University of Tehran

Journal of Fisheries

Home Page: https://jfisheries.ut.ac.ir

Online ISSN: 2423-7809

The effect of oxytetracycline, neomycin sulfate and fluorophenicol antibiotics on growth and pigments contents of microalgae *Chlorella vulgaris*

Omidvar Farhadian[1*] | Niloofar Nozarpour[2] | Safiollah Heidari[3] | Mobina Ahadifar[4]

1. Corresponding author, Department of Natural Resources, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran. Email: omfarhad@cc.iut.ac.ir
2. Department of Natural Resources, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran. Email: niloofarnozarpour@gmail.com
3. Department of Natural Resources, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran. Email: safiollah_heidari@yahoo.com
4. Department of Natural Resources, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran. Email: mobinaahadifar180@gmail.com

ARTICLE INFO

Article type:
Research Article

Article History:
Received: 17 September 2024
Revised: 13 October 2024
Accepted: 24 October 2024
Published online: 20 December 2024

Keywords:
Antibiotic,
Chlorella vulgaris,
Pigments,
Specific growth rate.

ABSTRACT

The spread of antibiotics and their continued release into aquatic environments has adverse effects on non-target aquatic organisms such as phytoplankton. The aim of this study was to investigate the effect of three antibiotics, oxytetracycline, neomycin sulfate and fluorophenicol on the freshwater microalga *Chlorella vulgaris* in the laboratory conditions. In order to examin different concentrations of 0, 0.005, 0.05, 0.5, 5 and 50 mg/L of oxytetracycline, neomycin sulfate and fluorophenicol antibiotics on the size population, specific growth rate and pigments were studied. The results showed that there is a correlation between the type and concentration of antibiotics on different algae growth indices. Increasing the concentration of oxytetracycline led to an increase in cell density compared to the control treatment, but no significant difference was observed in specific growth rate and chlorophyll *a*, *b* and carotenoid levels (P>0.05). Low concentrations of the neomycin sulfate (0.005 and 0.05 mg /L) did not show a significant difference with the control treatment (P>0.05), while at higher concentrations (0.5, 5 and 50 mg/L) significant decrease in density and specific growth rates was observed compared to the control (P<0.05). In fluorophenicol, except for the 0.05 mg/L treatment, which resulted in a slight increase in cell density, specific growth and chlorophyll a value compared to the control treatment, there was no significant difference between the other treatments (P>0/05). This study showed that the response of *C. vulgaris* to the examined antibiotics is rapid, inexpensive and easily measurable; therefore, *C. vulgaris* can be used for antibiotics effects in aquatic environments.

Cite this article: Farhadian, O., Nozarpour, N., Heidari, S., Ahadifar, M. (2024). The effect of oxytetracycline, neomycin sulfate and fluorophenicol antibiotics on growth and pigments contents of microalgae *Chlorella vulgaris*. *Journal of Fisheries*, 77 (4), 297-312. DOI: http//doi.org/10.22059/jfisheries.2024.381183.1441

© The Author(s) **Publisher:** University of Tehran Press.
DOI: http//doi.org/10.22059/jfisheries.2024.381183.1441

دانشگاه تهران

شیلات، مجله منابع طبیعی ایران

سایت نشریه: https://jfisheries.ut.ac.ir

شاپا الکترونیکی: ۷۸۰۹-۲۴۲۳

اثر آنتی‌بیوتیک‌های اکسی‌تتراسایکلین، نئومایسین‌سولفات و فلورفنیکل بر رشد و محتوای رنگدانه‌های ریزجلبک *Chlorella vulgaris*

امیدوار فرهادیان[۱*] | نیلوفر نوذرپور[۲] | صفی‌اله حیدری[۳] | مبینا احدی‌فر[۴]

۱. نویسنده مسئول، گروه شیلات، دانشکدهٔ منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران. رایانامه: omfarhad@cc.iut.ac.ir

۲. گروه شیلات، دانشکدهٔ منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران. رایانامه: niloofarnozarpour@gmail.com

۳. گروه شیلات، دانشکدهٔ منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران. رایانامه: safiollah_heidari@yahoo.com

۴. گروه شیلات، دانشکدهٔ منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران. رایانامه: mobinaahadifar180@gmail.com

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
پژوهشی

تاریخ‌های مقاله:
تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۶/۲۷
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۷/۲۲
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۸/۰۳
تاریخ انتشار: ۱۴۰۳/۰۹/۳۰

کلیدواژه:
آنتی‌بیوتیک،
Chlorella vulgaris،
رنگدانه‌ها،
میزان رشد ویژه.

چکیده

انتشار مداوم آنتی‌بیوتیک‌ها در محیط‌های آبی اثرهای نامطلوبی بر موجودات آبزی غیرهدف مانند فیتوپلانکتون‌ها دارد. هدف از این تحقیق بررسی تأثیر سه آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین، نئومایسین‌سولفات و فلورفنیکل بر ریزجلبک آب شیرین *Chlorella vulgaris* در شرایط آزمایشگاهی بود. به‌منظور انجام آزمایش غلظت‌های مختلف صفر، ۰/۰۰۵، ۰/۰۵، ۰/۵، ۵ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر از آنتی‌بیوتیک‌های اکسی‌تتراسایکلین، نئومایسین‌سولفات و فلورفنیکل بر اندازهٔ جمعیت، میزان رشد ویژه و محتوای رنگدانه‌ها بررسی گردید. نتایج نشان داد که اثرهای آنتی‌بیوتیک‌ها بسته به نوع آنتی‌بیوتیک و غلظت‌های آنها تفاوت دارد. افزایش غلظت آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین منجر به افزایش مقادیر تراکم سلولی نسبت به تیمار شاهد شد، ولی تفاوت معنی‌داری در میزان رشد ویژه و میزان کلروفیل‌های *a*، *b* و کاروتنوئید مشاهده نشد ($P>0/05$). غلظت‌های کم آنتی‌بیوتیک نئومایسین‌سولفات (۰/۰۰۵ و ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر) تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد نشان نداد ($P>0/05$)، درحالی‌که در غلظت‌های زیادتر (۰/۵، ۵ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر) کاهش معنی‌داری در تراکم، میزان رشد ویژه و کاروتنوئیدها نسبت به تیمار شاهد مشاهده شد ($P<0/05$). در آنتی‌بیوتیک فلورفنیکل به‌جز تیمار ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر که منجر به افزایش جزئی در مقادیر تراکم سلولی، رشد ویژه و میزان کلروفیل *a* نسبت به تیمار شاهد شد، سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری نداشتند ($P>0/05$). این مطالعه نشان داد که واکنش جلبک *C. vulgaris* به آنتی‌بیوتیک‌های آزمایشی متداول در آبزی‌پروری سریع، کم‌هزینه و به‌راحتی قابل‌اندازه‌گیری است، بنابراین می‌توان از جلبک‌های تک‌سلولی مانند *C. vulgaris* برای بررسی اثرهای آنتی‌بیوتیک‌ها در محیط‌های آبی استفاده نمود.

استناد: فرهادیان، امیدوار؛ نوذرپور، نیلوفر؛ حیدری، صفی‌اله؛ احدی‌فر، مبینا (۱۴۰۳). اثر آنتی‌بیوتیک‌های اکسی‌تتراسایکلین، نئومایسین‌سولفات و فلورفنیکل بر رشد و محتوای رنگدانه‌های ریزجلبک *Chlorella vulgaris*. *نشریهٔ شیلات، مجله منابع طبیعی ایران*، ۷۷ (۴)، ۳۱۲-۲۹۷.
DOI:http//doi.org/10.22059/jfisheries.2024.381183.1441

© نویسندگان.
ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.
DOI: http//doi.org/10.22059/jfisheries.2024.381183.1441

۱. مقدمه

پلانکتون‌ها از مهم‌ترین موجودات زندهٔ استخرهای پرورش ماهی هستند، زیرا میزان تولید ماهیان پرورشی به میزان تولید پلانکتون بستگی دارد. پلانکتون‌ها را به‌عنوان شاخص سلامت آب و محیط استفاده می‌کنند، زیرا دارای طول عمر کوتاهی هستند و در برابر تغییرات محیطی حساسیت زیادی دارند (Belinger and Sigee, 2015). ریزجلبک‌ها دستهٔ مهم از پلانکتون‌ها هستند که منبع نویدبخشی برای فناوری زیستی آبزیان محسوب می‌شوند. به‌دلیل سرعت رشد و نیاز تغذیه‌ای معمولاً سادهٔ آن‌ها، بسیاری از ترکیبات با ارزش مانند رنگدانه‌ها، لیپیدها، پروتئین‌ها، پلی‌ساکاریدها، ویتامین‌ها و مواد معدنی می‌توانند از ریزجلبک‌ها استخراج شوند (Seoane *et al*., 2014; Baicha *et al*., 2016). ریزجلبک‌ها به‌علت ساختار اولیه و فعالیت متابولیکی مختلف اهمیت بیشتری نسبت به گیاهان دارند. همچنین به‌دلیل توانایی جذب مواد معدنی و آلی از محیط آبی و تولید انبوه زیست‌توده مورد توجه هستند (Abdo *et al*., 2015).

کلرلا ولگاریس ریزجلبک سبز تک‌سلولی است که در سراسر محیط‌های آبی جهان یافت می‌شود و نقش حیاتی در اکوسیستم آبی و زمینی ایفا می‌کند، همچنین این جلبک یک گونهٔ با ارزش در تحقیقات سم‌شناسی محیط‌زیست است. کلرلا ولگاریس یک سلول میکروسکوپی با قطری برابر ۱۰-۲ میکرومتر است که متعلق به شاخهٔ Chlorophyta است. جلبک کلرلا به‌دلیل نرخ رشد زیاد، مقاومت نسبت به تغییرات محیطی و دستکاری در سیستم‌های پرورشی، سرعت جذب مواد مغذی از جمله فسفات و نیترات و همچنین فناوری مقرون‌به‌صرفه و تولید آسان، اهمیت دارد (Belinger and Sigee, 2015; Khalaji *et al*., 2019). امروزه آلاینده‌های نوظهور با انواعی از ترکیب‌های شیمیایی و بدون هیچ نظارتی در محیط‌زیست رها می‌شوند و بر سلامت انسان اثر می‌گذارند. فعالیت‌های صنعتی، بیمارستانی و فاضلاب‌هایی که به محیط طبیعی وارد می‌شوند از این قبیل موارد هستند (Schwarzenbach, 2006). یکی از مهم‌ترین آلاینده‌ها به محیط‌های آبی، آنتی‌بیوتیک‌ها هستند که در این گروه جای دارند (Wise, 2002). در نتیجهٔ فعالیت‌های آبزی‌پروری، فاضلاب‌ها و آب‌های خروجی از مزارع پرورش آبزیان دارای ترکیبات پیچیده‌ای از آنتی‌بیوتیک‌ها، مواد بیهوشی و مواد ضدعفونی‌کننده هستند. از سوی دیگر، بیماری‌های عفونی عامل اصلی زیان‌های اقتصادی در آبزی‌پروری اند و در حال تبدیل‌شدن به عامل محدودکننده در توسعهٔ آبزی‌پروری هستند (Falaise *et al*., 2016). آنتی‌بیوتیک‌ها به‌دلیل فعالیت ضد میکروبی در طیف گسترده می‌توانند باعث کنترل بسیاری از بیماری‌های انسان و سایر موجودات زنده شوند (Song *et al*., 2019). بنابراین آنتی‌بیوتیک‌ها برای جلوگیری از گسترش باکتری‌ها ضرورت دارند. این داروها به‌علت انتشار مداوم در محیط و حضور دائمی آنها به‌عنوان آلاینده‌های شبه‌مقاوم مطرح شده‌اند. وجود آنتی‌بیوتیک در محیط‌زیست ممکن است اثرهای مخربی روی موجودات آبزی غیرهدف مانند ریزجلبک‌ها داشته باشد (Falaise *et al*., 2016).

اکسی‌تتراسایکلین یک آنتی‌بیوتیک باکتریواستاتیک است که در آبزی‌پروری به‌طور گسترده‌ای استفاده می‌شوند. این آنتی‌بیوتیک بعد از انتقال فعال به درون باکتری، به‌صورت برگشت‌پذیر به زیر واحد S۳۰ ریبوزوم باکتری متصل شده و باعث مهار سنتز پروتئین توسط باکتری می‌گردد. نیمه‌عمر اکسی‌تتراسایکلین ۶ تا ۱۲ ساعت است. آنتی‌بیوتیک قابل استفادهٔ دیگر در آبزی‌پروری فلورفنیکل است. فلورفنیکل یک آنتی‌بیوتیک سنتتیک با طیف وسیع از گروه فنیکل‌ها است که بر گروه وسیعی از باکتری‌های گرم‌مثبت و گرم‌منفی مؤثر است. این آنتی‌بیوتیک باکتریواستاتیک با اتصال به ریبوزوم‌های باکتری‌های حساس موجب مهار آنزیم پپتیدیل ترانسفراز می‌شود، درنتیجه باعث توقف انتقال اسیدهای آمینه به زنجیره‌های پپتیدی در حال شکل‌گیری می‌گردد. نئومایسین‌سولفات یک باکتریوسید است که مانع سنتز پروتئین در باکتری می‌شود و از این طریق موجب مرگ باکتری‌های در حال رشد و تقسیم می‌گردد، نیمه‌عمر دارو ۲ تا ۳ ساعت است (Katzung, 2017).

Geiger و همکاران (۲۰۱۶) به بررسی اثرهای تتراسایکلین و محصولات آنهیدروتتراسایکلین و اپی‌تتراسایکلین هیدروکلراید بر رشد، ساختار سلولی و استرس اکسیداتیو سلول جلبکی *Chlorella vulgaris* پرداختند. در مطالعه‌ای که توسط Botelho و همکاران (۲۰۱۵) صورت گرفت میزان سمیت حاد اکسی‌تتراسایکلین و فلورفنیکل در رشد، بازدارندگی و مرگ جلبک سبز *Tetraselmis chuii* و سخت‌پوست *Artemia parthenogenetica* بررسی شد. در مطالعه‌ای Fu و همکاران (۲۰۱۷) به بررسی سمیت مقادیر اضافی آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در جلبک آب شیرین *Pseudokirchneriella subcapitata* پرداختند.

مطالعات Taskan (۲۰۱۶) اثرات ترکیبی آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین روی عکس‌العمل زیستی در غلظت‌های ۰/۲۵ تا ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر با در نظر گرفتن بازدارندگی رشد جلبک، نرخ حذف کربن و مواد مغذی و تغییرات جوامع جلبک یوکاریوتی و سیانوباکترها را مورد بررسی قرار داد. مطالعات انجام‌شده توسط Seoane و همکاران (۲۰۱۴) در مورد بررسی سمیت آنتی‌بیوتیک‌های کلرآمفنیکل، فلورفنیکل و اکسی‌تتراسایکلین روی ریزجلبک *Tetraselmis suecica* نشان داد که این جلبک به آنتی‌بیوتیک‌های مورد نظر حساس است.

از آنجا که آگاهی از نحوهٔ تأثیرگذاری آنتی‌بیوتیک‌ها بر جلبک‌های آب شیرین می‌تواند اطلاعات بسیار مفیدی در خصوص مکانیزم‌های سلولی و پاسخ‌های فیزیولوژیک ناشی از اثر آنتی‌بیوتیک‌ها بر جلبک‌ها در محیط‌های آبی در اختیار محققین قرار دهد. در این پژوهش اثر غلظت‌های متفاوت آنتی‌بیوتیک‌های اکسی‌تتراسایکلین، نئومایسین‌سولفات و فلورفنیکل در آبزی‌پروری بر جلبک کلرلا (*C. vulgaris*) با تأکید بر برخی عوامل زیستی از قبیل رشد، میزان رشد ویژه و محتوای رنگدانه‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

۲. روش‌شناسی پژوهش

۲-۱. جمع‌آوری و خالص‌سازی جلبک *C. vulgaris*

جمع‌آوری جلبک *C. vulgaris* از آب استخرهای خاکی کارگاه پرورش ماهی کرسگان در استان اصفهان صورت گرفت. جلبک کلرلا پس از مشاهده با میکروسکوپ اینورت (مدل CETI، ساخت بلژیک) به کمک کلیدهای موجود شناسایی شد (Belinger and Sigee, 2015) و به روش Lavens و Sorgeloos (۱۹۹۶) با کشت روی آگار خالص‌سازی گردید. بعد از کشت‌های متوالی در لولهٔ آزمایش ۲۰ میلی‌لیتری و ارلن‌مایرهای ۲۵۰ میلی‌لیتری و اطمینان از خالص بودن جلبک، پرورش جلبک در ارلن‌مایرهای دو لیتری با محیط‌کشت مناسب BBM انجام گردید تا ذخیرهٔ اولیه یا استوک جلبک کلرلا جهت انجام آزمایش فراهم شود (Lavens and Sorgeloos, 1996). برای کشت جلبک، دو لیتر آب‌مقطر در ارلن‌مایرهای شیشه‌ای ریخته شد و به آن مقدار ۲۶ میلی‌لیتر محیط‌کشت BBM اضافه شد. در مرحلهٔ بعد ظروف حاوی محیط کشت جلبک به‌همراه لوله‌های هوادهی و پنبه‌های کتانی مورد نیاز در دمای ۱۲۱ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ دقیقه در دستگاه اتوکلاو (مدل A۱۲۱، ساخت ایران) ضدعفونی و استریل گردید. پس از اتمام اتوکلاو و هم‌دما شدن با دمای آزمایشگاه، محلول ویتامین B (بیوتین و B12) طبق دستورالعمل اختصاصی کشت به ظرف کشت اضافه گردید و سپس با رعایت شرایط استریل، هم زده شد. ۲۰۰ میلی‌لیتر از ذخیرهٔ جلبک کلرلا (با غلظت 10^5 سلول در میلی‌لیتر) به محیط‌کشت دارای ویتامین اضافه گردید و در دمای ۲۲ درجهٔ سانتی‌گراد و شدت نور ۶۰ میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه و در پروتکل نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی قرار داده شد (Nichols, 1973).

۲-۲. نحوهٔ انجام آزمایش

به‌منظور تهیهٔ غلظت‌های صفر، ۰/۰۰۵، ۰/۰۵، ۰/۵، ۵ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر از هر یک از آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین، نئومایسین‌سولفات و فلورفنیکل، آنتی‌بیوتیک‌های مذکور از مرکز خدمات دامپزشکی تهیه شد. ابتدا با توجه به درصد خلوص هر یک از آنتی‌بیوتیک‌ها (تتراسایکلین ۲۰درصد، نئومایسین‌سولفات ۲۰درصد و فلورفنیکل ۱۰درصد) مقدار ماده مؤثرهٔ لازم برای تهیهٔ ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر از آنتی‌بیوتیک مورد نظر به‌دست آمد. سپس برای سهولت کار غلظت آن به ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر رسانده شد. در نهایت از آنتی‌بیوتیک با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر حجم‌های لازم برای تهیهٔ غلظت‌های مورد نظر از هر یک از آنتی‌بیوتیک‌ها تهیه گردید. آزمایش‌ها به‌صورت طرح کاملاً تصادفی شامل غلظت‌های مختلف صفر، ۰/۰۰۵، ۰/۰۵، ۰/۵، ۵ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر هرکدام در ۵ تکرار و در سه آزمایش جداگانه اما با شرایط کاملاً یکسان انجام شد.

ابتدا ۵ لیتر از محیط‌کشت *C. vulgaris* برای نمونه‌های آزمایشی فراهم گردید. سپس pH آغازین آنها با اضافه نمودن HCl و NaOH با غلظت ۰/۱ نرمال با استفاده از pH متر (مدل Metrohm ۷۴۴، ساخت سوئیس) در ۶/۸ تنظیم گردید. در مرحلهٔ بعد ظروف حاوی محیط‌کشت جلبک به همراه لوله‌های هوادهی و پنبه‌های کتانی و همچنین ۳۰ ارلن‌مایر ۲۵۰ میلی‌لیتر

برای هرکدام از آزمایش‌ها در دمای ۱۲۱ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ دقیقه در دستگاه اتوکلاو ضدعفونی و استریل شدند. پس از اتمام اتوکلاو و هم‌دما شدن با دمای آزمایشگاه، آب‌مقطر و محیط‌کشت همراه استوک جلبک *C. vulgaris* (با غلظت ۵×۱۰^{۵} سلول در میلی‌لیتر) به ارلن‌مایرهای ۲۵۰ میلی‌لیتری اضافه گردید. در نهایت حجم‌های لازم برای تهیهٔ غلظت‌های مختلف آنتی‌بیوتیک به هر یک از ارلن‌مایرها اضافه شد. شرایط نگهداری واحدهای آزمایشی مشابه نگهداری استوک جلبکی تنظیم گردید. دورهٔ آزمایشی ۶–۵ روزه در نظر گرفته شد و هر دو روز یک نوبت تراکم سلول‌های جلبکی تعیین گردید.

شمارش جلبک‌ها با استفاده از لام هموسیتومتری و با روش پیشنهادشده توسط Martinez و همکاران (۲۰۰۰) انجام گردید. میزان رشد ویژه (SGR) با استفاده از رابطهٔ $SGR= (\ln N_2-\ln N_1)/\Delta t$ محاسبه گردید که در آن N_2: تعداد سلول‌های جلبک در انتهای آزمایش، N_1: تعداد سلول‌های جلبک در ابتدای آزمایش و Δt: مدت‌زمان انجام آزمایش است (Omori and Ikeda, 1984).

اندازه‌گیری کلروفیل *a*، *b* و کل کاروتنوئیدهای نمونه‌ها، با استفاده از کاغذ صافی غشایی، سانتریفیوژ، استون ۹۰ درصد، دستگاه اسپکتروفتومتری (مدل JENWAY 6400) و به روش شرح داده‌شده توسط Parsons و همکاران (۱۹۸۴) انجام شد. برای محاسبهٔ میزان کلروفیل و کل کاروتنوئید از فرمول‌های زیر استفاده شد (Sukran *et al*., 1998; Khuantrairong and Traichaiyaporn, 2012).

C*a* (mg/L)= 11.75(A662)-2.350(A645)
C*b* (mg/L)= 18.61(A645)-3.960(A662)
C*x+c* (mg/L)= 1000(A470)-2.270(Ca)-81.4(Cb)/227

C*a*= کلروفیل *a*، C*b*= کلروفیل *b*، C*x+c*= کل کاروتنوئیدها، A= میزان جذب در طول‌موج مورد نظر آنالیز آماری داده‌ها با تجزیه واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) انجام شد. برای مقایسهٔ میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح معنی‌داری ۹۵ درصد انجام گردید. کارهای آماری با نرم‌افزار SPSS نسخهٔ ۲۲ انجام شد.

۳. یافته‌های پژوهش

۳–۱. اثر غلظت‌های مختلف آنتی‌بیوتیک‌های مورد آزمایش بر تراکم سلولی و میزان رشد ویژهٔ جلبک *C. vulgaris*

۳–۱–۱. اکسی‌تتراسایکلین

میانگین میزان تراکم سلولی در غلظت‌های مختلف آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین در روزهای مختلف آزمایش در شکل ۱ ارائه شده است. در این پژوهش اگرچه جلبک *C. vulgaris* طی روزهای دوم تا ششم در همهٔ تیمارهای آزمایشی رشد یافت، اما افزایش غلظت اکسی‌تتراسایکلین از ۰/۰۰۵ به ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر منجر به کاهش جمعیت جلبک *C. vulgaris* و با افزایش غلظت به ۰/۵، ۵ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر برخلاف سایر تیمارها منجر به رشد و افزایش جمعیت جلبکی شده است.

در آزمایش تأثیر اکسی‌تتراسایکلین بر جلبک کلرلا، بیشترین میانگین تراکم سلولی ($۳/۸۶ \times ۱۰^{۶}$ سلول در میلی‌لیتر) در تیمار با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر و در روز پایانی آزمایش به‌دست آمد، که اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد نشان داد ($P<۰/۰۵$). همچنین کمترین میانگین تراکم سلولی ($۱/۰۷ \times ۱۰^{۶}$ سلول در میلی‌لیتر) در تیمار ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر و در روز دوم آزمایش حاصل شد.

مقایسهٔ عملکرد تراکم و میزان رشد ویژهٔ جلبک *C. vulgaris* در روز پایانی آزمایش در شکل ۲ ارائه شده است. بیشترین میزان رشد ویژه (۰/۴۱) جلبک *C. vulgaris* در تیمار با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر و در مقابل کمترین میزان رشد ویژه (۰/۲۷) در تیمار ۰/۰۰۵ میلی‌گرم در لیتر به‌دست آمد. در روز پایانی آزمایش، بیشترین میانگین از هر یک از پارامترهای میانگین تراکم سلولی و میزان رشد ویژه در تیمار ۰/۵، ۵ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر به‌دست آمد که اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند ($P>۰/۰۵$).

۳–۱–۲. نئومایسین‌سولفات

در آزمایش تأثیر نئومایسین بر جلبک کلرلا، بالاترین میانگین تراکم سلولی در تیمار با غلظت ۰/۰۵ ($۱/۶۷\times۱۰^{۶}$) و در روز پایانی به‌دست آمد. در مقابل کمترین میانگین تراکم سلولی در تیمار با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر ($۱/۲\times۱۰^{۵}$) و در روز چهارم به‌دست آمد.

میانگین میزان تراکم سلولی در غلظت‌های مختلف آنتی‌بیوتیک نئومایسین‌سولفات در روزهای مختلف آزمایش در شکل ۱-B نشان شده است. نتایج نشان داد که افزایش غلظت نئومایسین‌سولفات منجر به کاهش شدید و چشمگیری در جمعیت جلبک *C. vulgaris* خواهد شد. اگرچه جلبک *C. vulgaris* در بیشتر تیمارهای آزمایشی رشد یافت، اما با افزایش غلظت به ۰/۵، ۵ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر از این آنتی‌بیوتیک میزان تراکم جمعیت و شاخص های رشد کاهش و نسبت به تیمار شاهد، ۰/۰۰۵ و ۰/۰۵ تفاوت معنی‌داری را نشان داد ($P<۰/۰۵$). در این آزمایش در روز دوم جمعیت جلبک در تیمارهای آزمایشی تفاوت معنی‌داری را نشان ندادند ($P>۰/۰۵$). در روز پایانی آزمایش (روز هفتم) به‌ترتیب تیمارهای ۰/۵، ۵ و ۵۰ با کمترین میزان تراکم و به‌ترتیب تیمار ۰/۰۵، ۰/۰۰۵ و شاهد بیشترین میزان تراکم را دارا بودند که اختلاف معنی‌داری با تیمارهای دیگر داشتند ($P<۰/۰۵$).

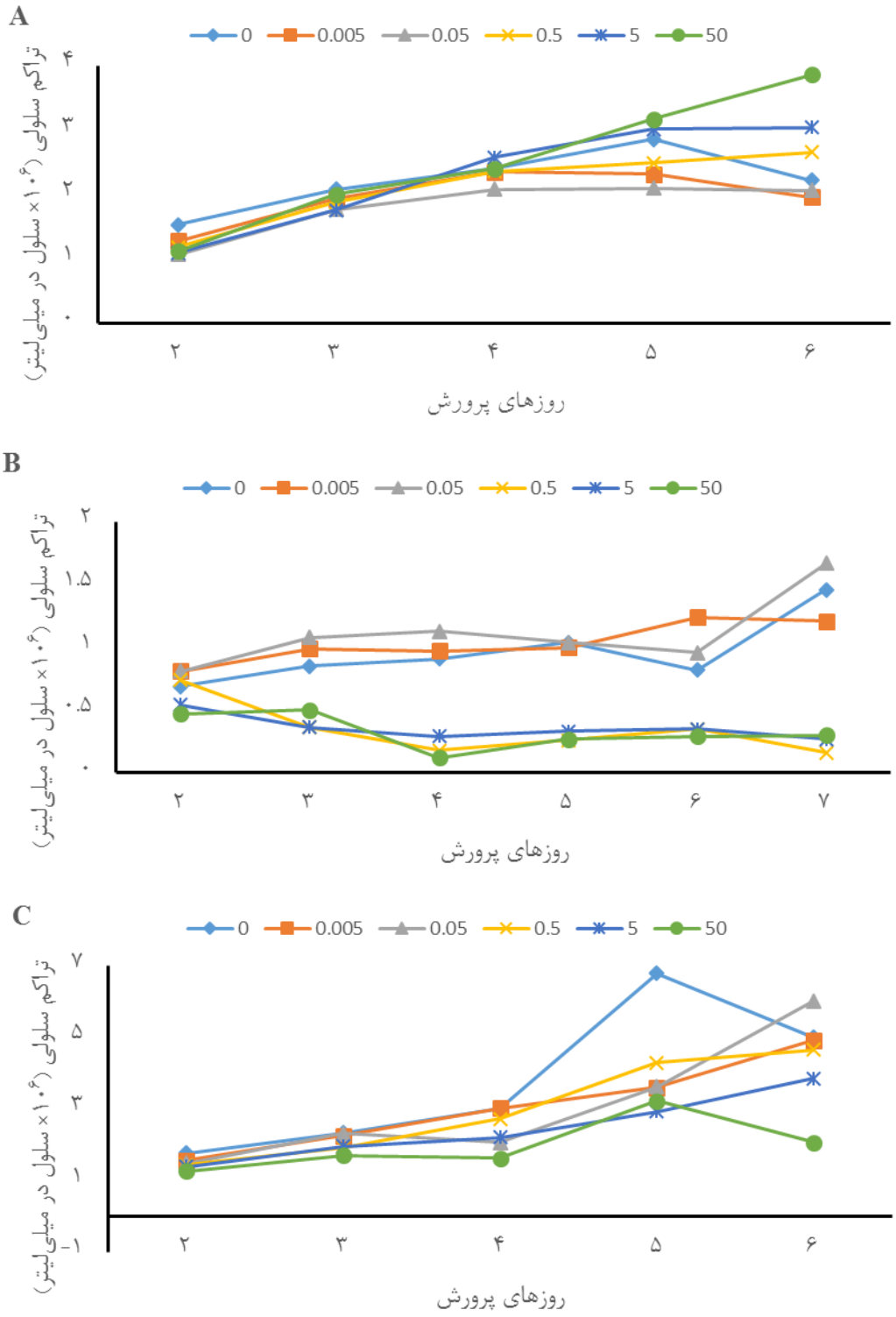
بیشترین میزان رشد ویژه در روز پایانی آزمایش در تیمار ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر و کمترین آن در تیمار با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر از آنتی‌بیوتیک نئومایسین‌سولفات به‌دست آمد (شکل ۲). علت منفی شدن رشد ویژه، میزان تراکم ناچیز سلول‌های جلبکی موجود در نمونهٔ مورد آزمایش است. میزان رشد ویژه در تیمارهای شاهد، ۰/۰۵ و ۰/۰۰۵ بیشترین میزان را دارا بود که اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها داشت ($P<۰/۰۵$).

مقایسهٔ عملکرد تراکم سلولی و میزان رشد ویژه در روز پایانی در شکل ۲ ارائه شده است. بیشترین میزان هر یک از شاخص های میانگین تراکم سلولی و میزان رشد ویژه در تیمار ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد. همزمان با افزایش غلظت نئومایسین‌سولفات به ۵ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر عملاً هیچ رشدی صورت نگرفت و نسبت به تیمار ۰/۵ اختلاف معنی‌داری را نشان ندادند ($P>۰/۰۵$).

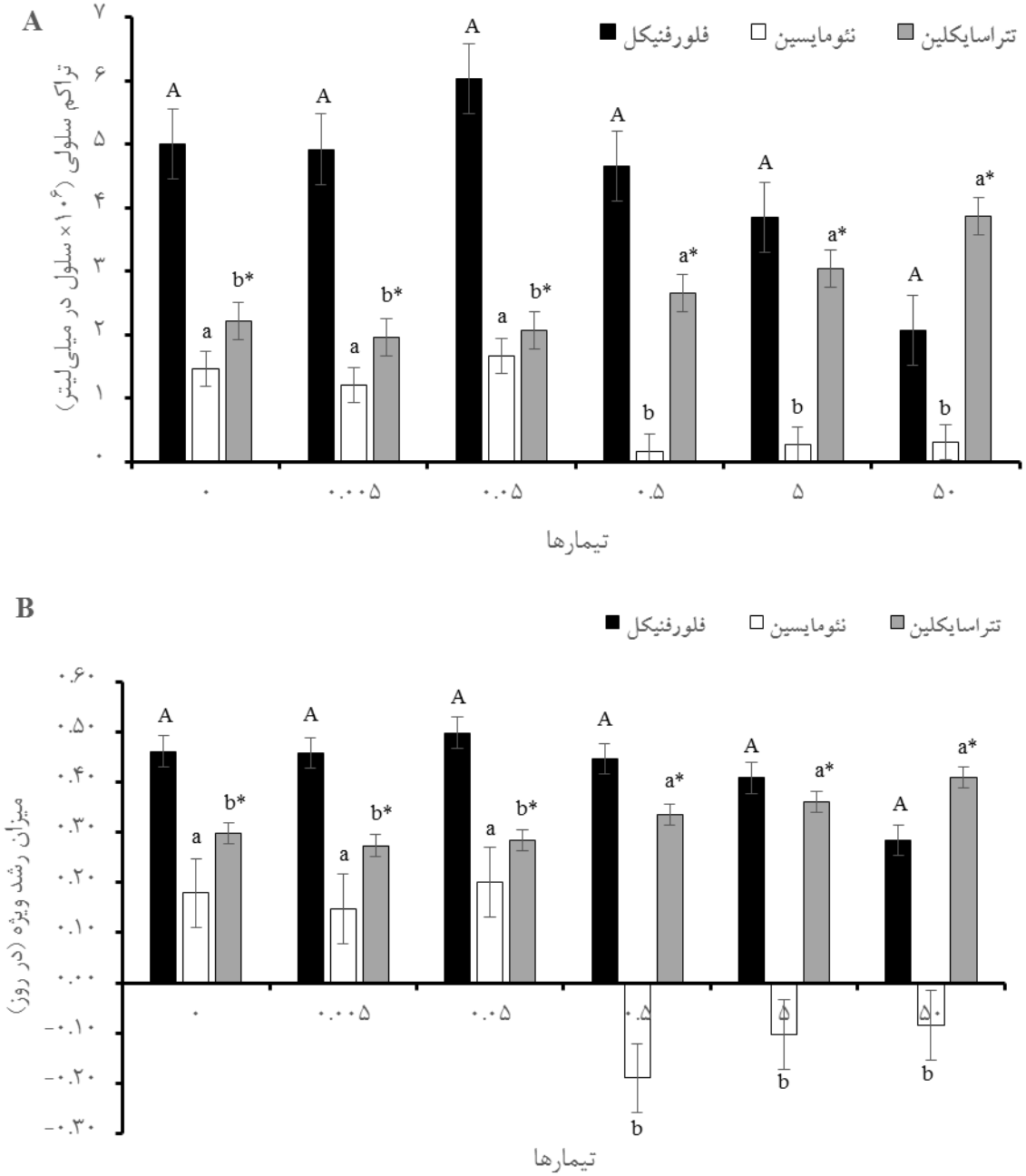
۳-۱-۳. فلورفنیکل

میانگین میزان تراکم سلولی در غلظت‌های مختلف آنتی‌بیوتیک فلورفنیکل در روزهای مختلف آزمایش در شکل ۱-C ارائه شده است. در این آزمایش میانگین تراکم سلولی که در تیمارهای با غلظت‌های مختلف به‌دست آمد، اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد نشان نداد ($P>۰/۰۵$). تراکم جلبک کلرلا در غلظت ۵۰ میلی‌گرم از آنتی‌بیوتیک فلورفنیکل در کمترین میزان قرار داشت. با وجود رشد و افزایش تراکم در جمعیت جلبک *C. vulgaris* در تمام تیمارهای آزمایشی افزایش غلظت فلورفنیکل از ۰/۰۰۵ به ۵۰ میلی‌گرم در لیتر با محدودیت در افزایش میزان رشد همراه بود. نتایج نشان داد که جلبک *C. vulgaris* تنها در تیمار شاهد و تیمار با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک فلورفنیکل و در روز پایانی آزمایش کاهش و تخریب سلول‌های جمعیت جلبکی را نشان داد. بیشترین میزان رشد ویژه جلبک *C. vulgaris* (۰/۵۰ در روز) در تیمار با غلظت ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر به‌دست آمد. در مقابل کمترین میزان رشد ویژه (۰/۲۸ در روز) در تیمار با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر ثبت شد.

مقایسهٔ عملکرد تراکم و میزان رشد ویژه در روز پایانی در شکل ۲ ارائه شده است. همزمان با افزایش غلظت آنتی‌بیوتیک فلورفنیکل مقادیر هر یک از شاخص های میانگین تراکم سلولی و میزان رشد ویژه کاهش چشمگیری را نشان دادند، که این کاهش در تیمار با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر شدیدتر بود، درحالی‌که تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی مشاهده نشد ($P>۰/۰۵$).



شکل ۱- نمودارهای میانگین تراکم سلولی جلبک *C. vulgaris* در غلظت‌های مختلف از آنتی‌بیوتیک‌های اکسی‌تتراسایکلین (A)، نئومایسین (B) و فلوروفنیکل (C) در روزهای مختلف پرورش



شکل ۲- میانگین (± خطای استاندارد) تراکم سلولی (A) و میزان رشد ویژه (B) جلبک *C. vulgaris* در غلظت‌های مختلف از آنتی‌بیوتیک‌های اکسی‌تتراسایکلین، نئومایسین و فلوروفنیکل. (وجود حداقل یک حرف مشابه در هر ستون بیانگر عدم وجود تفاوت معنی‌دار است ($P<۰/۰۵$))

۳-۲. اثر غلظت‌های مختلف آنتی‌بیوتیک‌های مورد آزمایش بر میزان رنگدانه‌های جلبک *C. vulgaris*

۳-۲-۱. اکسی‌تتراسایکلین

نتایج حاصل از آزمایش اثر غلظت‌های مختلف آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین بر کلروفیل *a*، *b* و کل کاروتنوئید جلبک *C. vulgaris* جمعیت در پایان دورهٔ ۵ روزه در شکل ۳-A ارائه شده است. تأثیر اکسی‌تتراسایکلین بر جلبک کلرلا، بیشترین میانگین مقادیر کلروفیل‌های *a*، *b* و کل کاروتنوئید جمعیت *C. vulgaris* به‌ترتیب برابر ۱/۶۷۵ میلی‌گرم در لیتر در تیمار شاهد، ۱/۵۲ در غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر و ۰/۶۰۲ در تیمار با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر از آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین به‌دست آمد (شکل ۳-A). درحالی‌که کمترین میانگین مقادیر از رنگدانه‌های فتوسنتزی *a* و *b* در تیمار با غلظت ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر،

همچنین نسبت به کل کاروتنوئید در تیمار با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر از آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین مشاهده شد (شکل ۳-A).

به‌طورکلی با گذشت زمان و رشد جلبک، مقادیر رنگدانه‌های فتوسنتزی از تیمار شاهد تا تیمار با غلظت ۰/۰۵ روند کاهشی داشت، سپس از تیمار با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر تا تیمار با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر افزایش قابل‌ملاحظه‌ای داشت. در اندازه‌گیری‌های انجام‌شده در پایان آزمایش مقادیر کلروفیل *a* و کل کاروتنوئید اختلاف معنی‌داری را در تیمارهای آزمایشی نشان ندادند ($P>0/05$). این در حالی است که افزایش مقادیر آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین، مقادیر کلروفیل *b* را به‌ترتیب در تیمارهای ۰/۰۵، ۰/۰۰۵ و ۰/۵ به نسبت کاهش داد که اختلاف معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد نشان ندادند ($P>0/05$). درعین‌حال نتایج بیانگر اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای با بیشترین مقادیر کلروفیل *b* به‌ترتیب تیمار با غلظت ۵ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر، با یکدیگر و همچنین با تیمار شاهد بود ($P<0/05$).

۳-۲-۲. نئومایسین‌سولفات

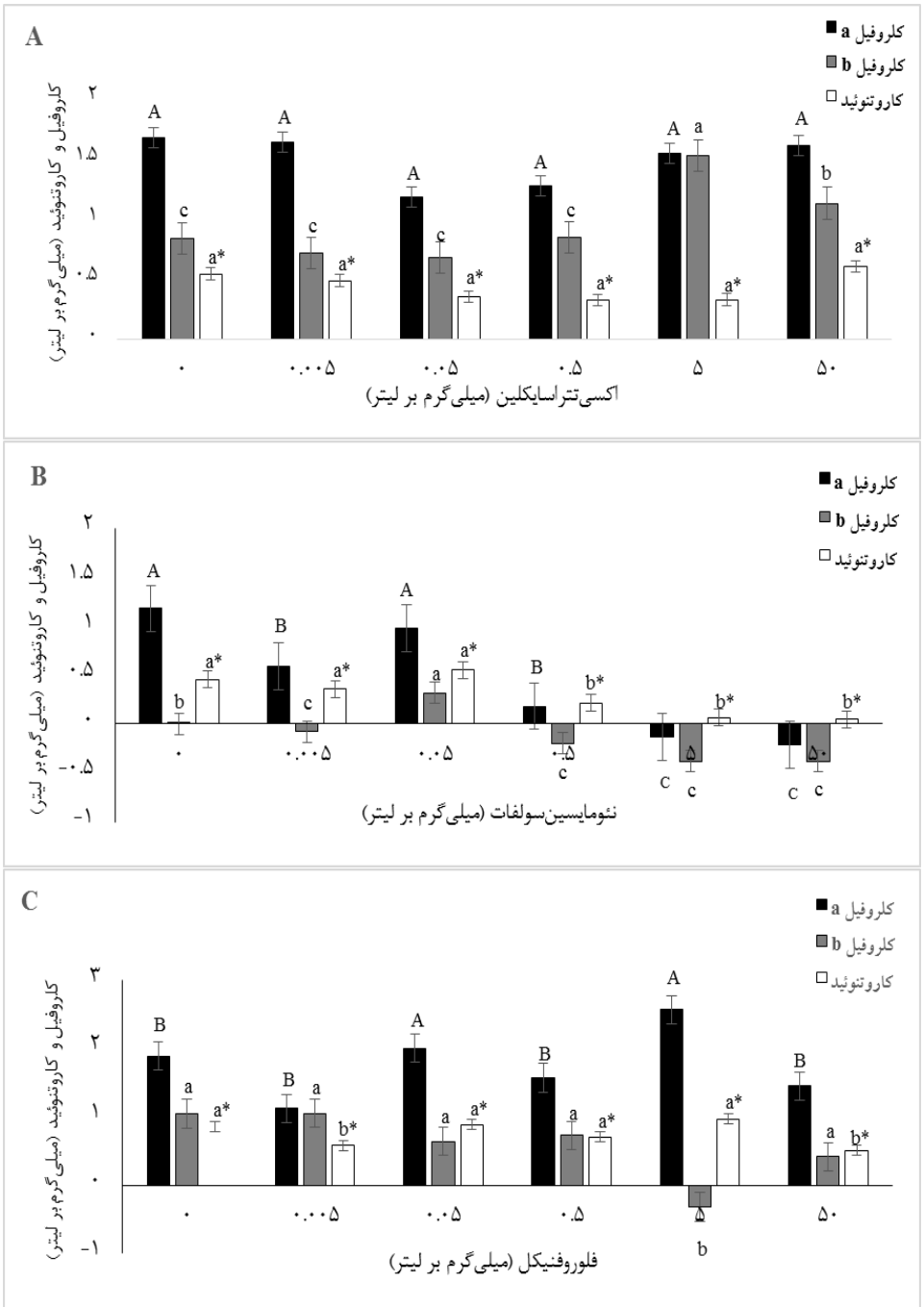
نتایج حاصل از انجام آزمایش اثر غلظت‌های مختلف نئومایسین‌سولفات بر میزان کلروفیل‌های *a*، *b* و کل کاروتنوئید جمعیت جلبک *C. vulgaris* در شکل ۳-B ارائه شده است. در این آزمایش، بیشترین میانگین مقادیر کلروفیل *a* جمعیت جلبک *C. vulgaris* برابر ۱/۱۷۹ میلی‌گرم در لیتر در تیمار شاهد و همچنین بیشترین میانگین کلروفیل *b* (۰/۳۱۵) و کاروتنوئید (۰/۵۴۹) در تیمار ۰/۰۵ به‌دست آمد. درحالی‌که کمترین میانگین مقادیر هر یک از رنگدانه‌های فتوسنتزی، در تیمار با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر از آنتی‌بیوتیک نئومایسین‌سولفات وجود داشت. بیشترین میزان کلروفیل *a* به‌ترتیب مربوط به تیمارهای شاهد و تیمار ۰/۰۵ است که اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها دارند ($P<0/05$). کمترین میزان کلروفیل *a* مربوط به تیمارهای ۵۰ و ۵ است که اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نشان ندادند ($P>0/05$). تیمارهای ۰/۵ و ۰/۰۰۵ در رتبهٔ سوم و چهارم با یکدیگر و با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری نشان دادند. بیشترین میزان کلروفیل *b* مربوط به تیمار با غلظت ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر بود که اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها نشان داد ($P<0/05$). کمترین میزان نیز مربوط به تیمار ۵۰ و ۵ است که اختلاف معنی‌داری با تیمارهای ۰/۵ و ۰/۰۰۵ نداشتند ($P>0/05$). تیمار شاهد با تیمار ۵۰ و ۵ با کمترین میزان کلروفیل *b* و با تیمار ۰/۰۵ با بیشترین میزان کلروفیل *b* اختلاف معنی‌داری نشان داد ($P<0/05$). بیشترین میزان کاروتنوئید مربوط به تیمار ۰/۰۵ می‌باشد که اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد نشان نداد ($P>0/05$)، ولی با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت ($P<0/05$). تیمار شاهد با تیمار ۰/۰۰۵ اختلاف معنی‌داری نداشت ($P>0/05$). کمترین میزان کاروتنوئید مربوط به تیمار ۵۰ و ۵ است که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری نشان دادند. تیمار ۰/۵ پس از تیمار ۵۰ و ۵ کمترین میزان کاروتنوئید را دارا بود که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری نشان داد ($P<0/05$).

۳-۲-۳. فلورفنیکل

نتایج حاصل از آزمایش اثر غلظت‌های مختلف آنتی‌بیوتیک فلورفنیکل بر کلروفیل و کل کاروتنوئید جلبک *C. vulgaris* در شکل ۳-C ارائه شده است. در آزمایش تأثیر فلورفنیکل بر جلبک کلرلا، بیشترین میانگین مقادیر کلروفیل‌های *a*، *b* و کل کاروتنوئید جمعیت *C. vulgaris* به‌ترتیب برابر (۲/۵۷۳) میلی‌گرم در لیتر در غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر، (۱/۰۵۲) میلی‌گرم در لیتر در غلظت ۰/۰۰۵ میلی‌گرم در لیتر و (۰/۹۶۹) میلی‌گرم در لیتر در غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر از آنتی‌بیوتیک فلورفنیکل به‌دست آمد. درحالی‌که کمترین میانگین مقادیر هریک از رنگدانه‌های فتوسنتزی به‌ترتیب در تیمار با غلظت‌های ۰/۰۰۵، ۵ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر از آنتی‌بیوتیک فلورفنیکل وجود داشت (شکل ۳-C).

بیشترین میزان کلروفیل *a* مربوط به تیمار ۵ میلی‌گرم در لیتر بود که اختلاف معنی‌داری با تیمار ۰/۰۵ نشان نداد ($P>0/05$)، ولی با سایر تیمارها اختلاف داشت ($P<0/05$). کمترین میزان میانگین این کلروفیل مربوط به تیمار ۰/۰۰۵ میلی‌گرم در لیتر است که اختلاف معنی‌داری با تیمار ۵۰، ۰/۵ و شاهد نداشت ($P>0/05$). بیشترین میزان میانگین کلروفیل *b* مربوط به تیمار ۰/۰۰۵ میلی‌گرم در لیتر است که اختلاف معنی‌داری با تیمارهای شاهد و ۰/۵ و ۰/۰۵ نشان نداد ($P>0/05$)، ولی اختلاف آن با سایر تیمارها معنی‌دار بود ($P<0/05$). کمترین میزان میانگین کلروفیل *b* مربوط به تیمار ۵ میلی‌گرم در لیتر بود که اختلاف

معنی‌داری با سایر تیمارها نشان داد ($P<۰/۰۵$). بیشترین میزان میانگین کاروتنوئید مربوط به تیمار ۵ بود که با تیمارهای ۰/۰۵ و شاهد اختلاف معنی‌داری نشان نداد ($P>۰/۰۵$)، ولی تفاوت آن با سایر تیمارها معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$). کمترین میزان کاروتنوئید مربوط به تیمار ۵۰ بود که اختلاف معنی‌داری با تیمار ۰/۰۰۵ نشان نداد ($P>۰/۰۵$). همان‌طور که از نمودارها مشخص است با گذشت زمان و رشد جلبک مقادیر هر یک از رنگدانه‌های فتوسنتزی در روز پایانی نسبت به روز ابتدای آزمایش کاهش قابل‌ملاحظه‌ای داشتند. در اندازه‌گیری‌های انجام‌شده در روز پایانی آزمایش مقادیر کلروفیل *a*، *b* و کل کاروتنوئید اختلاف معنی‌داری را در تیمارهای آزمایشی نشان دادند ($P<۰/۰۵$).



شکل ۳- نمودارهای میانگین (± خطای استاندارد) میزان کلروفیل‌های *a*، *b* و کل کاروتنوئید جلبک *C. vulgaris* در غلظت‌های مختلف آنتی‌بیوتیک‌های اکسی‌تتراسایکلین (A)، نئومایسین (B) و فلوروفنیکل (C) در روز پایانی پرورش. (اعداد منفی نشان‌دهندهٔ خطای دستگاه و یا اندازه‌گیری خارج از محدودهٔ دقت دستگاه اسپکتوفتومتر است)

۴. بحث و تیجه گیری نهایی

در این مطالعه تراکم سلولی سلول‌های جلبک *C. vulgaris* همزمان با افزایش غلظت آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین در تیمارهای ۰/۵، ۵ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر نسبت به تیمار شاهد در روزهای ۵ و ۶ افزایش نشان داد. این افزایش می‌تواند ناشی از افزایش تخریب این آنتی‌بیوتیک در غلظت‌های زیادتر باشد که احتمال می‌رود به‌علت تخریب سریع آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین و دسترسی ضعیف زیستی آن در سلول‌های جلبک کلرلا باشد. در تمام آزمایش‌های اکسی‌تتراسایکلین، رنگ قهوه‌ای در محیط‌کشت در روز دوم آزمایش پیدا شد. در تأیید این ادعا مطالعات Fu و همکاران (۲۰۱۷) روی جلبک *C. vulgaris* با استفاده از آنتی‌بیوتیک ریفامپسین نشان داد که دلیل کاهش آنتی‌بیوتیک با افزایش زمان پس از در معرض‌گذاری، اصولاً مربوط به هیدرولیز است. اندازهٔ مولکولی و آب‌گریزی زیاد ریفامپسین منجر به فراهمی زیستی ضعیف و سمیت کم آن می‌شود. همچنین در مطالعهٔ دیگری که غلظت آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین را بر جلبک *Tetraselmis suecica* بررسی کردند، مشاهدات آنها حداقل کاهش درصد نرخ رشد را نشان داد و نتیجه‌گیری شد که برای اکسی‌تتراسایکلین، غلظت مؤثر دارویی بیشتر از آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل و فلورفنیکل بود، بنابراین به‌نظر می‌رسد این ترکیب برای گونه *T. suecica* ضرر کمتری داشته باشد (Seoane *et al*., 2014). همچنین در آزمایشی دیگر مشخص گردید که تتراسایکلین با غلظت ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر باعث افزایش رشد و تقسیم میتوزی سلولی می‌شود (Xie *et al*., 2011). یافته‌های Bashir و Cho (۲۰۱۶) نیز نشان دادند که *Dunaliella pulchellum* در حداکثر غلظت آزمایش‌شده ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر برای تتراسایکلین، رشد و تولیدمثل دارند.

به‌نظر می‌رسد دلیل مغایرت داشتن برخی نتایج، تأثیر مهار و تحریک آنتی‌بیوتیک‌ها بر گونه‌های متفاوت ریزجلبک باشد، سازگاری فیزیولوژیک گونهٔ جلبک هدف است که در رشد آن نقش بسیار مهمی دارد. چنانچه در تأیید این ادعا مطالعات Guo و همکاران (۲۰۱۶) به‌طور مقایسه‌ای حساسیت گونه‌هایی از جلبک‌های سبز را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها نشان دادند. جلبک *Pseudokirchneriella subcapitata* در معرض تیلوزین و لینکومایسین نسبت به *Dunaliella subspicatus* کمی حساس‌تر بود، درحالی‌که *Chlorella vulgaris* در بیشترین غلظت‌های آزمایش‌شده به این آنتی‌بیوتیک‌ها حساس نبود. تفاوت در حساسیت در بین کلاس‌های جلبکی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آزمایش‌شده ممکن است به‌دلیل تفاوت در جذب آنتی‌بیوتیک، جایگاه‌های اتصال در آنتی‌بیوتیک هدف، پمپ‌های خروجی فعال و تفاوت در حذف آنتی‌بیوتیک‌ها (غیرفعال‌سازی آنزیمی) با تجزیهٔ مستقیم یا اصلاح ترکیبات توسط ریزجلبک نسبت داده شود (Guo *et al*., 2016).

به‌نظر می‌رسد مهار رشد جلبک در ساعات اولیهٔ مواجهه با آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین در مقایسه با روزهای بعدی آزمایش در تمام تیمارها، ناشی از توقف اثرات آنتی‌بیوتیکی یا مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک با افزایش در معرض قرارگیری باشد. از دلایل احتمالی دیگر در خصوص کاهش تراکم سلولی جلبک کلرلا می‌توان به نفوذپذیری آن اشاره نمود. در آزمایشات دیگر ثابت شد که نفوذپذیری سلول‌های جلبکی در معرض غلظت زیاد از اکسی‌تتراسایکلین، اپی‌تتراسایکلین و تتراسایکلین به‌طور قابل توجهی افزایش می‌یابد. همچنین تغییرات ساختاری در سلول‌ها از جمله پلاسمولیز، رسوب گرانول نشاسته را نیز مشاهده کردند. به‌طورکلی نتیجه‌گیری می‌شود که تتراسایکلین می‌تواند به‌طور قابل توجهی مانع رشد و پیشرفت فیزیولوژیکی از جمله فتوشیمی اولیه و سیستم آنتی‌اکسیدانی شود. بااین‌حال، با قرارگیری مجدد در معرض آن، در مقایسه با اولین مواجهه اثرات مهاری تتراسایکلین کاهش می‌یابد (Xu *et al*., 2019).

به‌نظر می‌رسد زیاد بودن میزان کلروفیل *a* در تیمارها در این مطالعه نوعی اعمال مکانیسم دفاعی از طرف سلول‌های *C. vulgaris* علیه اکسی‌تتراسایکلین باشد. در تأیید این ادعا مطالعات Khalaji و همکاران (۲۰۱۹) بر رشد ریزجلبک *C. vulgaris* نشان داد با افزایش غلظت آنتی‌بیوتیک به‌طور چشمگیری رشد کاهش یافت. افزایش محتوای کلروفیل و کاروتنوئید در ریزجلبک *C. vulgaris* با افزایش دورهٔ انکوباسیون می‌تواند نشان‌دهندهٔ این مهم باشد که مکانیسم دفاعی برای تنش علیه نوروفلوکساسین توسط *C. vulgaris* انجام می‌شود و نتیجه‌گیری شد جلبک میکروسکوپی کلرلا می‌تواند در مدت‌زمان طولانی

غلظت‌های بیشتر و در مدت‌زمان کوتاه غلظت‌های کمتر را از محیط حذف کند. در حقیقت، آنتی‌بیوتیک ممکن است در همانندسازی کلروپلاست اختلال ایجاد کرده و از فتوسنتز جلوگیری کند.

به‌نظر می‌رسد کاهش بیشتر کلروفیل *a* در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر نسبت به غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر در این تحقیق ناشی از ایجاد اختلال در چرخهٔ سلولی باشد. در تأیید این ادعا مطالعات Siedlewicz و همکاران (۲۰۲۰) روی جلبک *C. vulgaris* با استفاده از آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین نتایج مشابه را نشان داد که غلظت ۰/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر تأثیر بیشتری بر کلروفیل در مقایسه با غلظت ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر داشت و نتیجه‌گیری شد تفاوت در غلظت کلروفیل می‌تواند ناشی از اختلالات در چرخهٔ سلولی باشد و غلظت اکسی‌تتراسایکلین بیشتر از ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر باعث استرس اکسیداتیو می‌شود و تغییرات ساختاری (مانند پلاسمولیز و رسوب گرانول نشاسته) در سلول‌ها ظاهر می‌شود، لاملاهای تیلاکوئید در کلروپلاست‌ها تغییر شکل می‌یابد و واکوئل‌ها بزرگ‌تر می‌شوند. همان‌گونه که نتایج این تحقیق نشان داد، جلبک کلرلا در اوایل دورهٔ پرورش به‌طور بسیار مؤثری تحت تأثیر اکسی‌تتراسایکلین بود. به‌طور مشابهی Eguchi و همکاران (۲۰۰۴) نشان دادند که اکسی‌تتراسایکلین تأثیر زیادی بر رشد جلبک‌ها در مراحل اولیهٔ دورهٔ پرورش دارد و سنتز رنگدانه‌ها را مهار می‌کند؛ بنابراین وقتی‌که اکسی‌تتراسایکلین به‌طور مداوم در محیط آزاد شود، به جلبک آسیب می‌رساند.

مشاهدهٔ نتایج اثر آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین بر جلبک *C. vulgaris* نشان داد که این آنتی‌بیوتیک نه‌تنها اثر مخربی بر جلبک مورد آزمایش ندارد، بلکه محرک رشد آن نیز می‌باشد. این نتایج نشان داد استفاده از آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین جهت درمان بیماری‌ها در آبزی‌پروری تحت غلظت‌های زیاد نه‌تنها ممانعتی ندارد، بلکه استفاده از غلظت مناسب دارو در جیرهٔ غذایی آبزیان به‌عنوان مکمل محرک رشد نیز توصیه می‌شود.

در این مطالعه در غلظت ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر در روز پایانی پرورش، آنتی‌بیوتیک نئومایسین‌سولفات افزایش معنی‌داری بر تراکم جلبک کلرلا نشان داد، که اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد نداشت. اختلاف تیمارهای با غلظت ۰/۵، ۵ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر به‌لحاظ کمترین میزان تراکم و رشد ویژه جمعیت جلبک کلرلا با دیگر تیمارها معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$). غلظت‌های کم از نئومایسین‌سولفات اثر مهارکنندگی چندانی بر جلبک کلرلا نداشتند، اما با افزایش غلظت به ۰/۵، ۵ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر مهارکنندگی افزایش و رشد کاهش یافت. به‌نظر می‌رسد علت کاهش جمعیت جلبک کلرلا در این غلظت‌ها، کاهش شدید در سلول‌های جلبکی است که به‌نوبهٔ خود باعث شد جمعیت دیگر قادر به احیاء خود نباشد. از طرف دیگر احتمال می‌رود کاهش سلول‌ها در جمعیت جلبک کلرلا در روزهای پایانی آزمایش، به‌علت کاهش مواد مغذی در نتیجهٔ افزایش یافتن تعداد سلول‌های جلبکی در روزهای قبلی این آزمایش باشد که این تراکم زیاد زیست‌توده به‌نوبهٔ خود امکان نفوذ نور، انجام فتوسنتز و جذب مواد غذایی را کاهش دهد. همچنین میزان کمتر تراکم سلولی در جلبک کلرلا را می‌توان به افزایش زمان مواجهه و افزایش زمان در معرض قرارگیری با ترکیبات ناخواسته و زیان‌آور نسبت داد.

Azevedo و همکاران (۲۰۱۹) گزارش داد که سیپروفلوکساسین که همانند نئومایسین‌سولفات یک آنتی‌بیوتیک ضدمیکروبی قوی با مهار رشد برگشت‌ناپذیر است باعث مهار رشد جلبک سبز آب شیرین *Pseudokirchneriella subcapitata* شده و به صورت داخل سلولی عمل کرده، آنزیم DNA ژیراز را مهار و تکثیر سلول را غیرممکن می‌سازد. آنها همچنین بیان کردند که رشد سلولی و تولید کلروفیل جلبک *Microcystis flos-aquae* با افزایش غلظت لووفلوکساسین و فلوروکینولون به‌طور قابل توجهی مهار می شود. به‌نظر می‌رسد غلظت‌های کم دارو مکانیسم ترمیم سلولی را در ریزجلبک فعال می‌کند، اثر تخریبی آنتی‌بیوتیک را توسط آنزیم استراز سلولی از بین می‌برند و سلول را با جایگزینی فسفولیپید در غشا بازسازی می‌کنند. همچنین می‌توان گفت کاهش احتمالی کلروفیل، به‌علت غیرفعال‌شدن کانال سدیمی با مکانیسم عمل کمک به سنتز کلروفیل نیز باشد. همچنین انتظار می‌رود استرس ناشی از مواجهه جلبک با غلظت‌های زیاد آنتی‌بیوتیک باعث ایجاد استرس اکسیداتیو و کاهش رنگدانه شود. به‌نظر می‌رسد در هنگام مواجههٔ جلبک با آنتی‌بیوتیک با افزایش نفوذپذیری، آسیب به سلول‌ها، اندامک‌های کلروپلاست و میتوکندری، میزان رادیکال‌های آزاد افزایش یافته و رشد سلولی دچار اختلال شود. با توجه به آثار زیان‌آور آنتی‌بیوتیک‌ها و مواد سمی با جلوگیری از انتقال الکترون، می‌توانند منجر به غیرفعال‌شدن فعالیت فتوسنتزی شده و از رشد

سلول‌های جلبکی ممانعت به‌عمل می‌آورند. در نهایت به‌نظر می‌رسد کاهش تعداد سلول‌های جلبکی علت کاهش رنگدانه‌ها باشد. همچنین احتمال می‌رود لیز سلولی، سیلیکاسیون‌شدن دیواره، کوچک‌شدن حجم سلول و استرس اکسیداتیو با افزایش غلظت، باعث از بین رفتن میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی شود.

نتایج Sendra و همکاران (۲۰۱۸) نیز نشان داد که اریترومایسین رشد جمعیت ریزجلبک‌ها و عملکرد انتقال الکترون در فتوسیستم ۲ را در گونهٔ *Pseudokirchneriella subcapitata* مهار می‌کند. همچنین Siedlewicz و همکاران (۲۰۲۰) بیان کردند که برخی از ترکیبات مانند کاربامازپین، تیلوزین، لینکومایسین و تری‌متوپریم می‌توانند سنتز کلروفیل *a* را مهار کنند. علاوه بر این، کاهش سطح رنگدانه‌ها در سلول‌ها می‌تواند به‌دلیل افزایش اثرات مربوط به استرس اکسیداتیو نیز ایجاد شود.

به‌طورکلی نتایج اثر آنتی‌بیوتیک نئومایسین‌سولفات بر جلبک *C. vulgaris* نشان داد که استفاده از غلظت‌های زیاد این آنتی‌بیوتیک بر ویژگی‌های زیستی این جلبک اثر منفی می‌گذارد و از رشد جلبک در غلظت‌های زیاد این آنتی‌بیوتیک جلوگیری می‌کند. استفاده از غلظت‌های زیاد این آنتی‌بیوتیک در آبزی‌پروری توصیه نمی‌شود، ولی استفاده از غلظت‌های کم به‌مدت طولانی جهت اثرگذاری کارآمد خواهد بود.

در این مطالعه با بررسی اثر فلورفنیکل بر جلبک کلرلا اختلاف معنی‌داری در بیشترین غلظت مشاهده نشد، اما در تمام تیمارها افزایش غلظت محدودیت افزایش رشد را نشان داد. زیادشدن تعداد سلول‌های جلبکی در روز چهارم، در تیمار شاهد و تیمار ۵۰ میلی‌گرم در لیتر می‌تواند نفوذ نور را به درون محیط کاهش داده و جذب مواد مغذی برای انجام فرآیند فتوسنتز کاهش دهد، بنابراین کاهش میزان تراکم آن در روز بعدی آزمایش را به‌دنبال داشته باشد.

افزایش میزان تراکم ریزجلبک‌ها در روزهای پایانی آزمایش احتمالاً می‌تواند به‌دلایلی از جمله نیمه‌عمر کوتاه، تجزیهٔ نوری، جذب آنتی‌بیوتیک در لاشهٔ ریزجلبک‌های ته‌نشین‌شده و مکانیسم سازگاری ذاتی گونهٔ مورد مطالعه باشد. به‌نظر می‌رسد آنتی‌بیوتیک‌ها می‌توانند با از بین بردن غشای سلولی و ایجاد پراکسیداسیون قوی، افزایش میزان ROS را به‌دنبال داشته باشند. همچنین ممکن است بر رونویسی ژن اثرگذار باشند و انتقال الکترون را دچار اخلال کنند. در نهایت این کاهش جذب دی‌اکسیدکربن می‌تواند بر میزان فتوسنتز اثر منفی بگذارد (Yang *et al*., 2013; Xu *et al*., 2019). به‌طورکلی می‌توان گفت فلورفنیکل یک عامل ضد باکتریایی است که در محیط‌های آبی نسبت به اکسی‌تتراسایکلین پایدارتر است. بااین‌حال فلورفنیکل به‌طور قابل توجهی رشد جلبک دریایی *Tetraselmis suecica* را مهار می‌کند و سمیت بیشتری را نسبت به دو آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین و کلرامفنیکل نشان می‌دهد (Seoane *et al*., 2014).

همچنین آنتی‌بیوتیک‌ها می‌توانند نیمه‌عمر کوتاهی داشته و در محیط‌های آبی دچار تجزیهٔ نوری شده و یا جذب ذرات و رسوب گردند (Robinson *et al*., 2005). در این مطالعه، مقدار فلورفنیکل در غلظت‌های کمتر در مقایسه با غلظت‌های بیشتر، دچار هدررفت زیادتری گردید. به‌نظر می‌رسد غلظت کمتر آنتی‌بیوتیک باعث مهار کمتری در سلول‌های جلبک می‌شود، درنتیجه سلول بیشتری وجود دارد که می‌تواند آنتی‌بیوتیک‌ها را جذب کند. در تأیید این ادعا Liu و همکاران (۲۰۱۲) دریافتند که فلورفنیکل رشد جلبک *Skeletonema costatum* را در غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر تحریک کرده و در غلظت‌های بیشتر از ۲ میلی‌گرم بر لیتر مهار می‌کند.

در این مطالعه با بررسی اثر فلورفنیکل بر جلبک کلرلا بیشترین میزان کلروفیل در تیمار ۵ میلی‌گرم در لیتر و کمترین میزان کلروفیل در تیمار ۰/۰۰۵ میلی‌گرم در لیتر از فلورفنیکل مشاهده شد. زیادشدن تعداد سلول‌های جلبکی در روز چهارم، در تیمار شاهد و تیمار ۵۰ میلی‌گرم در لیتر می‌تواند نفوذ نور را به درون محیط کاهش داده و جذب مواد مغذی برای انجام فرآیند فتوسنتز کاهش دهد، بنابراین کاهش میزان تراکم از ۶/۸ به ۴/۹۲ میلیون سلول در میلی لیتر در تیمار شاهد و از ۳/۲۳ به ۲/۰۷ میلیون سلول در میلی لیتر در تیمار ۵۰ میلی گرم در لیتر در روز بعدی آزمایش را به‌دنبال داشته باشد.

انتظار می‌رفت با افزایش غلظت فلورفنیکل در تیمارهای آزمایشی میزان کلروفیل کاهش یابد؛ اما با توجه به نتایج این تحقیق احتمال می‌رود دلیل زیاد بودن کلروفیل در تیمار با غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر، زیادشدن میزان کاروتنوئید باشد که موجب افزایش کلروفیل می‌شود. این افزایش میزان کلروفیل در تیمارها می‌تواند نشان‌دهندهٔ پاسخ جمعیتی جلبک کلرلا برای کاهش تنش‌های

واردشده باشد. از سوی دیگر، علت زیادنبودن میزان کلروفیل *a* جلبک کلرلا در تیمار ۰/۰۰۵ فلورفنیکل می‌تواند به‌علت تأثیرات غیرقابل‌توجه این غلظت مادهٔ سمی بر این جمعیت باشد. متعاقب با این موضوع علت بیشتر شدن کلروفیل *a* در تیمار ۰/۰۵ و ۵ می‌تواند به‌علت افزایش میزان کاروتنوئید باشد. افزایش کلروفیل به جهت از بین بردن تنش‌های مربوط به اکسیژن در جلبک‌هاست. در تیمار ۵۰ علت کاهش میزان کلروفیل با وجود ایجاد تنش اکسیداتیو و فعال شدن ROS می‌تواند به‌علت عدم توانایی در بازیابی سیستم فتوسنتزی جلبک‌ها و کاهش قدرت تحمل در مقابل افزایش غلظت آنتی‌بیوتیک باشد (Yang *et al*., 2013; Xu *et al*., 2019). در این تحقیق، نتایج اثر آنتی‌بیوتیک فلورفنیکل بر جلبک *C. vulgaris* نشان داد که استفاده از این آنتی‌بیوتیک، تراکم سلولی جلبک را تحت تأثیر قرار می‌دهد، بنابراین استفاده از غلظت‌های بهینهٔ این آنتی‌بیوتیک جهت رشد جلبک و ایجاد عمل مهاری بر تکثیر باکتری‌ها و درمان بیماری در آبزی‌پروری مناسب‌تر است.

۵. نتیجه‌گیری نهایی

به‌عنوان نتیجه‌گیری می‌توان بیان کرد که آنتی‌بیوتیک نئومایسین‌سولفات اثرات به‌مراتب شدیدتری نسبت به آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین و فلورفنیکل بر تراکم سلولی و مقادیر رشد ویژه جلبک *C. vulgaris* اعمال کرد. در غلظت‌های ۵۰ و ۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر از آنتی‌بیوتیک نئومایسین تخریب و مرگ سلول‌های جلبکی مشاهده گردید و در نتیجه رشد جلبکی منفی شد، به‌طوری‌که در روز پایانی آزمایش در غلظت ۰/۵ و ۵ میلی‌گرم در لیتر از نئومایسین‌سولفات تراکم سلولی به کمتر از سطح خود در روز اول آزمایش رسید و میزان‌رشدویژه عدد منفی را نشان داد. درحالی‌که در آزمایش با آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین و فلورفنیکل در تمام تیمارها رشد سلولی مثبت شد و سطح تراکم سلول‌های جلبکی بیشتر از میزان جلبک در روز اول آزمایش بوده و مقادیر رشد ویژه نیز مثبت بودند.

در این پژوهش غلظت‌های مختلف آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین تأثیر معنی‌داری را بر میزان کلروفیل جلبک *C. vulgaris* نداشت؛ اما افزایش غلظت به ۰/۵، ۵ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر از آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین منجر به افزایش شدیدی در میزان کلروفیل جلبک *C. vulgaris* شد. آنتی‌بیوتیک نئومایسین‌سولفات اثر معنی‌داری بر میزان کلروفیل *a* جلبک *C. vulgaris* داشت. غلظت‌های مختلف از آنتی‌بیوتیک فلورفنیکل تأثیر معنی‌داری بر میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی جلبک *C. vulgaris* نشان داد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از معاونت پژوهشی و تحصیلات تکمیلی دانشگاه صنعتی اصفهان برای فراهم نمودن شرایط و امکانات لازم برای انجام این تحقیق و از آقایان دکتر سعید اسدالهی و دکتر ابراهیم متقی تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

Abdo, S.M., El-Enin, S.A., El-Khatib, K.M., El-Galad, M.I., Wahba, S.Z., El Diwani, G., Ali, G.H., 2015. Preliminary economic assessment of biofuel production from microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 55(1), 1147-1153. DOI:10.1016/j.rser.2015.10.119

Azevedo, F.C.R., Vaz, I.C.D., Barbosa, F.A.R., Magalhaes, S.M.S., 2019. Toxicological effects of ciprofloxacin and chlorhexidine on growth and chlorophyll *a* synthesis of freshwater cyanobacteria. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 55(1), 79-86. DOI:10.1590/s2175-97902019000217661

Baicha, Z., Salar-Garcia, M.J., Ortiz-Martínez, V.M., Hernandez-Fernandez, F.J., De los, Rios, A.P., Labjar, N., Lotfi, E., Elmahi, M., 2016. A critical review on microalgae as an alternative source for bioenergy production: A promising low-cost substrate for microbial fuel cells. *Fuel Processing Technology* 154(1), 104-116. DOI: 10.1016/j.fuproc.2016.08.017

Bashir, K.M.I., Cho, M.G., 2016. The effect of kanamycin and tetracycline on growth and photosynthetic activity of two chlorophyte algae. *Bio Medical Research International* 111-125. DOI:10.1155/2016/5656304

Belinger, E.G., Sigee, D.C., 2015. Freshwater Algae: Identification and use as bioindicators. John Wiley & Sons. 271 p.

Botelho, R.G., Christofoletti, C.A., Correia, J.E., Ansoar, Y., Olinda, R.A.D., Tornisielo, V.L., 2015. Genotoxic

responses of juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to florfenicol and oxytetracycline. *Chemosphere* 132(1), 206-212. DOI:10.1016/j.chemosphere.2015.02.053

Eguchi, K., Nagase, H., Ozawa, M., Endoh, Y.S., Got, K., Hirata, K., Miyamoto, K., Yoshimura, H., 2004. Evaluation of antimicrobial agents for veterinary use in the ecotoxicity test using microalgae. *Chemosphere* 57(11), 1733-1738. DOI:10.1016/j.chemosphere.2004.07.017

Falaise, C., Francois, C., Travers, M.A., Morga, B., Haure, J., Tremblay, R., Turcotte, F., Pasetto, P., Gastineau, R., Hardivillier, Y., Leignel, V., 2016. Antimicrobial compounds from eukaryotic microalgae against human pathogens and diseases in aquaculture. *Marine Drugs* 14(2), 159-186. DOI: 10.3390/md14090159

Fu, L., Huang, T., Wang, S., Wang, X., Su, L., Li, C., Zhao, Y., 2017. Toxicity of 13 different antibiotics towards freshwater green algae *Pseudokirchneriella subcapitata* and their modes of action. *Chemosphere* 168(1), 217-222. DOI:10.1016/j.chemosphere.2016.10.043

Geiger, E., Hornek-Gausterer, R., Saçan, M.T., 2016. Single and mixture toxicity of pharmaceuticals and chlorophenols to freshwater algae *Chlorella vulgaris*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 129(2), 189-198. DOI:10.1016/j.ecoenv.2016.03.032

Guo, J., Selby, K., Boxall, A.B., 2016. Comparing the sensitivity of chlorophytes, cyanobacteria, and diatoms to major-use antibiotics. *Environmental Toxicology and Chemistry* 35(10), 2587-2596. DOI:10.1002/etc.3430

Katzung, B.G., 2017. Basic and Clinical Pharmacology, 14e Ed. McGraw-Hill Education, New York, NY, 1265 p.

Khalaji, M., Hiseini, S., Ghorbani, R., Agh, N., Rezayi, H., 2019. Use of *Chlorella vulgaris* microalgae in the treatment of dairy wastewater. *International Journal of Hydrogen Energy* 12(2), 307-318. (In Persian)

Khuantrairong, T., Traichaiyaporn, S., 2012. Enhancement of carotenoid and chlorophyll content of an edible freshwater alga (Kai: *Cladophora* sp.) by supplementary inorganic phosphate and investigation of its biomass production. *Maejo International Journal of Science and Technology* 6(1), 1-11. DOI:10.14456/mijst.2012.1

Lavens, P., Sorgeloos, P., 1996. Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO Fisheries Technical. 295 p.

Liu, W., Ming, Y., Huang, Z., Li, P., 2012. Impacts of florfenicol on marine diatom *Skeletonema costatum* through photosynthesis inhibition and oxidative damages. *Plant Physiology and Biochemistry* 60(1), 165-170. DOI:10.1016/j.plaphy.2012.08.009

Martinez, M.E., Sanchez, S., Jimenez, J.M., El Yousfi, F., Munoz, L., 2000. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology* 73(1), 263-272. DOI: 10.1016/S0960-8524(99)00121-2

Nichols, H.W., 1973. Growth media – freshwater. In: Stein J.R., editor. Cambridge University Press, pp. 7-24.

Omori, M., Ikeda, T., 1984. Distribution and community structure. Methods in Marine Zooplankton Ecology. Wiley-Interscience Publication. pp. 253-279.

Parsons, T.R., Maita, Y., Lalli, C.M., 1984. A manual of chemical and biological methods for seawater analysis. Pergamon Press, Oxford.

Robinson, A.A., Belden, J.B., Lydy, M.J., 2005. Toxicity of fluoroquinolone antibiotics to aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal* 24(2), 423-430. DOI:10.1897/04-210R.1

Schwarzenbach, R.P., Escher, B.I., Fenner, K., Hofstetter, T.B., Johnson, C.A., Von Gunten, U., Wehrli, B., 2006. The challenge of micropollutants in aquatic systems. *Science* 313(5790), 1072-1077. DOI:10.1126/science.1127291

Sendra, M., Moreno-Garrido, I., Blasco, J., Araujo, C.V., 2018. Effect of erythromycin and modulating effect of CeO2 NPs on the toxicity exerted by the antibiotic on the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Phaeodactylum tricornutum*. *Environmental Pollution* 242(Part A, 1), 357-366. DOI:10.1016/j.envpol.2018.07.009

Seoane, M., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, A., 2014. Toxicity induced by three antibiotics commonly used in aquaculture on the marine microalga *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butch. *Marine Environmental Research* 101(1), 1-7. DOI:10.1016/j.marenvres.2014.07.011

Siedlewicz, G., Zak, A., Sharma, L., Kosakowska, A., Pazdro, K., 2020. Effects of oxytetracycline on growth and chlorophyll *a* fluorescence in green algae (*Chlorella vulgaris*), diatom (*Phaeodactylum tricornutum*) and cyanobacteria (*Microcystis aeruginosa* and *Nodularia spumigena*). *Oceanologia* 62(2), 214-225. DOI:10.1016/j.oceano.2019.12.002

Song, C., Wei, Y., Sun, J., Song, Y., Li, S., Kitamura, Y., 2019. Biodegradation and metabolic fate of thiamphenicol via *Chlorella* sp. UTEX1602 and L38. *Bioresource Technology* 296, 78-89. DOI:10.1016/j.biortech.2019.122320

Sukran, D., Tohit, G., Ridvan, S., 1998. Spectrophotometric determination of chlorophyll-a, b and total carotenoid contents of some algae species using different solvents. *Turkish Journal of Botany* 22(1), 13-17.

Taskan, E., 2016. Effect of tetracycline antibiotics on performance and microbial community of algal photo-bioreactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 179, 947-958. DOI: 10.1007/s12010-016-2042-7

Wise, R., 2002. Antimicrobial resistance: priorities for action. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 49(4), 585-586. DOI:10.1093/jac/49.4.585

Xie, X., Zhou, Q., Lin, D., Guo, J., Bao, Y., 2011. Toxic effect of tetracycline exposure on growth, antioxidative and genetic indices of wheat (*Triticum aestivum L.*). *Environmental Science and Pollution Research* 18(4), 566-575. DOI: 10.1007/s11356-010-0398-8

Xu, D., Xiao, Y., Pan, H., Mei, Y., 2019. Toxic effects of tetracycline and its degradation products on freshwater green algae. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 174(1), 43-47. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2019.02.063

Yang, W., Tang, Z., Zhou, F., Zhang, W., Song, L., 2013. Toxicity studies of tetracycline on *Microcystis aeruginosa* and *Selenastrum capricornutum*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 35(2), 320-324. DOI:10.1016/j.etap.2013.01.006