

Removal of Norfloxacin Antibiotic from Contaminated Solution by Microalgae *Chlorella* sp.

ZAHRA DARABI¹, NASRIN GHORBANZADEH^{2*}, MOHAMMAD BAGHER FARHANGI³, DAVOOD BAKHSHI⁴

1. M.Sc. Student, Department of Soil Science, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

2, 3. Assistant Professor, Department of Soil Science, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

4. Associate Professor, Department of Horticulture Science, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

(Received: Nov. 17, 2018- Revised: Jan. 13, 2019- Accepted: Jan. 16, 2019)

ABSTRACT

In this study, the removal potential of norfloxacin antibiotic from water was investigated using *Chlorella* sp. microalga. Also, the toxicological effects of norfloxacin on *Chlorella* sp. was examined by studying the growth and biochemical characteristics of the microalga including cell dry weight, total chlorophyll and carotenoid content. A multi-level factorial experiment with complete randomized design was performed with three replications. The experimental factors included 5 levels of antibiotic (0, 20, 50, 80 and 120 mg L⁻¹) and 6 sampling times (0, 1, 3, 6, 9 and 14 day). The cell dry weight of *Chlorella* sp. was significantly reduced at increased concentrations of norfloxacin, showing 12.61, 42.41 and 55.23% reduction at 50, 80 and 120 mg L⁻¹ norfloxacin, respectively, as compared to the control treatment after 14 days of incubation. The total chlorophyll and carotenoid contents were significantly increased by prolonging incubation time as a result of norfloxacin stress. The effective concentration (EC50) of norfloxacin was calculated to be 453.71 mg L⁻¹ for *Chlorella* sp. at the end of day 14. *Chlorella* sp. was able to eliminate norfloxacin up to 69.15, 51.78, 28.41 and 18.18% from 20, 50, 80 and 120 mg L⁻¹ water solutions, respectively, after 14 days of incubation.

Keywords: Emerging contaminants, Algae, Bioaccumulation, Fluoroquinolone

حذف آنتی‌بیوتیک نورفلوکساسین از محلول آلوده بوسیله ریزجلبک کلرلا

زهرا دارابی^۱، نسرین قربان‌زاده^{۲*}، محمدباقر فرهنگی^۳، داود بخشی^۴

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۲ و ۳. استادیار، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۴. دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۸/۲۶ - تاریخ بازنگری: ۱۳۹۷/۱۰/۲۳ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۱۰/۲۶)

چکیده

در این پژوهش توانایی حذف آنتی‌بیوتیک نورفلوکساسین از محلول آبی توسط ریزجلبک کلرلا مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین پیامدهای سمی این آنتی‌بیوتیک بر روی ریزجلبک کلرلا با مطالعه ویژگی‌های رشدی و بیوشیمیایی آن شامل وزن خشک سلول، کلروفیل کل و محتوای کارتنوئید بررسی شد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با آرایش فاکتوریل و با سه تکرار انجام شد. فاکتورهای آزمایش شامل پنج سطح آنتی‌بیوتیک (صفر، ۲۰، ۵۰، ۸۰، ۱۲۰ میلی‌گرم بر لیتر) و شش زمان نمونه‌برداری (صفر، ۱، ۳، ۶، ۹ و ۱۴ روز) بود. وزن خشک سلولی ریزجلبک با افزایش غلظت نورفلوکساسین به طور معنی‌داری کاهش یافت و در پایان ۱۴ روز انکوباسیون در غلظت‌های ۵۰، ۸۰ و ۱۲۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک در مقایسه با شاهد به ترتیب ۲۱/۶۱، ۴۲/۴۱ و ۵۵/۲۳ درصد کاهش نشان داد. مقادیر کلروفیل کل و کارتنوئید با افزایش زمان انکوباسیون به طور معنی‌داری به دلیل تنش ناشی از نورفلوکساسین افزایش پیدا کردند. غلظت مؤثر (EC50) نورفلوکساسین برای ریزجلبک کلرلا ۴۵۳/۷۱ میلی‌گرم بر لیتر در پایان ۱۴ روز انکوباسیون محاسبه شد. کلرلا توانست پس از دو هفته انکوباسیون به ترتیب ۶۹/۱۵، ۵۱/۷۸، ۲۸/۴۱ و ۱۸/۱۸ درصد آنتی‌بیوتیک نورفلوکساسین را از محلول آبی دارای غلظت‌های ۲۰، ۵۰، ۸۰ و ۱۲۰ میلی‌گرم بر لیتر حذف کند.

واژه‌های کلیدی: آلاینده‌های نوظهور، ریزجلبک، تجمع زیستی، فلوروکینولون

مقدمه

در چند سال اخیر از عبارت "آلاینده‌های نوظهور" به‌طور گسترده‌ای برای اشاره به انواع ترکیب‌های شیمیایی که بدون هیچ‌گونه نظارتی در محیط‌زیست رها شده و بر سلامت انسان اثر گذارند، استفاده شده است. این آلاینده‌ها از طریق فعالیت‌های صنعتی، بیمارستانی و فاضلاب‌ها به سیستم‌های آب و خاک وارد می‌شوند (Schwarzenbach et al., 2006). آنتی‌بیوتیک‌ها نیز در این گروه از آلاینده‌ها قرار می‌گیرند. آنتی‌بیوتیک‌ها در میان داروها موفق‌ترین گروه برای درمان بیماری‌های انسان و دام هستند. از طرفی این داروها در بسیاری از فعالیت‌های مختلف از جمله کشاورزی، آبی‌پروری، زنبورداری و پرورش دام و طیور به‌عنوان محرک رشد نیز به کار می‌روند. بر طبق آمار ارائه‌شده توسط Wise (2002)، مقدار مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها در سطح جهان در حدود صد تا دویست هزار تن در سال برآورد شده است. با این حال، بنا به اعلام سازمان بهداشت جهانی، مقدار استفاده شده از

آنتی‌بیوتیک‌ها دقیقاً مشخص نیست چرا که تنها چند کشور آمار دقیق مقدار استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها را اعلام نموده‌اند (WHO, 2002). با توجه به کاربرد پزشکی آنتی‌بیوتیک‌ها در جامعه انسانی و دامپزشکی، ترکیب‌های آنتی‌بیوتیکی مختلف در محدوده میکروگرم در لیتر در فاضلاب‌های شهری و بیمارستانی، آب‌های سطحی، آب‌های زیرزمینی و آب آشامیدنی گزارش شده است (Benotti et al., 2009). بیشتر این ترکیب‌ها جذب اندکی در سیستم گوارشی انسان و دام داشته و حدود ۷۵-۲۵ درصد آن‌ها در نهایت به‌صورت هضم نشده دفع می‌شوند (Thiele-bruhn, 2005). نگرانی عمده در مورد حضور آنتی‌بیوتیک‌ها در محیط‌زیست، افزایش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در گونه‌های باکتری‌هایی است که درمان عفونت‌های ناشی از آن‌ها را با مشکل روبرو می‌کند و امروزه به‌عنوان یکی از چالش‌های عمده برای سلامت بشر و صنعت دامپزشکی مطرح است (Perretin et al., 1997).

* نویسنده مسئول: nghorbansazadeh@guilan.ac.ir

طریق دو فرآیند همزمان انباشت زیستی^۳ و تجزیه زیستی^۴ می-تواند آلاینده‌های آلی را حذف کند (Xiong et al., 2016c). Xiong et al. (2016b) به بررسی اثر جلبک کلامیدوموناس مکزیکانا^۵ بر حذف سمیت سیپروفلوکساسین در محیط آبی پرداختند و راندمان حذف سیپروفلوکساسین را توسط این جلبک پس از ۱۱ روز حدود ۵۶ درصد گزارش کردند. Xiong et al. (2016c) به بررسی تجزیه زیستی لووفلوکساسین به وسیله جلبک کلرلا ولگاریس^۶ در محیط آبی پرداختند و گزارش کردند که لووفلوکساسین اثر ناچیزی بر رشد جلبک کلرلا ولگاریس داشت و این جلبک از طریق دو فرآیند همزمان انباشت و تجزیه زیستی توانست پس از ۱۱ روز حدود ۱۱/۷۷ درصد از لووفلوکساسین را حذف کند.

اگرچه برخلاف دیگر آلاینده‌ها مانند فلزهای سنگین، حشره‌کش‌ها و علف‌کش‌ها، رفتار و سرنوشت آلاینده‌های دارویی به‌طور گسترده‌ای مطالعه نشده است، اما اطلاعات محدود موجود بیانگر پیامد نامطلوب آنتی‌بیوتیک‌ها در زیست‌بوم‌های مختلف است. با توجه به این‌که آنتی‌بیوتیک‌های خانواده فلوروکینولون انحلال‌پذیری بالایی در آب دارند و از سویی تنها حدود ۲۵ تا ۳۰ درصد آن‌ها در بدن جذب می‌شوند (Rodvold and Neuhauser, 2001)، بخش زیادی از آن‌ها وارد سیستم فاضلاب شده و متأسفانه به علت ناکارآمدی فن‌آوری‌های متداول تصفیه فاضلاب، دوباره به محیط‌زیست برمی‌گردند (Schröder et al., 2002). بنابراین، در این پژوهش حذف آنتی‌بیوتیک نورفلوکساسین از محلول آلوده توسط ریزجلبک کلرلا بررسی شد که یک روش دوست‌دار محیط‌زیست و کم‌هزینه است.

مواد و روش‌ها

آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با آرایش فاکتوریل و با سه تکرار انجام شد. فاکتورهای آزمایش شامل پنج سطح آنتی‌بیوتیک (صفر، ۲۰، ۵۰، ۸۰، ۱۲۰ میلی‌گرم بر لیتر) و شش زمان نمونه‌برداری (صفر، ۱، ۳، ۶، ۹ و ۱۴ روز) بود. از آنجا که ممکن است حذف آنتی‌بیوتیک در عدم حضور ریزجلبک به صورت شیمیایی نیز انجام شود، یک تیمار سطح صفر ریزجلبک در یکی از سطوح آنتی‌بیوتیک (غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر) نیز اعمال شد. اما با توجه به این‌که سطح صفر ریزجلبک تنها در یک سطح آنتی‌بیوتیک آزمایش شد و برای بررسی امکان حذف شیمیایی آنتی‌بیوتیک بود در طرح آماری لحاظ نشد.

فلوروکینولون‌ها^۱ از مهم‌ترین گروه آنتی‌بیوتیک‌ها به شمار می‌آیند. نورفلوکساسین^۲ (C₁₆H₁₈FN₃O₃) نسل دوم از آنتی‌بیوتیک‌ها از گروه فلوروکینولون‌ها است که برای درمان انواع عفونت‌ها به‌ویژه عفونت‌های ادراری کاربرد دارد (Doorslaer et al., 2014). این آنتی‌بیوتیک از عملکرد یک آنزیم باکتریایی بنام DNA gyrase و توپوایزومراز II که در همانندسازی DNA نقش دارد، جلوگیری به عمل می‌آورد و مانع از تکثیر DNA باکتری می‌شود. امروزه شناسایی مقادیر زیادی از آنتی-بیوتیک‌های خانواده فلوروکینولون و محصولات فرعی تغییر شکل یافته آن‌ها در آب‌های سطحی و زیرزمینی (Lindsey et al., 2001)، آب آشامیدنی (Gaffney et al., 2015) و فاضلاب‌ها (Gimeno et al., 2016) سبب ایجاد نگرانی‌های عمده‌ای شده است.

ریزجلبک‌ها موجوداتی شاخص و کلیدی برای ارزیابی کیفیت آب و بررسی سمیت آلاینده‌ها می‌باشند. پژوهش‌ها نشان داده‌اند که ریزجلبک‌های میکسوتروف قادر به انباشت و حذف آلاینده‌های زیست‌محیطی مانند عناصر غذایی معدنی (نیتروژن و فسفر)، فلزهای سنگین (Mehta and Gaur, 2005) و آلاینده‌های آلی مانند ترکیب‌های فنلی و هیدروکربن‌های پلی‌آروماتیک (Ji et al., 2014)، آفت‌کش‌ها (Kurade et al., 2016) و داروها (Xiong et al., 2016a; Chen et al., 2015) از آب‌های آلوده هستند و به‌عنوان یک موجود زیستی امیدوارکننده برای حذف این آلاینده‌ها پیشنهاد شده‌اند. باکتری‌ها و قارچ‌ها در فرآیند تخریب آلاینده‌های آلی نیاز به انرژی بیشتر و منبع غذایی (منبع کربن) و اکسیژن برای فعالیت‌های متابولیک دارند. در مقابل ریزجلبک‌ها با مصرف دی‌اکسید کربن و تولید اکسیژن به کاهش انتشار کربن به اتمسفر نیز کمک می‌کنند (Xiong et al., 2016b). افزون بر این زیست‌توده ریزجلبک‌ها پس از اصلاح آب‌های آلوده می‌توانند به‌عنوان سوخت زیستی پایدار عمل کنند (Chen et al., 2015). ریزجلبک‌های میکسوتروف به‌واسطه‌ی سازگاری ژنتیکی به‌راحتی می‌توانند در محیط‌های با تنش بالا مانند تغییرات دمایی، شوری، نور و کمبود مواد غذایی زنده بمانند (Carrera et al., 2011). بیش از ۷۵۰۰ گونه جلبک سبز شناسایی شده‌اند که ساختار، چرخه‌ی زندگی و زیستگاه‌های متنوعی دارند (Lee, 2008).

ریزجلبک کلرلا از شاخه کلروفیتا و تک سلولی است که از

4. Biodegradation
5. Chlamydomonas mexicana
6. Chlorella vulgaris

1. Fluoroquinolones
2. Norfloxacin
3. Bioaccumulation

غلظت مؤثر (EC50) نورفلوکساسین در زمان‌های مختلف انکوباسیون نیز از معادله‌های حاصل از نمودارهای کاهش نرخ رشد ویژه نسبت به غلظت صفر آنتی‌بیوتیک (درصد) و غلظت‌های مختلف آنتی‌بیوتیک (میلی‌گرم بر لیتر) در آن زمان محاسبه شد.

اندازه‌گیری ویژگی‌های بیوشیمیایی ریزجلبک کلرلا

ویژگی‌های بیوشیمیایی شامل کلروفیل کل (کلروفیل a و کلروفیل b) و مقدار کارتنوئید می‌باشد. برای اندازه‌گیری کلروفیل کل و کارتنوئید از دستگاه اسپکتروفوتومتر استفاده شد. به این ترتیب که ۱۰ میلی‌لیتر از ارلن‌ها نمونه‌برداری شده و نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۴۵۰۰ دور در دقیقه در سانتریفیوژ به چرخش درآمدند. محلول رویی سانتریفیوژ دور ریخته شد و حجم از دست‌رفته با ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۹۰ درصد جایگزین شد. سپس لوله‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سلسیوس قرار گرفته و پس از آن به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۴۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ جذب محلول رویی توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۶۶۵ و ۶۵۲ و ۴۷۰ نانومتر اندازه‌گیری و غلظت کلروفیل a و b و کارتنوئید به ترتیب از روابط (۲، ۳ و ۴) محاسبه شد (Pancha et al., 2015).

رابطه (۲) Chlorophylla (mg L⁻¹)=16.82A₆₆₅-9.28A₆₅₂

رابطه (۳) Chlorophyllb (mg L⁻¹)=36.92A₆₅₂-16.54A₆₆₅

رابطه (۴) C_{carotenoid} (mg L⁻¹)=(100A₄₇₀-1.91C_a-95.15C_b)/225

که در این روابط A نشان‌دهنده‌ی جذب در طول موج موردنظر، C_a و C_b به ترتیب مقدار کلروفیل a و b (mg L⁻¹) هستند.

اندازه‌گیری نورفلوکساسین باقی‌مانده

در فواصل زمانی موردنظر از ارلن‌ها به مقدار ۱۰ میلی‌لیتر نمونه‌برداری و پس از ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ با سرعت ۴۵۰۰ دور در دقیقه، ۱ میلی‌لیتر از محلول رویی با سرنگ استریل برداشته و به میکروتیوپ منتقل شد. مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر متانول اسیدی برای حل شدن بهتر آنتی‌بیوتیک به آن اضافه شده و سپس به وسیله سرنگ استریل از فیلتر ۰/۲ میکرومتر عبور داده شد (Kurade et al., 2016). سپس غلظت آنتی‌بیوتیک باقی‌مانده به وسیله دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا^۳ (HPLC water 1525 system USA) اندازه‌گیری شد. جدا شدن نمونه از طریق ستون C18 انجام شد. حجم تزریق ۲۰ میکرولیتر بود و دمای ستون روی ۳۵ درجه سلسیوس تنظیم شد. برای فاز متحرک از استونیتریل، آب و تری‌اتیل آمین با نسبت (۸۰:۲۰:۰/۳ V/V/V) با سرعت

تهیه و بازکشت ریزجلبک کلرلا

ریزجلبک *Chlorella sp.* از بخش زیست‌شناسی، دانشکده علوم دانشگاه گیلان تهیه و در محیط BG-11 با پی‌اچ ۷/۲، دمای ۲۵ درجه سلسیوس و زیر نور فلورسنت سفید (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) به مدت ۱۰ روز بازکشت شد.

حذف نورفلوکساسین از محلول آلوده

مایه‌زنی ریزجلبک با غلظت ۱۰ درصد حجمی (حجم مایه تلقیح به حجم سوسپانسیون) در ارلن‌های یک لیتری که دارای ۵۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت سترن BG-11 و غلظت‌های صفر، ۲۰، ۵۰، ۸۰ و ۱۲۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک (با خلوص ۹۸٪- تهیه‌شده از شرکت Sigma) بودند، انجام شد. تمامی ارلن‌ها به مدت ۱۴ روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و زیر نور فلورسنت سفید (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) انکوباسیون شدند. در زمان‌های صفر، ۱، ۳، ۶، ۹ و ۱۴ روز از ارلن‌ها نمونه‌برداری شد. در این نمونه‌ها وزن خشک سلول^۱ (DCW)، رشد سلولی (جذب نوری^۲ در ۶۸۰ نانومتر) (OD₆₈₀)، مقدار کلروفیل a، کلروفیل b، کارتنوئید و آنتی‌بیوتیک نورفلوکساسین باقی‌مانده اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری وزن خشک سلول و رشد سلولی

برای اندازه‌گیری وزن خشک سلول ۲۰ میلی‌لیتر از ارلن‌ها از کاغذ صافی واتمن (GF-52) عبور داده شد. کاغذ صافی به همراه زیست‌توده باقی‌مانده جلبک روی آن در دمای ۸۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت در آون خشک شده و سپس وزن آن اندازه‌گیری شد. با کم کردن وزن کاغذ صافی، وزن خشک سلول‌های ریزجلبک کلرلا در طول مدت ۱۴ روز انکوباسیون بر حسب گرم در لیتر به دست آمد (Gao et al., 2011). به منظور اندازه‌گیری رشد سلولی نیز مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از ارلن‌ها نمونه‌برداری شد و میزان جذب نور در طول موج ۶۸۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر (Cary 100 scan) اندازه‌گیری شد (Gao et al., 2011).

اندازه‌گیری نرخ رشد ویژه

نرخ رشد ویژه (μ) با استفاده از مقادیر وزن خشک سلول و از (رابطه ۱) محاسبه شد (Xiong et al., 2016b).

$$\mu = \frac{\ln N_2 - \ln N_0}{t_2 - t_0} \quad (\text{رابطه ۱})$$

که در این رابطه μ نرخ رشد ویژه (d⁻¹)، N₂ وزن خشک سلول (g L⁻¹) در زمان t₂ و N₀ نیز وزن خشک سلول (g L⁻¹) در زمان t₀ (زمان صفر) (d) است.

آنالیز آماری

نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر با نرم افزار SAS 9.4 آنالیز شد و مقایسه میانگین داده‌ها نیز با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد. برای رسم نمودارها نیز از نرم افزار Excel استفاده شد.

نتایج و بحث

در جدول (۱) نتایج حاصل از تجزیه واریانس پیامد سطوح آنتی بیوتیک و زمان بر ویژگی‌های زیستی کلرلا نشان داده شده است. پیامد آنتی-بیوتیک و زمان و پیامد زمان و برهم کنش آن با سطوح آنتی بیوتیک بر تمام ویژگی‌های مورد مطالعه معنی دار بود ($P < 0.01$).

جریان ۱ میلی لیتر در دقیقه استفاده شد. pH فاز متحرک ۳/۳ با استفاده از اسید فسفریک تنظیم شد و طول موج در ۲۷۹ نانومتر برای تشخیص نورفلوکساسین تنظیم شد (Kassab *et al.*, 2005). سینتیک حذف نورفلوکساسین توسط ریزجلبک کلرلا با برازش داده‌ها در مدل درجه اول (رابطه ۵) تجزیه و تحلیل شد (Xiong *et al.*, 2016b).

$$\ln Ct = -Kt + \ln C_0 \quad (\text{رابطه ۵})$$

که در آن C_t غلظت آنتی بیوتیک (mg L^{-1}) در زمان t (d)، C_0 غلظت آنتی بیوتیک (mg L^{-1}) در زمان صفر (d) یا همان غلظت اولیه است. K و t نیز به ترتیب ثابت سرعت حذف (d^{-1}) و طول دوره تجزیه (d) است.

جدول ۱. تجزیه واریانس پیامد سطوح آنتی بیوتیک و زمان بر ویژگی‌های مورد مطالعه

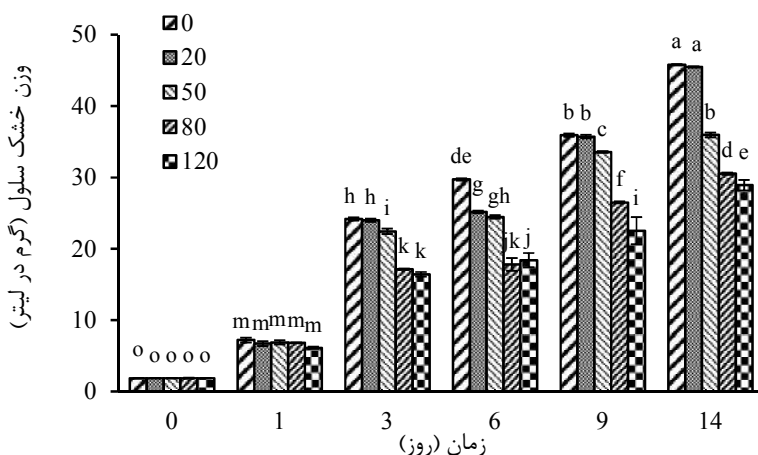
میانگین مربعات							درجه آزادی	منبع تغییرات
نرخ رشد ویژه	کارتنوئید	کلروفیل کل	کلروفیل b	کلروفیل a	رشد سلولی (OD ₆₈₀)	وزن خشک سلول		
۰/۰۲۰۷۸**	۰/۰۱**	۰/۰۱۰**	۰/۱۶**	۶۱/۷۲**	۲/۱۱**	۲۵۳/۵۵**	۴	آنتی بیوتیک (A)
۰/۰۰۱**	۳/۱۹**	۸/۸۶**	۲/۴۰**	۶۹۳/۴۶**	۱۴/۹۱**	۲۷۹۹/۳۷**	۵	زمان (T)
۰/۴۲۲**	۰/۰۰۴**	۰/۰۱۳**	۰/۲۶**	۲۴/۷۱**	۰/۸۲**	۳۳/۱۹**	۲۰	A×T
۰/۰۰۰۷	۰/۰۰۳	۰/۰۰۰۴	۰/۰۱۶	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۲۵	۴۰	خطا
۴/۵۴	۳/۵۷	۲/۴۲	۱۳/۶۸	۰/۸۶۳	۱۱/۵۸	۲/۴۹		ضریب تغییرات

** بیان گر معنی دار بودن در سطح احتمال ۱ درصد است.

لیتر) پس از گذشت ۱۴ روز انکوباسیون بود که ۵۵/۲۳ درصد کمتر از غلظت صفر آنتی بیوتیک در زمان ۱۴ روز بود. اگرچه فلوروکینولون‌ها سبب جلوگیری از همانندسازی DNA می‌شوند اما مقاومت به این نوع آنتی بیوتیک‌ها چند عاملی است و ممکن است با یکی از روش‌ها یا ترکیبی از آن‌ها رخ دهد. این روش‌ها شامل جهش در ژن جایگاه هدف یعنی آنزیم‌های توپوایزومراز II و IV، تولید زیاد پمپ‌های برون ریز، تغییر ساختار آنزیم یا تولید پروتئین‌هایی که از جایگاه هدف حفاظت می‌کنند، می‌باشند. اگرچه در پروکاریوت‌ها DNA gyrase حضور ندارد اما توپوایزومراز IV مسئول جداسدن کروموزوم‌ها است و آنتی بیوتیک می‌تواند در عملکرد آن اختلال ایجاد کند (Redgrave *et al.*, 2014). اما ساختار سلول ریزجلبک بسیار متفاوت از باکتری‌ها است و آنتی بیوتیک ممکن است در همانندسازی کلروپلاست که شبیه پروکاریوت‌ها است اختلال ایجاد کرده و از فتوسنتز جلوگیری کند. همچنین آنتی بیوتیک ممکن است با اختلال در ساخت پروتئین‌های مرتبط و دیگر اجزای مستقل سلول پیامدهای سمی بر رشد ریزجلبک داشته باشد (Liu *et al.*, 2011).

پیامد نورفلوکساسین بر رشد ریزجلبک کلرلا

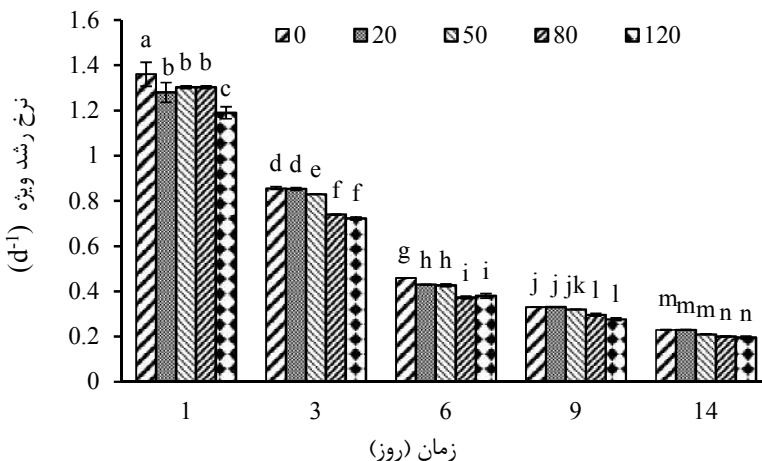
پیامد سطوح مختلف آنتی بیوتیک بر وزن خشک ریزجلبک کلرلا در طول زمان در شکل (۱) نشان داده شده است. در شروع آزمایش و روز اول وزن خشک سلولی ریزجلبک در غلظت‌های مختلف آنتی بیوتیک اختلاف آماری معنی‌داری با هم نداشتند ($P < 0.05$) اما با گذشت زمان پیامد سطوح مختلف آنتی بیوتیک آشکار شد و با وجود این‌که وزن خشک سلولی در همه تیمارها افزایش یافت اما در هر کدام از زمان‌های نمونه‌برداری، با افزایش غلظت آنتی بیوتیک وزن خشک سلول کاهش یافت. در واقع شیب افزایش وزن خشک سلولی با زمان، برای بالاترین غلظت آنتی-بیوتیک از همه کمتر بود. با وجود این‌که وزن خشک سلولی ریزجلبک کلرلا در همه زمان‌ها در شاهد نسبت به تیمار ۲۰ میلی گرم بر لیتر آنتی بیوتیک بالاتر بود، اما در روزهای ۹ و ۱۴ تفاوت آماری معنی‌داری با آن نداشت. به نظر می‌رسد، پس از یک هفته انکوباسیون، جلبک به غلظت کم آنتی بیوتیک (20 mg L^{-1}) سازگار شده و رشد خود را بازیابی کرده است. بیشترین وزن خشک کلرلا در بالاترین غلظت آنتی بیوتیک (۱۲۰ میلی گرم بر



شکل ۱. پیامد سطوح آنتی‌بیوتیک نورفلوکساسین بر وزن خشک سلول در ریز جلبک کلرلا در طول ۱۴ روز انکوباسیون در تمامی شکل‌ها بودن حداقل یک حرف مشترک در روی ستون‌ها نشان‌دهنده نبودن تفاوت آماری معنی‌دار در سطح ۵٪ است. نوارهای خطا انحراف از میانه هستند (تکرار = ۳)

(Xiong *et al.*, 2016b). غلظت مؤثر (EC50) نورفلوکساسین برای ریز جلبک کلرلا ۳۵۵/۹۸، ۳۶۲/۴۷ و ۴۵۳/۷۱ میلی‌گرم بر لیتر به ترتیب در روزهای ۶، ۹ و ۱۴ انکوباسیون بود. در روز ششم در غلظت‌های بالای آنتی‌بیوتیک (۵۰، ۸۰ و ۱۲۰ میلی‌گرم بر لیتر) واکنش کلرلا نسبت به تنش ایجاد شده توسط نورفلوکساسین با مهار شدن سرعت رشد ویژه همراه است که می‌تواند به علت ویژگی اکسیداسیون قوی نورفلوکساسین، در هنگام انباشت بیش از حد در درون سلول‌های کلرلا باشد که خود یک مکانیسم مهار رشد ریز جلبک است و سبب ایجاد آسیب‌های عملکردی و ساختاری به سلول می‌شود. سطوح بالای آنتی‌بیوتیک همچنین می‌تواند انتقال انرژی در میتوکندری‌ها و کلروپلاست جلبک را مختل کند (Vannini *et al.*, 2011).

پیامد سطوح مختلف آنتی‌بیوتیک بر سرعت رشد ویژه ریز جلبک در طول زمان در شکل (۲) نشان داده شده است. سرعت رشد ویژه کلرلا در هر کدام از تیمارهای آنتی‌بیوتیک با افزایش زمان انکوباسیون به طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد. اما سرعت رشد ویژه در تیمارهای ۸۰ و ۱۲۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک تفاوت آماری معنی‌داری نداشت. اگرچه سرعت رشد ویژه بین شاهد و تیمارهای ۲۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک نیز در روزهای ۹ و ۱۴ معنی‌دار نبود، اما به نظر می‌رسد در این تیمارها پیامد آنتی‌بیوتیک‌ها در هفته اول انکوباسیون تفاوت‌هایی را در سرعت ویژه رشد ایجاد کرده باشد. غلظت مؤثر (EC50)، غلظتی است که در آن سرعت رشد یک ارگانیزم بر اثر تنش به ۵۰ درصد حالت بدون تنش برسد. غلظت مؤثر یکی از شاخص‌های مورد قبول برای ارزیابی سمیت یک ماده است

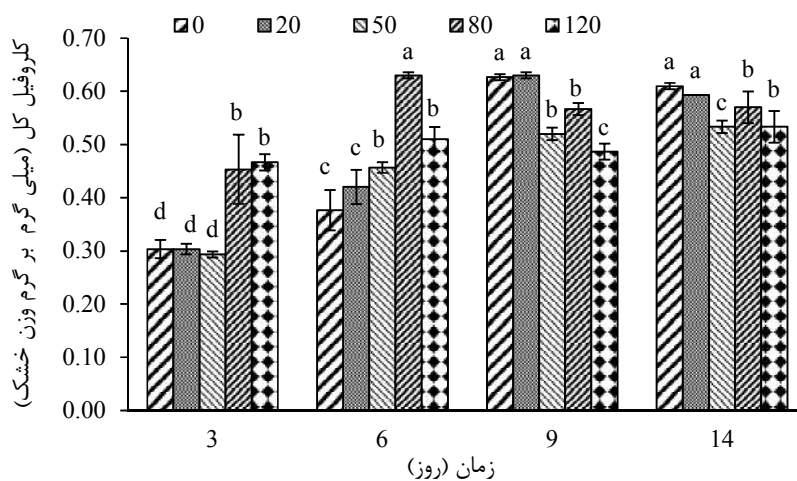


شکل ۲. پیامد سطوح آنتی‌بیوتیک نورفلوکساسین بر سرعت رشد ویژه در ریز جلبک کلرلا در طول ۱۴ روز انکوباسیون

انکوباسیون مقدار کلروفیل کل افزایش یافت اما روند افزایش در شاهد (با شیب ۱۲ درصد) و سپس تیمار دارای ۲۰ میلی گرم بر لیتر آنتی بیوتیک (با شیب ۱۱ درصد) بیشتر از سایر تیمارها بود. کلروفیل یک جز ضروری برای دریافت نور و انتقال انرژی در فتوسنتز است و واکنش‌های فتوسنتزی که شامل واکنش‌های نوری، چرخه کلوین و سنتز نشاسته است را شامل می‌شود. بیوسنتز کلروفیل در جلبک فرآیند پیچیده‌ای است که شامل ۱۶ واکنش کاتالیستی است که در صورت حذف یا کامل انجام نشدن هر کدام از این واکنش‌ها فرآیند تولید کلروفیل با مشکل مواجه می‌شود. مهار رشد جلبک همواره در اثر قرار گرفتن در معرض ترکیب‌های سمی با تغییر متابولیسم کلروفیل همراه است (Nie *et al.*, 2008). افزایش محتوای کلروفیل در سلول‌ها می‌تواند به عنوان یک مکانیسم حفاظتی برای از بین بردن گونه‌های واکنش‌پذیر با اکسیژن در کلروپلاست باشد. کاهش رنگدانه‌های فتوسنتزی نیز یک واکنش رایج در شرایط تنش در جلبک‌ها است که می‌تواند به وسیله پراکسیداسیون چربی‌های تیلکوئید و تخریب کمپلکس‌های فتوسیستم دو (PSII) ایجاد شود. منظور از کمپلکس PSII نخستین پروتئین پیچیده‌ای است که در واکنش‌های فتوسنتز وابسته به اکسیژن در غشای تیلکوئید گیاهان، جلبک‌ها و سیانو باکترها قرار دارد (Xiong *et al.*, 2016c).

پیامد نورفلوکساسین بر ویژگی‌های بیوشیمیایی ریزجلبک کلرلا

پیامد سطوح مختلف آنتی بیوتیک در طول زمان بر مقدار کلروفیل کل در ریزجلبک کلرلا در شکل (۳) نشان داده شده است. به طور کلی با گذشت زمان مقدار کلروفیل کل افزایش یافت. مقدار کلروفیل کل در روز سوم انکوباسیون در غلظت‌های صفر، ۲۰ و ۵۰ میلی گرم بر لیتر آنتی بیوتیک اختلاف آماری معنی‌داری را نشان نداد. به عبارتی غلظت پایین آنتی بیوتیک نورفلوکساسین بر مقدار کلروفیل کل تأثیری نداشت. از سویی، مقدار کلروفیل کل در این روز در دو تیمار دارای ۸۰ و ۱۲۰ میلی گرم بر لیتر آنتی بیوتیک به طور معنی‌داری بیشتر از سه تیمار دیگر بود که البته این روند در روز ششم انکوباسیون هم تکرار شده است. به نظر می‌رسد در هفته اول غلظت‌های بالای آنتی بیوتیک پیامد محرک رشد داشته و احتمالاً جلبک با زیاد کردن رشد و محتوای کلروفیل خود سعی کرده پیامد آنتی بیوتیک را کاهش دهد. اما با گذشت زمان، پیامد منفی آنتی بیوتیک آشکار شده است به طوری که بالاترین مقدار کلروفیل کل در روزهای ۹ و ۱۴ انکوباسیون و به ترتیب در سطوح ۲۰ و صفر میلی گرم بر لیتر آنتی بیوتیک ثبت شد که البته اگرچه تفاوت آماری بین آن‌ها معنی‌دار نبود اما می‌تواند نشان از تأثیر زمانی آنتی بیوتیک بر مقدار کلروفیل کل جلبک باشد. در تمامی سطوح آنتی بیوتیک با افزایش زمان



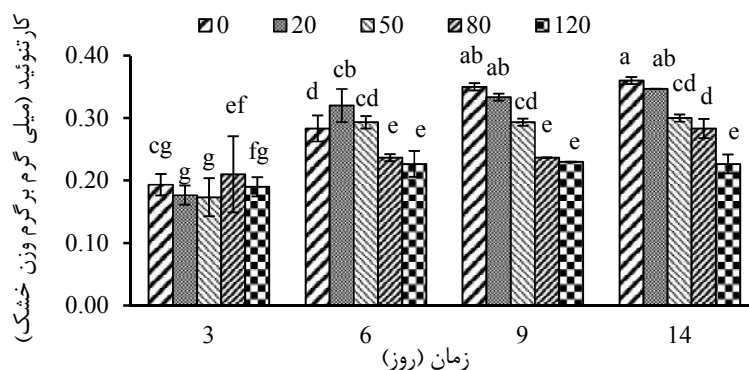
شکل ۳. پیامد سطوح آنتی بیوتیک نورفلوکساسین بر محتوای کلروفیل کل در ریزجلبک کلرلا در طول ۱۴ روز انکوباسیون

(۵۰، ۸۰ و ۱۲۰ میلی گرم بر لیتر) نسبت به غلظت‌های صفر و ۲۰ میلی گرم بر لیتر آنتی بیوتیک اختلاف کاهشی معنی‌داری داشت. اما در غلظت صفر و ۲۰ میلی گرم بر لیتر نورفلوکساسین اختلاف معنی‌داری دیده نشد. همانند کلروفیل کل، محتوای کارتنوئید نیز در غلظت‌های نسبتاً بالای نورفلوکساسین با گذشت

پیامد سطوح مختلف آنتی بیوتیک در طول زمان بر مقدار کارتنوئید در ریزجلبک کلرلا در شکل (۴) نشان داده شده است. مقدار کارتنوئید در کلرلا در تمام غلظت‌های آنتی بیوتیک نورفلوکساسین، با گذشت زمان افزایش معنی‌داری را نشان داد. مقدار کارتنوئید در پایان ۱۴ روز انکوباسیون در غلظت‌های بالاتر

سمی، محافظت شود (Xiong et al., 2016b). علاوه بر این، کاروتنوئیدها می‌توانند رادیکال‌های آزاد تولیدشده در سلول‌های تحت تنش را خنثی کنند، در نتیجه به عنوان یک مکانیسم حفاظتی برای سیستم فتوسنتزی و رشد جلبک عمل می‌کنند (Xiong et al., 2016a). ریزجلبک‌ها دارای مکانیسم‌های حفاظتی نظیر افزایش رنگدانه‌های فتوسنتزی، کارتنوئید و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی هستند که کمک می‌کنند تا گونه‌ها در مقابل تنش‌های ناشی از آلاینده‌ها محافظت شوند (Wan et al., 2014).

زمان افزایش یافت اما روند افزایش نسبت به تیمار شاهد کمتر بود که نشان‌دهنده پیامدهای سمی نورفلوکساسین بر متابولیسم ریزجلبک کلرلا است. شیب افزایش غلظت کارتنوئید با زمان به ترتیب در غلظت‌های صفر، ۲۰، ۵۰، ۸۰ و ۱۲۰ میلی‌گرم بر لیتر، ۶، ۵، ۴، ۲ و ۱ درصد بود. کارتنوئیدها می‌توانند افزایش کلروفیل ناشی از تنش را غیرفعال کنند تا از سیستم فتوسنتزی در برابر آسیب‌های ناشی از اثر شکل‌گیری گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر در معرض تابش بالا، دمای پایین، شوری و جذب آلودگی‌های

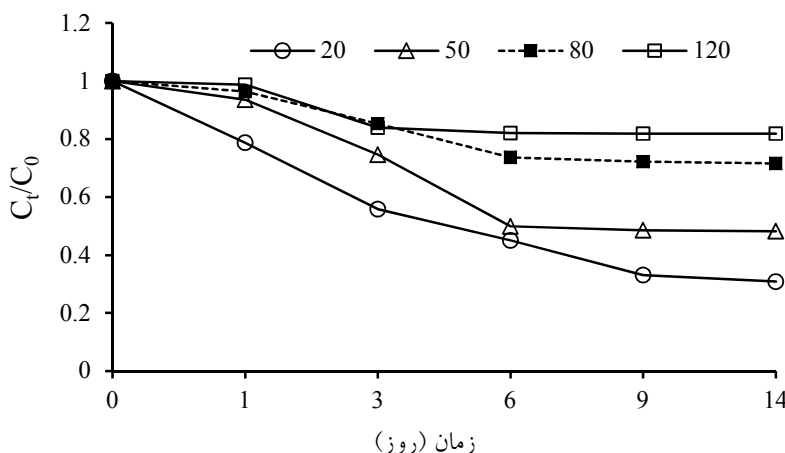


شکل ۴. پیامد سطوح آنتی‌بیوتیک نورفلوکساسین بر محتوای کارتنوئید در ریزجلبک کلرلا در طول ۱۴ روز انکوباسیون

کوتاه‌تری ایجاد شده و شیب نمودار صفر شده است. به طوری که در غلظت ۱۲۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک پس از ۳ روز و در غلظت ۸۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر پس از ۶ روز نسبت غلظت آنتی‌بیوتیک باقی‌مانده در محیط کشت به غلظت اولیه آن ثابت شده است. اما پس از گذشت دو هفته از انکوباسیون، روند کاهش غلظت آنتی‌بیوتیک در تیمار ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر همچنان کاهش می‌یابد.

حذف نورفلوکساسین توسط ریزجلبک کلرلا

سینتیک حذف غلظت‌های مختلف آنتی‌بیوتیک توسط ریزجلبک کلرلا در طول زمان انکوباسیون در شکل (۵) نشان داده شده است. کلرلا توانست به ترتیب ۶۹/۱۵، ۵۱/۷۸، ۲۸/۴۱ و ۱۸/۱۸ درصد از آنتی‌بیوتیک نورفلوکساسین را در غلظت‌های ۲۰، ۵۰، ۸۰ و ۱۲۰ میلی‌گرم بر لیتر، حذف کند. روند نمودارها نشان می‌دهند که با بالا رفتن غلظت آنتی‌بیوتیک، تعادل در زمان



شکل ۵. سینتیک حذف غلظت‌های مختلف آنتی‌بیوتیک توسط ریزجلبک کلرلا در طول ۱۴ روز انکوباسیون

نتیجه گیری

رشد ریزجلبک کلرلا در طول ۱۴ روز انجام آزمایش در غلظت پایین نورفلوکساسین (۲۰ میلی گرم بر لیتر) به مقدار اندکی تحت تأثیر قرار گرفت اما با افزایش غلظت آنتی بیوتیک (۵۰، ۸۰ و ۱۲۰ میلی گرم بر لیتر) به طور چشم گیری کاهش یافت. اگرچه غلظت های بالای آنتی بیوتیک سبب کاهش رشد و فعالیت ریزجلبک شد ولی غلظت آنتی بیوتیک در محیط نیز کم شد که در واقع هدف اصلی این پژوهش بوده است. افزایش محتوای کلروفیل و کارتنوئید در ریزجلبک کلرلا با افزایش دوره انکوباسیون نشان دهنده این است که مکانیسم های دفاعی بر علیه تنش حاصل از نورفلوکساسین توسط کلرلا ایجاد می شود. کلرلا می تواند در غلظت های بالا در مدت زمان کمتر و در غلظت های پایین به صورت پیوسته و در مدت زمان بیشتر آنتی بیوتیک نورفلوکساسین را از محلول آلوده حذف کند و بنابراین می تواند به عنوان یک کاندید مؤثر برای زیست پالایی پساب های آلوده مورد ارزیابی و استفاده قرار گیرد.

ریزجلبک ها به دلیل سیستم های کاتابولیک درونی و نقشی که در تثبیت و گردش کربن دارند می توانند به عنوان یک مخزن برای حذف آنتی بیوتیک عمل کنند (Wilta et al., 2016). حذف آنتی بیوتیک توسط عوامل غیرزیستی از طریق محیط کشت کنترل بدون ریزجلبک کلرلا نیز ارزیابی شد. غلظت های باقی مانده آنتی بیوتیک در کنترل غیرزیستی هیچ تغییری را در طول ۱۴ روز انکوباسیون نشان نداد. این شواهد تأیید می کند که عامل اصلی حذف آنتی بیوتیک، ریزجلبک کلرلا بوده است. این ریزجلبک می تواند از راه مکانیسم های تجزیه زیستی، تجمع زیستی و جذب سطحی زیستی آنتی بیوتیک ها را حذف کند (Xiong et al., 2016c). مکانیسم سازگاری کلرلا می تواند به دلیل افزایش رنگدانه های زانتوفیل، عمدتاً زی زانتین باشد که به عنوان یک آنتی اکسیدان عامل پایدارکننده غشا عمل می کند (Grudzinski et al., 2016). نتایج حاصل از مدل سینتیکی نیز نشان داد که حذف نورفلوکساسین از مدل درجه اول پیروی می کند ($R^2=0.98$) و ثابت های سرعت حذف (K) در محدوده 0.143 تا $0.084 d^{-1}$ بعد از ۱۴ روز انکوباسیون قرار داشتند.

REFERENCES

- Benotti, M.J., Trenholm, A.R., Vanderford, B.J., Holaday, J.C., Stanford, B.D. and Snyder, S.A. (2009). Pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in US drinking water. *Journal of Environmental Science and Technology*, 43, 597-603.
- Carrera, D., Sanz, A., Rodas, V. and Costas, E. (2011). Adaptation of microalgae to a gradient of continuous petroleum contamination. *Journal of Aquatic Toxicology*, 101, 342-350.
- Chen, J., Zheng, F. and Guo, R. (2015). Algal feedback and removal efficiency in a sequencing batch reactor algae process (SBAR) to treat the antibiotic cefradine. *Plos One*, 10, 1-11.
- Doorslaer, X.V., Dewulf, J., Langenhove, H.V. and Demeestere, K. (2014). Fluoroquinolone antibiotics an emerging class of environmental micropollutants. *Journal of Science of the Total Environment*, 500-501, 250-269.
- Gaffney, V.D.J., Almeida, C.M.M., Rodrigues, A., Ferreirac, E., Benoliel, M.J. and Cardoso, V.V. (2015). Occurrence of pharmaceuticals in a water supply system and related human health risk assessment. *Journal of Water Research*, 72, 199-208.
- Gao, Q.T., Wong, Y.S. and Tam, N.F.Y. (2011). Removal and biodegradation of nonylphenol by different *Chlorella* species. *Journal of Marine Pollution Bulletin*, 63, 445-451.
- Gimeno, O., Araya, J.F., Beltran, F.J., Rivas, F.J. and Espejo, A. (2016). Removal of emerging contaminants from a primary effluent of municipal wastewater by means of sequential biological degradation solar photocatalytic oxidation processes. *Journal of Chemical Engineering*, 290, 12-20.
- Grudzinski, W., Krzeminska, I., Luchowski, R., Nosalewicz, A. and Gruszecki, W.I. (2016). Strong light induced yellowing of green microalgae *Chlorella* a study on molecular mechanisms of the acclimation response. *Journal of Algal Research*, 16, 245-254.
- Ji, M.K., Kabra, A.N., Choi, J., Hwang, J.H., Kim, J.R., Abou-Shanab, R.A.I., Oh, Y.K. and Jeon, B.H. (2014). Biodegradation of bisphenol A by the freshwater microalgae *Chlamydomonas mexicana* and *Chlorella vulgaris*. *Ecological engineering*, 73, 260-269.
- Kassab, N.M., and Singh, A.K., Hackmam, Kedor-Hackmam, E.R.M. and Miritello Santoro, M.I.R. (2005). Quantitative determination of ciprofloxacin and norfloxacin in pharmaceutical preparations by high performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 41, 507-511.
- Kurade, M.B., Kim, J.R., Govindwar, S. and Jeon, B.H. (2016). Insights into microalgae mediated biodegradation of diazinon by *Chlorella vulgaris*: microalgal tolerance to xenobiotic pollutants and metabolism. *Journal of Algal Research*, 20, 126-134.
- Lee, R.E. (2008). Phycology (4th ed.). USA Colorado

- State University. Cambridge University Press. 5-14.
- Lindsey, M.E., Meyer, M. and Thurman, E.M. (2001). Analysis of trace levels of sulfonamide and tetracycline antimicrobials in groundwater and surface water using solid phase extraction and liquid chromatography mass spectrometry. *Journal of Analytical Chemistry*, 73, 4640–4646.
- Liu, B.Y., Nie, X.P., Liu, W.Q., Snoeijs, P., Guan, C. and Tsui, M.T. (2011). Toxic effects of erythromycin, ciprofloxacin and sulfamethoxazole on photosynthetic apparatus in *Selenastrum capricornutum*. *Ecotoxicology. Journal of Environmental Safety*, 74, 1027-1035.
- Mehta, S.K. and Gaur, J.P. (2005). Use of algae for removing heavy metal ions from wastewater progress and prospects. *Journal of Critical Reviews in Biotechnology*, 25, 113–152.
- Nie, X., Xiang, W., Chen, J., Vladimir, Z. and An, T. (2008). Response of the freshwater alga *Chlorella vulgaris* to trichloroisocyanuric acid and ciprofloxacin. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27, 168–173.
- Pancha, I., Chokshi, K., Maurya, R.K., Trivedi, K., Patidar, S.K., Ghosh, A. and Mishra, S. (2015). Salinity induced oxidative stress enhanced biofuel production potential of microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. *Journal of Bioresource Technology*, 189, 341-348.
- Perretin, V., Schwarz, F., Cresta, L., Boeglin, M., Dasen, G. and Teubner, M. (1997). Antibiotics resistance spread in food. *Journal of Nature*, 839, 801-802.
- Redgrave, L.S., Sutton, S.B., Webber, M.A., and Piddock, J.V. (2014). Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends in Microbiology*. 22(8), 438-445.
- Rodvold, K.A. and Neuhauser, M. (2001). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of fluoroquinolones. *Pharmacotherapy*, 21, 233S-252S.
- Schröder, P., Harvey, P.J. and Schwitzguébel, J.P. (2002). Prospects for the phytoremediation of organic pollutants in Europe. *Journal of Environmental Science and Pollution Research*, 9, 1–3.
- Schwarzenbach, R.P., Escher, B.I., Fenner, K., Hofstetter, T.B., Johnson, C.A., Gunten, U. and Wehrli, B. (2006). The challenge of micropollutants in aquatic systems. *Journal of Science*, 313, 1072-1077.
- Thiele-bruhn, S. (2005). Microbial inhibition by pharmaceutical antibiotics in different soils-dose-response relations determined with the iron(III) reduction test. *Journal of Environmental Toxicology and Chemistry*, 24, 869-876.
- Vannini, C., Domingo, G., Marsoni, M., Mattia, F.D., Labra, M., Castiglioni, S. and Bracale, M. (2011). Effects of a complex mixture of therapeutic drugs on unicellular algae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Journal of Aquatic Toxicology*, 101, 459–465.
- Wan, J., Guo, P. and Zhang, S. (2014). Response of the cyanobacterium *Microcystis flos aquae* to levofloxacin. *Journal of Environ Environmental Science and Pollution Research*, 21, 3858–3865.
- WHO. (2002). Overcoming antibiotic resistance World Health Organization report in infectious diseases. WHO Genera. Fact sheet No.268.
- Wilta, A., Butkovskiy, A., Tuantet, K., Leal, L.H., Fernandes, T.V., Langenhoff, A. and Zeeman, G. (2016). Micropollutant removal in an algal treatment system fed with source separated wastewater streams. *Journal of Hazardous Materials*, 304, 84–92.
- Wise, R. (2002). Antimicrobial resistance priorities for action. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49, 585-586.
- Xiong, J.Q., Kurade, M.B. and Jeon, B.H. (2016c). Biodegradation of levofloxacin by an acclimated freshwater microalga *Chlorella vulgaris*. *Journal of Chemical Engineering*, 313, 1251-1257.
- Xiong, J.Q., Kurade, M.B., Kim, J.R., Roh, H.S. and Jeon, B.H. (2016b). Ciprofloxacin toxicity and its co-metabolic removal by a freshwater microalga *Chlamydomonas mexicana*. *Journal of Hazardous Materials*, 323, 212-219.
- Xiong, J.Q., Kurade, M.B., Shanab, R.A.I., Ji, M.K., Choi, J., Kim, J.O. and Jeon, B.H. (2016a). Biodegradation of carbamazepine using freshwater microalgae *Chlamydomonas mexicana* and *Scenedesmus obliquus* and the determination of its metabolic fate. *Journal of Bioresource Technology*, 205, 183-190.