتی باکتری‌های مورداستفاده به طور مساوی در نظر گرفته شد و تراکم نهایی جمعیت باکتری به میزان $۱/۵\times۱۰^{۶}$ cfu/mL انتخاب گردید. فلاسک ها به مدت ۲۱ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه هم زده شدند. برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد و همچنین تیمار حاوی محیط کشت به‌عنوان کنترل منفی مورد استفاده قرار گرفت. در نهایت غلظت اگزالی‌پلاتین در نمونه‌های هر فلاسک با استفاده از آنالیز HPLC مورد ارزیابی قرار گرفت.

آنالیز آماری

بررسی‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام پذیرفت و آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) با سطح معنی‌داری $P< ۰/۰۵$ به‌منظور ارزیابی وجود اختلاف معنی دار بین تیمارها مورداستفاده قرار گرفت.

نتایج و بحث

هرساله تعداد بسیار زیادی از ترکیبات دارویی، شامل آنتی‌بیوتیک‌ها، هورمون‌ها، داروهای مسکن و محصولات ضد سرطان ساخته شده و به مصرف می‌رسند. به دنبال مصرف این داروها، بسیاری از آنان به‌طور کامل در بدن متابولیزه نمی‌شوند و مقادیر قابل‌توجهی از آنان از طریق ادرار و مدفوع به پساب‌های شهری و بیمارستانی وارد می‌شوند. همچنین، در محیط‌های بیمارستانی و مراکز درمانی آزادسازی این داروها از طریق پساب بیمارستانی می‌تواند منجر به ورود آنان به محیط‌زیست گردد. از سوی دیگر، ورود این داروها به پساب صنایع داروسازی حین فرایند تولید امری اجتناب‌ناپذیر است. ورود این‌گونه ترکیبات به محیط‌زیست می‌تواند مخاطرات جدی زیست‌محیطی برای موجودات زنده در پی داشته باشد (Gautam *et al*., 2007) .

اگرچه ترکیبات دارویی متعددی هرساله وارد اکوسیستم‌های آبی و خاکی می‌گردند، ورود داروهای ضد سرطان به محیط‌زیست از خطر بسیار بالاتری برخوردار است. با توجه به قابلیت این داروها در مهار تکثیر سلولی و القاء آپوپتوز در سلول‌های یوکاریوتی، ورود آنان به محیط‌زیست نگرانی‌های بسیار جدی در زمینه سلامت موجودات زنده ایجاد می‌کند. این خطر به ویژه در مناطقی که چنین داروهایی تولید می‌گردند از اهمیت دو چندان برخوردار است(Heath *et al*., 2016; Jureczko & Kalka., 2020)

با توجه به تجربه‌های موفق به‌کارگیری میکروارگانیسم‌ها در حذف آلاینده‌های زیست‌محیطی و با توجه به مقاومت ذاتی پروکاریوت‌ها در برابر داروهای ضد سرطان، به نظر می‌رسد استفاده از آنان در کاهش این‌گونه آلاینده‌ها رویکردی نوین و موفقیت‌آمیز باشد. بر این اساس، در این مطالعه به بررسی امکان جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده اگزالی‌پلاتین از پساب شرکت داروسازی سبحان انکولوژی و به‌کارگیری آنان در سیستم‌های تک و چندگونه‌ای در کاهش غلظت داروی مذکور پرداخته شد.

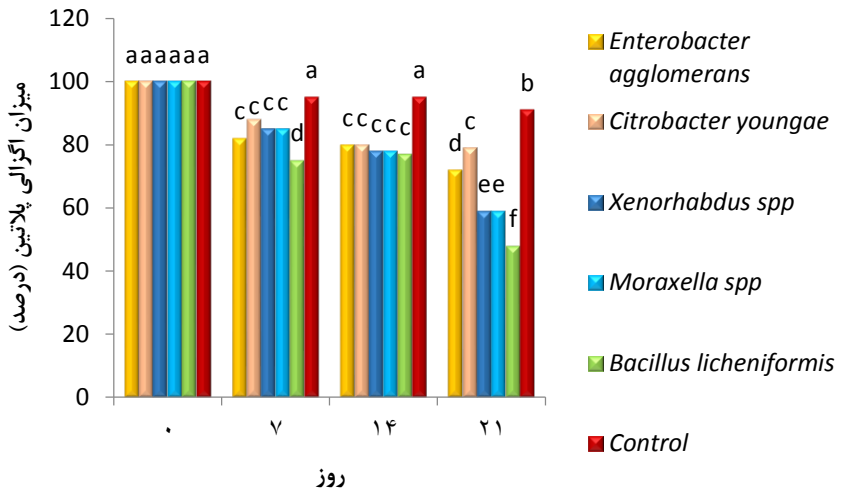
بر اساس نتایج آزمون‌های حداقل غلظت مهارکنندگی و غربالگری تجزیه اگزالی‌پلاتین، درنهایت پنج گونه باکتریایی که دارای مقادیر MIC بالاتر از یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بودند و قادر به رشد در محیط MSM حاوی اگزالی‌پلاتین به‌عنوان تنها منبع کربن بودند، به منظور انجام آزمایش‌های بعدی، خالص‌سازی و مورد شناسایی قرار گرفتند. بر اساس نتایج، گونه‌های جداسازی شده شامل *Enterobacter agglomerans*، *Citrobacter youngae*، *Xenorhabdus spp*، *Bacillus licheniformis* و *Moraxella spp* بودند. ویژگی های بیوشیمیایی گونه های شناسایی شده در جدول شماره یک نمایش داده شده است.

نتایج این مطالعه در پایان دوره آزمایش نشان داد که تمامی گونه‌های شناسایی‌شده منجر به کاهش معنی‌دار غلظت دارو در مقایسه با تیمار کنترل شدند. در بین گونه‌های شناسایی‌شده، باکتری *B. licheniformis* دارای بالاترین قابلیت در کاهش غلظت اگزالی‌پلاتین را داشت. به‌بیان‌دیگر، در پایان دوران آزمایش، این باکتری منجر به کاهش غلظت دارو تا ۵۲ درصد مقدار اولیه گردید که از این منظر اختلاف معنی‌داری را با سایر سویه‌ها نشان داد. همچنین گونه‌های *Xenorhabdus* و *Moraxella* با کاهش ۴۱ درصدی دارو عملکرد بهتری نسبت به دو باکتری دیگر داشتند. از سوی دیگر، باکتری *E. agglomerans* با کاهش ۲۱ درصدی دارو کمترین قابلیت تجزیه اگزالی‌پلاتین را در مقایسه با سایر گونه‌ها نشان داد. تصویر شماره یک قابلیت گونه‌های شناسایی‌شده در کاهش غلظت اگزالی‌پلاتین را نمایش می‌دهد.

جدول ۱. ویژگی های بیوشیمیایی باکتری‌های جداسازی شده از پساب صنایع داروسازی

گونه باکتری	*E. agglomerans*	*C. youngae*	*Xenorhabdus spp*	*B. licheniformis*	*Moraxella spp*
لایزین دکربوکسیلاز	−	−	−	+	+
مصرف گلوکز	+	+	+	+	−
ONPG	+	+	−	+	−
VP	−	−	−	−	−
تجزیه ژلاتین	+	−	+	+	−
مصرف سوربیتول	+	+	−	+	−
مصرف رافینوز	−	−	−	+	−
مصرف لاکتوز	−	−	−	nd	−
اورنیتین دکربوکسیلاز	−	−	−	nd	+
مصرف مانیتول	+	+	−	+	−
ایندول	+	−	−	−	−
مصرف سیترات	−	+	−	+	−
مصرف مالونات	+	−	−	nd	−
مصرف رامنوز	+	+	−	+	−
مصرف آرابینوز	−	+	−	+	−
مصرف سالیسین	−	−	−	+	−
تولید H_2S	−	+	−	nd	−
مصرف زایلوز	+	+	−	+	−
هیدرولیز اوره	+	+	−	nd	+
تریپتوفان دآمیناز	+	−	+	nd	+
مصرف اینوزیتول	+	−	−	+	−
مصرف سوکروز	−	+	−	+	−
مصرف آدونیتول	−	−	−	−	−
آرزنین دهیدرولاز	−	+	−	+	+
حرکت	+	+	+	−	+
اکسیداز	−	−	−	+	+
احیاء نیترات	nd	nd	nd	+	+

nd: تعیین نشده



شکل ۱. تغییرات غلظت داروی اگزالی پلاتین با استفاده از باکتری‌های جداسازی شده در مدت ۲۱ روز. حروف متفاوت نشانگر تفاوت معنی دار است ($p<0.05$).

نتایج این مطالعه نشان داد که باکتری *B. licheniformis* جداسازی شده از پساب دارویی قابلیت مناسبی در کاهش غلظت داروی اگزالی‌پلاتین دارد و منجر به کاهش غلظت دارو به میزان ۵۲ درصد شد. توانایی گونه‌های مختلف باسیلوس در کاهش یا حذف ترکیبات دارویی از پساب در مطالعات پیشین گزارش شده است. *Grandclément* و همکاران در سال ۲۰۲۰ نشان دادند که گونه *B. subtilis* در کشت هم‌زمان با *Brevibacillus Laterosporus* منجر به حذف کامل داروی دیکلوفناک شدند (*Grandclément et al. 2020*). علاوه بر این، شواهدی مبنی بر استفاده از گونه‌های باکتریایی در حذف داروهای ضد سرطان نیز موجود است. Westman و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که گونه‌های اکتینومایست به طرز چشمگیری قادر به تجزیه داروی ضد سرطانی دوکسوروبیسین شدند. آنان پیشنهاد کردند که فرایند تجزیه میکروبی دارو از طریق مکانیسم گلیکوزیلاسیون اولیه رخ می‌دهد (Westman *et al.* 2012). در مطالعه حاضر، باکتری *B. licheniformis* به‌طور چشمگیری منجر به کاهش غلظت داروی اگزالی‌پلاتین گردید. به نظر می‌رسد که گونه‌های باسیلوس به دلیل مقاومت و پایداری بالا و همچنین فعالیت آنزیمی قوی می‌توانند کاندیدای مناسبی جهت حذف بیولوژیک آلاینده‌های ضد سرطانی در نظر گرفته شوند. اگرچه انجام مطالعات تکمیلی در این زمینه ضروری به نظر می‌رسد.

بر اساس نتایج آزمایش قابلیت تجزیه اگزالی‌پلاتین توسط هر سویه، در نهایت چهار تیمار ترکیبی متشکل از سه گونه مختلف مورد استفاده قرار گرفت. تیمارهای آزمایش شامل،

تیمار یک *(B. licheniformis + Moraxella spp + Xenorhabdus spp)*

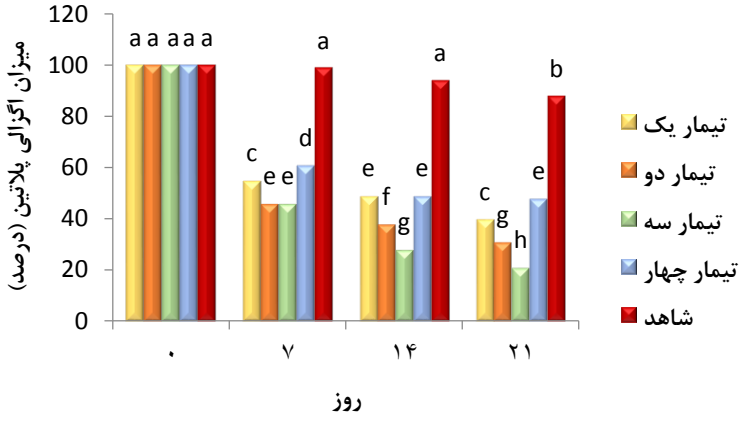
تیمار دو (B. licheniformis + Moraxella spp + E. agglomerans)

تیمار سه (*B. licheniformis + Xenorhabdus spp + E. agglomerans*)

تیمار چهار (*B. licheniformis + C. youngae + E. agglomerans*)

تیمار پنج (شاهد فاقد باکتری) *بودند.*

بر اساس نتایج، بیشترین میزان کاهش دارو در تیمار شماره سه مشاهده گردید. غلظت دارو در یک هفته نخست با کاهشی ۵۴ درصدی مواجه گردید و سپس روند کاهشی با شیب ملایم‌تری ادامه یافت و در پایان دوران مطالعه غلظت نهایی اگزالی‌پلاتین به میزان ۷۹ درصد کاهش یافت. همچنین، تیمارهای شماره دو و یک با کاهش به ترتیب ۶۹ و ۶۰ درصدی نسبت به تیمار شماره چهار عملکرد بهتری را نشان دادند. لازم به ذکر است که بیشترین میزان کاهش غلظت دارو در همه تیمارهای موردمطالعه در هفت روز نخست مشاهده شد و تیمارهای شماره دو و سه با کاهش ۵۴ درصدی در یک هفته، بهترین عملکرد را نشان دادند. بررسی تغییرات غلظت دارو در تیمار کنترل نیز نشان‌دهنده تغییرات جزئی به میزان ۱۲ درصد در پایان زمان مطالعه داشت که تفاوت معنی‌داری با سایر تیمارها نشان داد. نتایج تغییرات غلظت دارو در تیمارهای موردمطالعه در تصویر شماره ۲ نمایش داده شده است.



شکل ۲. تغییرات غلظت داروی اگزالی پلاتین در تیمارهای حاوی ترکیب جمعیتی چندگونه‌ای از باکتری‌های جداسازی شده در مدت ۲۱ روز. تیمار یک: *B. licheniformis + Moraxella spp + Xenorhabdus spp*؛ تیمار دو: *B. licheniformis + Moraxella spp + E. agglomerans*؛ تیمار سه: *B. licheniformis + Xenorhabdus spp + E. agglomerans* و تیمار چهار: *B. licheniformis + C. youngae + E. agglomerans*. حروف متفاوت نشانگر تفاوت معنی دار است ($p<0.05$).

نتایج این مطالعه نشان داد که به‌کارگیری گونه‌های جداسازی شده در قالب یک جمعیت چندگونه‌ای منجر به بهبود راندمان حذف دارو گردید. به نظر می‌رسد که طی فرایند کشت هم‌زمان فرایندهای ترانسفورماسیون و فعال‌سازی دارو و به دنبال آن شکسته شدن پیوندهای اولیه به طرز مؤثرتری صورت پذیرد و این امر منجر به قرارگیری سایت‌های هدف دارو در برابر آنزیم‌های تولیدشده توسط تمامی گونه‌ها گردد. مطابق با این فرضیه، Yan و همکاران در سال ۲۰۱۸ در مطالعه‌ای در زمینه غیرفعال سازی دوروکسوبیسین نشان دادند که باکتری *Raoultella planticola* در گام نخست از طریق یک مسیر گلیکوزیلاسیون احیایی منجر به گلیکوزیلاسیون دارو و تبدیل آن به 7-deoxydoxorubicinol و 7-deoxydoxorubicinolone شد و متابولیت های حاصله نیز توسط باکتری‌های *Klebsiella pneumoniae* و *Escherichia coli* به طریق آنزیمی حذف گردیدند (Yan *et al*. 2018). با توجه به نتایج حاضر، به نظر می‌رسد فرایند حذف داروی اگزالی‌پلاتین توسط جمعیت‌های چندگونه‌ای در چند مرحله و با به‌کارگیری آنزیم‌های متعدد میکروبی صورت می‌پذیرد. اگرچه، انجام مطالعات بیشتر در آینده به‌منظور ردیابی و شناسایی متابولیت های حاصله، آنزیم‌های مؤثر و پیش‌بینی مسیر متابولیکی تجزیه دارو ضروری به نظر می‌رسد.

نتیجه‌گیری کلی

در این مطالعه برای اولین بار جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه‌کننده داروی اگزالی‌پلاتین از پساب دارویی، و قابلیت آنان در قالب سیستم‌های تک و چندگونه‌ای در جهت حذف داروی اگزالی‌پلاتین مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که استفاده از مخلوط جمعیتی شامل *B. licheniformis, Xenorhabdus spp* و *E. Agglomerans* می‌تواند منجر به کاهش غلظت دارو تا ۷۹ درصد شود. بر اساس این نتایج، استفاده از گونه‌های باکتریایی جداسازی شده می‌تواند به‌عنوان رویکرد نوین و آینده داری در زمینه حذف آلاینده اگزالی‌پلاتین از پساب دارویی و بیمارستانی مدنظر قرار گیرد. اگرچه انجام مطالعات تکمیلی و شناسایی مسیرهای متابولیکی تجزیه دارو ضروری به نظر می‌رسد.

منابع

Cristóvão. M.B., Janssens. R., Yadav. A., Pandey. S., Luis. P., Van der Bruggen. B., Dubey. K.K., Mandal. M.K., Crespo. J.G. and Pereira. V.J. (2020). Predicted concentrations of anticancer drugs in the aquatic environment: What should we monitor and where should we treat? *Journal of hazardous materials 392 (*122330). Doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.122330

Fonseca. T.G., Morais. M.B., Rocha. T., Abessa. D.M.S., Aureliano. M. and Bebianno. M.J. (2017). Ecotoxicological assessment of the anticancer drug cisplatin in the polychaete Nereis diversicolor. *Science of the Total Environment 575:*162-172. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.09.185

Gautam. A.K., Kumar. S., Sabumon. P. (2007). Preliminary study of physico-chemical treatment options for hospital wastewater. Journal of Environment Managment 83(3):672 298-306. Doi: 10.1016/j.jenvman.2006.03.009

Ghafuria. Y., Yunesian. M., Nabizadeh. R., Mesdaghinia. A., Dehghani. M.H. and Alimohammadi. M. (2018). Environmental risk assessment of platinum cytotoxic drugs: a focus on toxicity characterization of hospital effluents. *International Journal of Environmental Science and Technology 15*(9):1983-1990. Doi: 10.1007/s13762-017-1517-6

Grandclément. C., Piram. A., Petit. M. E., Seyssiecq. I., Laffont-Schwob. I., Vanot. G., ... and Doumenq. P. (2020). Biological removal and fate assessment of diclofenac using Bacillus subtilis and brevibacillus laterosporus strains and ecotoxicological effects of diclofenac and 4′-Hydroxy-diclofenac. *Journal of Chemistry, 2020*.

Heath. E., Filipič. M., Kosjek. T. and Isidori. M. (2016). Fate and effects of the residues of anticancer drugs in the environment. *Environmental Science and Pollution Research* 23**:** 14687–14691. Doi: 10.1007/s11356-016-7069-3

Jureczko. M., and Kalka. J. (2020). Cytostatic pharmaceuticals as water contaminants. European journal of pharmacology 866:172816. Doi: 10.1016/j.ejphar.2019.172816

Kaya. Y., Bacaksiz. A.M., Bayrak. H., Gönder. Z.B., Vergili. I., Hasar. H. and Yilmaz. G. (2017). Treatment of chemical synthesis-based pharmaceutical wastewater in an ozonation-anaerobic membrane bioreactor (AnMBR) system. *Chemical Engineering Journal 322:*293-301. Doi: 10.1016/j.cej.2017.03.154

Knopp. G., Prasse. C., Ternes. T.A. and Cornel. P. (2016). Elimination of micropollutants and transformation products from a wastewater treatment plant effluent through pilot scale ozonation followed by various activated carbon and biological filters. *Water Resource 100:*580-592. Doi: 10.1016/j.watres.2016.04.069

Konate. A., Poupon. J., Villa. A., Garnier. R., Hasni-Pichard. H, Mezzaroba. D., Fernandez. G. and Pocard. M. (2011). Evaluation of environmental contamination by platinum and exposure risks for healthcare workers during a heated intraperitoneal perioperative chemotherapy (HIPEC) procedure. *Journal of Surgical Oncology 103*(1):6-9. Doi: 10.1002/jso.21740

Mulamattathil. S. G., Bezuidenhout. C., Mbewe, M., and Ateba, C. N. (2014). Isolation of environmental bacteria from surface and drinking water in Mafikeng, South Africa, and characterization using their antibiotic resistance profiles. *Journal of pathogens, 2014*.

Westman. E.L., Canova. M.J., Radhi. I.J., Koteva. K., Kireeva. I., Waglechner. N., and Wright. G.D. (2012). Bacterial inactivation of the anticancer drug doxorubicin. *Chemical Biology 19*(10):1255-1264. Doi: 10.1016/j.chembiol.2012.08.011

Yan, A., Culp, E., Perry, J., Lau, J. T., MacNeil, L. T., Surette, M. G., & Wright, G. D. (2018). Transformation of the anticancer drug doxorubicin in the human gut microbiome. *ACS infectious diseases*, *4*(1), 68-76.

Zamani. H., Rakhshaee. R., and Garakoui. S.R. (2018). Two contrary roles of Fe3O4 nanoparticles on kinetic and thermodynamic of Paclitaxel degradation by Citrobacter amalonaticus Rashtia immobilized on sodium alginate gel beads. *Journal of Hazardous Materrials 344:*566-575. Doi: 10.1016/j.jhazmat.2017.10.061

Zhang. L., Hu. J., Zhu. R., Zhou. Q., and Chen. J. (2013). Degradation of paracetamol by pure bacterial cultures and their microbial consortium. Applied Microbiology and Biotechnology 97(8):3687-3698. Doi: 10.1007/s00253-012-4170-5

Isolation of oxaliplatin degrading bacteria from pharmaceutical wastewater and using them in drug removal by single and multi-species bacterial population

S. R. Garakoui,*Kh. Issazade, H. Zamani, R. Rakhshaee, M. Shahriarinour

Abstract

Introduction: Exploring bacterial cells, as prokaryotic organisms, could be a novel approach for the removal of these compounds. Therefore, in this study, we aimed to isolate and identify oxaliplatin degrading bacteria from pharmaceutical wastewater samples and to evaluate their oxaliplatin removal potential as single and multi-species systems. **Materials and Methods:** Bacterial isolation was performed using the membrane filtration method and the inhibitory effect of the drug for the isolated bacteria was evaluated in 96-well plates. Finally, oxaliplatin removal efficacy of the single and multi-species bacterial populations was determined using the High-Pressure Liquid chromatography (HPLC). **Results:** A total number of five bacterial species, including *Enterobacter agglomerans, Citrobacter youngae, Xenorhabdus spp., Bacillus licheniformis* and *Moraxella spp.able* to degrade oxaliplatin were isolated. The highest and least oxaliplatin degrading potential was observed for *B. licheniformis* (52%) and *E. agglomerans* (21%), respectively. Also, the multi-species treatment containing *B. licheniformis, Xenorhabdus spp, E. agglomeran* showed the highest oxaliplatin removal efficacy (79%).

Conclusion: This work reveals that the bacteria isolated from pharmaceutical effluents could be employed for oxaliplatin removal and could be considered as a novel approach for the reduction of pharmaceutical pollutants.

Keywords: anticancer drugs; bioremediation; HPLC; microbial degradation