



Available online: <https://ijhe.tums.ac.ir>

مقاله پژوهشی

## زیست پالایی برخی هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای به‌وسیله کشت جلبک *Chlamydomonas reinhardtii* در یک پساب ساختگی از نفت خام

نوید احمدی<sup>۱</sup>، مژگان احمدی ندوشن<sup>۲\*</sup>، محمدهادی ابوالحسنی<sup>۱</sup>، سید عباس حسینی<sup>۳</sup>

- ۱- گروه محیط زیست، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران
- ۲- گروه محیط زیست، مرکز تحقیقات پسماند و پساب، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران
- ۳- گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

### چکیده

**زمینه و هدف:** وجود هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای (PAHs) در محیط زیست مشکل ایجاد می‌کنند زیرا وجود آنها اثرات مخربی بر انسان و حیوانات دارد. به‌طور کلی برای حذف آلاینده‌های نفت خام از آب، روش‌های مختلف تصفیه فیزیکوشیمیایی و بیولوژیکی در سراسر جهان به‌کار گرفته شده است. روش تصفیه بیولوژیکی با استفاده از باکتری‌ها، قارچ‌ها و جلبک‌ها اخیراً به دلیل کارایی و هزینه کمتر مورد توجه بسیاری قرار گرفته است. جلبک *Chlamydomonas reinhardtii* دارای ویژگی‌هایی مانند نرخ تکثیر بالا، قابلیت کشت در اکوسیستم‌های مختلف آبی است. در این مطالعه، به بررسی پاکسازی زیستی برخی هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای با استفاده از این جلبک پرداخته شده است.

**روش بررسی:** در این پژوهش، در مجموع ۱۲ نمونه پساب ساختگی نفتی در غلظت‌های ۲/۵، ۷/۵ و ۱۲/۵ g/L که با عنوان‌های C<sub>1</sub>، C<sub>2</sub> و C<sub>3</sub> نام‌گذاری شده‌اند تهیه شده است، برای اندازه‌گیری و تعیین محتوای ترکیبات PAHs در نمونه‌ها از روش کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی (GC-MS) استفاده شد. مقادیر اکسیژن مورد نیاز بیولوژیکی (BOD)، اکسیژن مورد نیاز شیمیایی (COD)، کربن آلی کل (TOC) و همچنین مقادیر کلروفیل آ و مقدار زیست توده به‌علاوه مقادیر نیترات و نیتريت نیز اندازه‌گیری شد. پردازش آماری داده‌ها نیز با استفاده از نرم‌افزار SAS 9/1 انجام شد.

**یافته‌ها:** نتایج بیانگر آن است در مقایسه ترکیبات هیدروکربنی ۳ ترکیب فناترن، فلورن و آنتراسن با ۱۰۰ درصد در تمامی غلظت‌ها در روز چهاردهم و ترکیب نفتالن به ترتیب با ۹۷/۸ درصد در غلظت ۲/۵ g/L و ۹۳ درصد در غلظت اولیه ۵/۷ g/L و ۹۲/۷ درصد در غلظت اولیه ۱۲/۵ g/L از نفت خام توسط جلبک کلامیدوموناس حذف شدند ( $p < 0.05$ ). در میان مواد مغذی در بین ترکیبات  $NO_3^-$ ،  $NO_2^-$  بیشترین میزان حذف در طول دوره برای ترکیب نیتريت در تیمار با غلظت ۲/۵ g/L از نفت خام (C<sub>1</sub>) مشاهده شد ( $p < 0.05$ ). بیشترین میزان زیست توده در تیمار (C<sub>3</sub>) گزارش شد ( $p < 0.05$ ). علاوه بر این، بیشترین میزان کاهش مقادیر BOD، با ۴۷/۴ درصد به تیمار C<sub>3</sub>، همچنین با میزان ۸۴ و ۹۴ درصد برای COD و TOC به تیمار C<sub>1</sub> تعلق داشته است ( $p < 0.01$ ).

**نتیجه‌گیری:** نتایج به خوبی نشان داد کشت جلبک کلامیدوموناس در پساب نفتی از نظر پتانسیل حذف مواد مغذی، ترکیبات هیدروکربنی، بهبود کیفیت آب و تولید زیست توده مناسب می‌تواند گزینه قابل قبولی جهت بهره‌برداری در فرایند تصفیه بیولوژیکی محیط‌های آلوده آبی باشد.

### اطلاعات مقاله:

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۲۴  
تاریخ ویرایش: ۱۴۰۱/۰۴/۲۵  
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۴/۲۹  
تاریخ انتشار: ۱۴۰۱/۰۶/۲۱

**واژگان کلیدی:** هیدروکربن نفتی حلقوی، کشت جلبک، کلامیدوموناس راینبهاری، پاکسازی زیستی

پست الکترونیکی نویسنده مسئول:  
m.ahmadi@khuisf.ac.ir

Please cite this article as: Ahmadi N, Ahmadi Nodushan M, Abolhasani MH, Hosseini SA. Bioremediation of selected polycyclic aromatic hydrocarbons by *Chlamydomonas reinhardtii* algae in synthetic crude oil wastewater. Iranian Journal of Health and Environment. 2022;15(2):261-74.

## مقدمه

مسئله آلودگی‌های محیطی ناشی از فعالیت‌های صنعتی و اجتماعی در سال‌های اخیر رو به گسترش بوده است به گونه‌ایی که وارد شدن این آلودگی‌ها به محیط زیست خطرات و آسیب‌های جبران ناپذیری برای موجودات زنده داشته است (۱). نفت خام به عنوان یک ماده با ارزش اقتصادی بالا به خصوص در کشور ما همواره مورد توجه بوده است. فعالیت‌های مرتبط با این صنعت از جمله استخراج، تصفیه و حمل و نقل به عنوان منبعی از تولید آلودگی شناخته شده هستند (۲). در بخش حمل و نقل نشت‌های نفتی ممکن است عمدتاً ناشی از آزاد کردن نفت خام از تانکرها، سکوهای دریایی، سکوهای حفاری و چاه‌ها و همچنین نشت محصولات نفتی پالایش شده و محصولات آنها، سوخت‌های سنگین‌تر مورد استفاده توسط کشتی‌های بزرگ و یا از طریق تخلیه پساب‌های نفتی به دریا مرتبط هستند (۳). هیدروکربن‌های آروماتیک و مشتقات آن از جمله آلاینده‌های بسیار خطرناک با سمیت بالا برای زندگی انسان، آزیان و دیگران موجودات هستند (۴).

در پالایش انواع پساب‌ها براساس میزان و نوع آلودگی می‌توان به صورت جداگانه یا به صورت ترکیبی می‌توان از روش‌های گوناگونی استفاده کرد. برای به دست آوردن یک سطح مطلوب حذف آلاینده، روش‌های تصفیه فاضلاب به انواع مختلفی تقسیم می‌شوند (۵).

ترکیبات آروماتیک به دلیل سمیت بالا و تجزیه پذیری کم از مهمترین آلاینده‌های آبی محسوب می‌شوند. روش‌های بسیاری جهت حذف این آلاینده‌ها از پساب‌های آلوده وجود دارد اما در سال‌های اخیر حذف زیستی و به کارگیری میکروارگانیسم‌ها به عنوان یک روش مناسب و همگام با محیط زیست مورد توجه قرار گرفته است (۶).

هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای (PAHs) آلاینده‌های محیطی قوی هستند که با حلقه‌های معطر ترکیب شده‌اند (۷). PAHs ها به علت احتراق ناقص چوب، ذغال سنگ و بنزین تشکیل شده‌اند. حضور PAHs ها در نفت خام، قطران و ذغال سنگ و آسفالت گزارش شده است. از عوامل اصلی آلودگی خاک و آب، انتشار هیدروکربن‌ها به شکل تصادفی و یا از طریق

فعالیت‌های انسانی است (۸). PAHs ها سمی، سرطان زا و جهش زا هستند، بنابراین حضور آنها در محیط نگرانی بسیار زیادی دارد و تاثیر زیان آوری بر سلامت انسان دارد. این ترکیبات به عنوان آلاینده‌های اولویت‌دار توسط آژانس حفاظت محیط زیست آمریکا در نظر گرفته شده‌اند و به طور مداوم در واحدهای صنعتی نظارت می‌شوند (۹).

با توجه به تأثیر متضاد آنها بر سلامت انسان و سایر موجودات در بیوسفر، تحقیقات برای حذف PAHs ها از محیط در حال انجام است. چندین روش فیزیکوشیمیایی را می‌توان برای حذف PAHs استفاده کرد. با این حال، زیست پالایی با استفاده از میکروارگانیسم‌ها یک روش با صرفه اقتصادی مناسب و سازگار با محیط زیست است (۱۰). گونه‌های ریزجلبک‌ها می‌توانند به طور بالقوه PAHs را از طریق مسیرهای متابولیکی بومی خود تخریب یا تبدیل کنند. با این حال، پتانسیل زیست تخریب پذیری آنها تحت اثر سمیت هیدروکربن‌های نفتی، شرایط محیطی نامطلوب، محدودیت‌های متابولیکی، ترکیب هیدروکربن، غلظت، نوع و تعداد میکروارگانیسم‌ها است (۱۱). ریزجلبک‌ها بخشی جدایی ناپذیر از تنوع میکروبی پساب هستند که می‌توانند نقش مهمی را در تصفیه پساب بازی کنند (۱۲). ریزجلبک‌ها طیف وسیعی از ارگانیسم‌ها را تشکیل می‌دهند که شامل ریزجلبک‌های اوتوتروف یوکاریوتی و سیانوباکتری‌های پروکاریوتی هستند که هر دو در داخل محیط آب‌های سطحی و دریایی، با طیف گسترده‌ای از تنوع در زیستگاه‌های مختلف توزیع داشته‌اند (۱۳).

جلبک *Chlamydomonas reinhardtii* یک جلبک تک یاخته و متحرکی است که در آب‌های شیرین مثل آبگیر، حوض، برکه و دریاچه زندگی می‌کند. تال (ساختار مورفولوژیک جلبک) هنگام مشاهده با میکروسکوپ، تخم مرغی شکل، دارای دو تاژک در ناحیه سر، یک کلروپلاست فنجانی شکل که حاوی پیرنوئید و لکه چشمی است. کلامیدوموناس را می‌توان منشا جلبک‌های سبز دانست (۱۴).

گونه *C. reinhardtii* دارای پروتئین و چربی زیادی بوده و ظرفیت بالایی در ارائه محصولات با ارزش افزوده دارد. همچنین این جلبک دارای قابلیت بسیار خوبی در تصفیه پساب‌ها، تثبیت

کشت جلبکی در ارلن مایر ۵۰۰ mL حاوی ۴۵۰ mL محلول کشت ۱۱ BG در دمای ۲۵ °C تحت فشار ثابت در یک انکوباتور با تکان ثابت ۱۵۰ rpm انجام شد. نوردهی توسط لامپ‌های فلورسنت سفید و روشن با شدت ۴۰۰۰ Lux با یک دوره روشنایی ۱۲ h و تاریکی ۱۲ h انجام شد (۲۰). جهت خالص‌سازی کلنی سلول‌های جلبک‌های مورد استفاده در این آزمایش، جلبک‌ها توسط سانتریفیوژ از محیط کشت در مرحله رشد نمایی جمع‌آوری و سه بار با آب مقطر شستشو داده شده و برای استفاده در ادامه آزمایشات در آب مقطر قرار گرفتند (۲۱).

کشت جلبک با نفت خام و معرفی تیمارهای آزمایش نفت خام با مقادیر جهت رقیق سازی به ظروف ارلن مایر ۵۰۰ mL طبق قاعده تعداد یکسان جلبک مقدار ۱۰ mL جلبک (۱۲۰۰۰ عدد سلول جلبکی) اضافه شد تا محیط کشت نفتی آماده شود. ظروف ارلن مایر در دمای ۲۵ °C با نرخ لرزش ثابت ۸۰ rpm در شرایط تاریکی انکوبه شدند. سپس در شرایط مشابه محیط کشت جلبک در مرحله قبلی قرار گرفتند. مقادیر جلبک و نفت خام تحت شرایط آزمایش و عناوین تیمارهای پژوهشی در جدول ۱ قابل مشاهده است (۲۲).

CO<sub>2</sub> و تولید بیودیزل است (۱۵).

جلبک‌های سبز سازگاری فوق العاده زیادی با انواع اکوسیستم‌های آبی دارند (۱۶). اهمیت این گروه از موجودات مربوط به تولید مواد آلی و قرار گرفتن در قاعده هرم غذایی و تولید انرژی است (۱۷). برخی گونه‌های جلبکی می‌توانند انواع مختلفی از هیدروکربن‌ها را تجزیه، اکسید و به اجزای کم ضررتری تبدیل کنند. این موضوع اشاره به پتانسیل آنها برای اصلاح نفت خام دارد (۱۸). با این حال، مطالعات بیشتری در مورد نقش سیستم‌های مختلف جلبکی مورد نیاز است تا درک بهتری از تاثیر جلبک بر تخریب هیدروکربن‌های نفتی خام ایجاد شود. بنابراین، در مطالعه حاضر هدف این است که کارایی جلبک *C.reinhardtii* در تصفیه پساب نفتی که آن را به عنوان یک محیط کشت در نظر گرفته مورد بررسی قرار گیرد.

## مواد و روش‌ها

### کشت جلبک

سویه جلبکی *C.reinhardtii* از کلکسیون جلبک دانشگاه منابع طبیعی و کشاورزی گرگان جداسازی شد. برای کشت این گونه جلبک از محیط کشت ۱۱ BG استفاده شد (۱۹).

جدول ۱- معرفی تیمارهای پژوهشی

عنوان اختصاری	میزان جلبک (تعداد سلولی)	غلظت نفت خام (g/L)	نام جلبک
C1	۱۲۰۰۰	۲/۵	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
C2	۱۲۰۰۰	۷/۵	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
C3	۱۲۰۰۰	۱۲/۵	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>

۱۰ min جدا شد. سپس ترکیب‌های هیدروکربنی (با نقطه جوش  $< 350^{\circ}\text{C}$ ) نمونه‌های آلوده به وسیله تقطیر جدا شدند. در نتیجه، نمونه‌ها توسط دستگاه گاز کروماتوگرافی با آشکارساز توده (Agilent) با ستون‌های کاپیلاری سیلیکا آنالیز شدند. حجم تزریق ۱ L بود. دمای اولیه  $50^{\circ}\text{C}$  بود و تا حدی گرم بود دمای نهایی  $270^{\circ}\text{C}$  در زمان ثابت ۷ min کمی سازی ترکیبات با استفاده از طیف‌های GC-MS انجام شد (۲۲). نرخ حذف ترکیبات نفتی براساس معادله ۲ محاسبه شد:

$$A = [(C_0 - C_1) C_0] \quad (2)$$

در جایی که A درصد پاکسازی ترکیبات سنگین توسط میکروجلبک،  $C_0$  و  $C_1$  به ترتیب نشان‌دهنده جرم کل نفت در محلول و جرم ترکیبات سبک نفتی است.

– آنالیز آماری داده‌ها

برای پردازش آماری داده‌ها از نسخه ۹/۱ نرم افزار SAS استفاده شد. به منظور بررسی نرمال بودن توزیع داده‌ها آزمون کلموگروف-اسمیرنوف به کار گرفته شده است. طرح کاملاً تصادفی در قالب فاکتوریل با دو فاکتور شامل فاکتور اول؛ نوع جلبک در یک گروه و فاکتور دوم سطوح غلظت در ۳ گروه و جهت بررسی روند حذف مواد در زمان، آزمون رگرسیون مورد استفاده قرار گرفت. رسم نمودارها نیز توسط نرم افزار Excel ۲۰۱۳ انجام گرفت.

## یافته‌ها

– بررسی مقادیر  $BOD$ ،  $COD$ ،  $TOC$  و پارامترهای رشد محتوای کلروفیل آ و عملکرد زیست توده به عنوان پارامترهای رشد جلبک و همچنین مقادیر پارامترهای کیفی آب که مطابق روش‌های ذکر شده در بخش مواد و روش اندازه‌گیری شدند در جدول ۲ و ۳ قابل مشاهده است.

– اندازه‌گیری نیترات و نیتريت

برای اندازه‌گیری مقادیر نیتريت، نیترات در درون پساب‌های نفتی از کیت‌های مربوطه و دستگاه فتومتر HACH DR ۲۸۰۰ استفاده شد که این اندازه‌گیری یک روز در میان با نمونه برداری از پساب‌ها انجام گرفت (۲۳).

– اندازه‌گیری  $TOC$ ،  $COD$ ،  $BOD$

برای آنالیز BOD براساس روش تیتراسیون یدومتری وینکلر انجام شد. پس از ۵ روز انکوباسیون در دمای  $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$  محاسبه شد. غلظت اکسیژن محلول اولیه ( $DO_i$ ) و در روز پنجم ( $DO_5$ ) با استفاده از ابزار اکسیژن Hanna، مدل (HI) تعیین شد (۲۴). اکسیژن مورد نیاز شیمیایی مطابق با روش دی کرومات پتاسیم با استفاده از دستگاه اسکپتروفتومتری انجام گرفت (۲۵).

همچنین برای اندازه‌گیری مقدار کل کربن آلی ( $TOC$ ) از استاندارد متد (B 59110) استفاده شد (۲۶).

– اندازه‌گیری بیومس و کلروفیل آ

وزن خشک زیست توده جلبکی براساس روش اندازه‌گیری کل مواد آلی معلق فرار (TVSS) محاسبه شد (۲۷).

برای تعیین مقدار کلروفیل آ، از هر تیمار یک میلی‌لیتر محلول جلبکی گرفته شد و به یک لوله سانتریفیوژ ۵ mL اضافه شد و به مدت ۵ min سانتریفیوژ شد. سپس سلول‌های جلبکی جدا شده با ۲ mL اتانول ۹۵ درصد به مدت ۲۴ h در تاریکی استخراج شدند. مقادیر جذب در طیف‌های ۶۶۵ و ۶۴۹ nm با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد و مقدار کلروفیل a براساس معادله ۱ محاسبه شد (۲۸).

$$A = 13/95A_{665} - 6/88A_{649} = \text{کلروفیل آ} \quad (1)$$

– اندازه‌گیری هیدروکربن‌های نفتی

در روزهای ۱، ۷ و ۱۴، ریزجلبک از محیط آلوده (نفت خام در آب رقیق سازی شده) با سانتریفیوژ در ۵۰۰۰ rpm به مدت

جدول ۲- اثر نفت خام بر محتوای کلروفیل آ و مقدار زی توده

پارامتر	نوع جلبک	روز						
		۱۴	۱۲	۱۰	۸	۶	۴	۲
کلروفیل آ (mg/L)	C1	۶/۱۳ <sup>Aa</sup> ±۰/۳	۵/۵۶ <sup>Ba</sup> ±۰/۴	۴/۲۳ <sup>Ca</sup> ±۰/۱	۴/۴ <sup>Ca</sup> ±۰/۱	۳/۶۵ <sup>Da</sup> ±۰/۱	۲/۱۲ <sup>Ea</sup> ±۰/۰.۸	۹/۱ <sup>Ea</sup> ±۰/۰.۶
	C2	۶/۱۳ <sup>Ab</sup> ±۰/۱	۵/۲۸ <sup>Ba</sup> ±۰/۳	۴/۰.۴ <sup>Cab</sup> ±۰/۱	۴ <sup>CDb</sup> ±۰/۴	۳/۱۳ <sup>EDab</sup> ±۰/۰.۱	۲/۱۱ <sup>Ea</sup> ±۰/۰.۸	۸/۱ <sup>Ea</sup> ±۰/۰.۳
	C3	۵/۱ <sup>Acdb</sup> ±۰/۶	۴/۳۷ <sup>Adbc</sup> ±۰/۳	۳/۳ <sup>Bd</sup> ±۰/۲	۲/۹۱ <sup>Bdc</sup> ±۰/۲	۲/۲۵ <sup>Ca</sup> ±۰/۲	۲/۱۱ <sup>Ca</sup> ±۰/۰.۸	۵/۱ <sup>Db</sup> ±۰/۰.۲
زی توده (mg/L)	C1	۰/۶۱ <sup>Aa</sup> ±۰/۰.۳	۰/۵۳ <sup>Ba</sup> ±۰/۰.۵	۰/۴۶ <sup>Ca</sup> ±۰/۰.۵	۰/۴۲ <sup>Ca</sup> ±۰/۰.۵	۰/۳۸ <sup>Cab</sup> ±۰	۰/۲ <sup>Da</sup> ±۰/۰.۱	۰/۲ <sup>Da</sup> ±۰/۰.۱
	C2	۰/۶۳ <sup>Acdb</sup> ±۰/۰.۷	۰/۵۶ <sup>Aa</sup> ±۰/۰.۴	۰/۳۶ <sup>Bcb</sup> ±۰/۰.۸	۰/۳۶ <sup>Bab</sup> ±۰/۰.۲	۰/۳۳ <sup>Ba</sup> ±۰/۰.۲	۰/۱۶ <sup>Cab</sup> ±۰/۰.۳	۰/۱۴ <sup>Cab</sup> ±۰/۰.۳
	C3	۰/۶۷ <sup>Acde</sup> ±۰/۰.۳	۰/۴۹ <sup>ABb</sup> ±۰	۰/۳۳ <sup>ABdcb</sup> ±۰/۰.۶	۰/۳۳ <sup>ABcab</sup> ±۰/۰.۶	۰/۲۶ <sup>CBab</sup> ±۰/۰.۵	۰/۱۶ <sup>Cab</sup> ±۰/۰.۳	۰/۱۴ <sup>Cab</sup> ±۰/۰.۳

حروف غیر مشترک (A, B, C و ...) بیانگر اختلاف معنی دار آماری ( $p < 0.05$ ) در مقادیر پارامتر مورد آزمایش در هر ردیف حروف غیر مشترک (a, b, c و ...) بیانگر اختلاف معنی دار آماری ( $p < 0.05$ ) در مقادیر پارامتر مورد آزمایش در هر ستون

این ترکیب آلی قادر به رشد مطلوب بوده است بیشترین مقدار کلروفیل در روز ۱۴ کشت برای تیمار C1 و C2 و همچنین بیشترین میزان زی توده در تیمار C3 مشاهده شد ( $p < 0.05$ ).

نتایج پارامترهای رشد حاکی از آن است که رشد جلبک در مقایسه با ابتدای دوره به طور معنی داری افزایشی از خود نشان داده است ( $p < 0.05$ ). در واقع این نمونه جلبکی، از نفت خام به عنوان منبع کربن استفاده نموده و در حضور

جدول ۳- اثر نفت خام بر مقادیر BOD, COD, TOC

پارامتر	نوع جلبک	روز						
		۱۴	۱۲	۱۰	۸	۶	۴	۲
BOD (mg/L)	C1	۳/۹ <sup>Ga</sup> ±۰/۴	۱۱/۷ <sup>Fa</sup> ±۱/۰.۵	۱۵ <sup>Ec</sup> ±۱/۱۲	۱۹/۳ <sup>Da</sup> ±۱/۳	۲۲/۵ <sup>Cc**</sup> ±۰/۳.۵	۲۸/۵ <sup>Ba</sup> ±۰/۴	۸۵/۸ <sup>Aa</sup> ±۳/۸
	C2	۷/۷ <sup>Ea</sup> ±۰/۰.۷۶	۲۲/۲ <sup>CDb</sup> ±۱/۰.۸	۲۳/۹ <sup>Da</sup> ±۱/۰.۴	۳۰/۵ <sup>Da</sup> ±۱/۰.۵۵	۳۸/۴ <sup>Ca</sup> ±۱/۶۳	۴۰/۴ <sup>Bab</sup> ±۱/۴۸	۶۲/۵ <sup>Ab</sup> ±۲/۱۸
	C3	۱۰ <sup>Ea</sup> ±۰/۶	۲۹ <sup>Deb</sup> ±۱/۰.۳	۴۹/۸ <sup>Cb</sup> ±۰/۸۳	۵۱ <sup>CBa</sup> ±۰/۸	۶۰/۲ <sup>Bb</sup> ±۲/۰.۵	۶۱/۱ <sup>Bb</sup> ±۱/۸	۱۰۲/۴ <sup>Aa</sup> ±۳/۴
COD (mg/L)	C1	۱۱/۶ <sup>Fa</sup> ±۰/۲۱	۱۶/۹ <sup>Ea</sup> ±۰/۴۲	۳۱/۴ <sup>Db</sup> ±۰/۵۳	۳۱/۵ <sup>Db</sup> ±۱/۰.۵	۵۹/۹ <sup>Cb</sup> ±۱/۸	۶۲/۷ <sup>Bc</sup> ±۰/۶	۱۵۲/۸ <sup>Ba</sup> ±۰/۸
	C2	۲۱ <sup>Fa</sup> ±۱/۳۱	۲۹ <sup>Ea</sup> ±۱/۶۹	۲۹/۳ <sup>Db</sup> ±۱/۷۷	۳۲/۶ <sup>Db</sup> ±۱/۵۴	۶۹/۴ <sup>Db</sup> ±۳	۷۴/۴ <sup>Cb</sup> ±۰/۶	۲۶۵/۵ <sup>Bb</sup> ±۲/۸۴
	C3	۲۵/۳ <sup>Fa</sup> ±۰/۵	۳۷/۴ <sup>Ea</sup> ±۰/۹۵	۴۸/۹ <sup>Db</sup> ±۰/۶۲	۴۹/۴ <sup>Db</sup> ±۲	۹۹/۵ <sup>Cb</sup> ±۱/۰.۴	۱۰۷/۸ <sup>Cb</sup> ±۱/۸۱	۲۹۱/۱ <sup>Ba</sup> ±۰/۹
TOC (mg/L)	C1	۵/۲ <sup>Fb</sup> ±۰/۵	۵/۵ <sup>Fa</sup> ±۰/۵۲	۶/۴ <sup>Eda</sup> ±۰/۵	۱۰/۹ <sup>Ea</sup> ±۰/۷۸	۱۷/۹ <sup>Db</sup> ±۱/۰.۸	۲۹/۹ <sup>Cda</sup> ±۱/۶۷	۴۰/۴ <sup>Aa</sup> ±۰/۶
	C2	۶/۱ <sup>Fa</sup> ±۰/۴	۸/۲ <sup>Eb</sup> ±۰/۴۷	۱۱/۸ <sup>Cb</sup> ±۱/۱	۱۳/۹ <sup>Cdb</sup> ±۰/۸	۲۲/۲ <sup>Bcab</sup> ±۰/۶۴	۲۳/۳ <sup>Bb</sup> ±۳/۱	۴۳/۹ <sup>Ab</sup> ±۰/۱۲
	C3	۸/۲ <sup>Fa</sup> ±۰/۸۶	۹/۳ <sup>Ea</sup> ±۰/۹	۱۰ <sup>Eda</sup> ±۱/۱۲	۱۸/۵ <sup>Db</sup> ±۰/۸	۲۹/۶ <sup>Bcc</sup> ±۱/۲	۳۶/۷ <sup>Bcb</sup> ±۲/۲	۴۸ <sup>Ac</sup> ±۰/۶

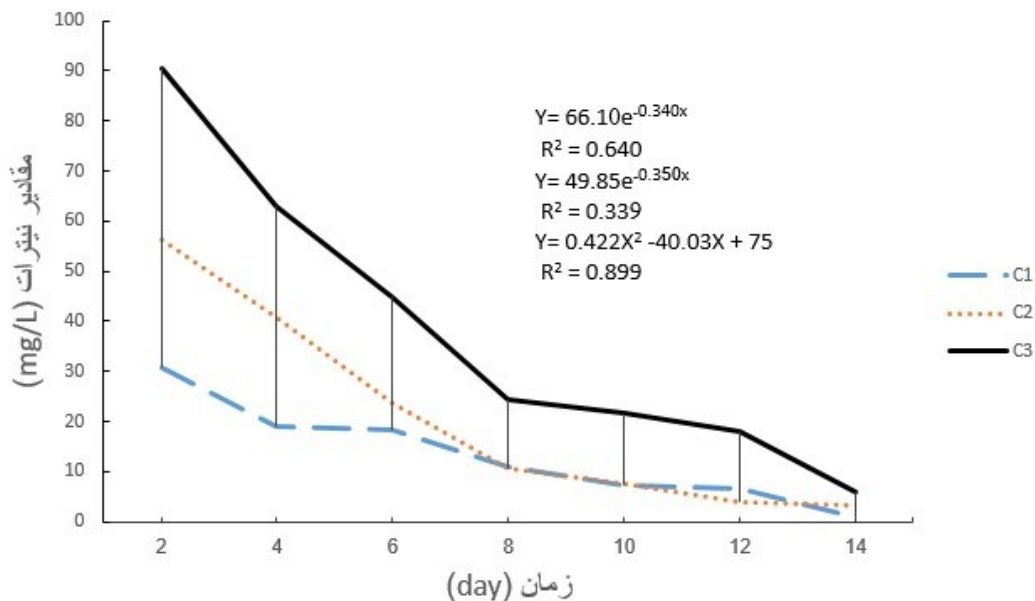
حروف غیر مشترک (A, B, C و ...) بیانگر اختلاف معنی دار آماری ( $p < 0.05$ ) در مقادیر پارامتر مورد آزمایش در هر ردیف حروف غیر مشترک (a, b, c و ...) بیانگر اختلاف معنی دار آماری ( $p < 0.05$ ) در مقادیر پارامتر مورد آزمایش در هر ستون

پساب‌های ساختمانی قابل مشاهده است در میان تیمارها، در انتهای دوره کشت کمترین میزان حضور نیترات با میزان  $1/4$  و  $0/3 \text{ mg/mL}$  در تیمار C1 مشاهده شد ( $p < 0/01$ ).

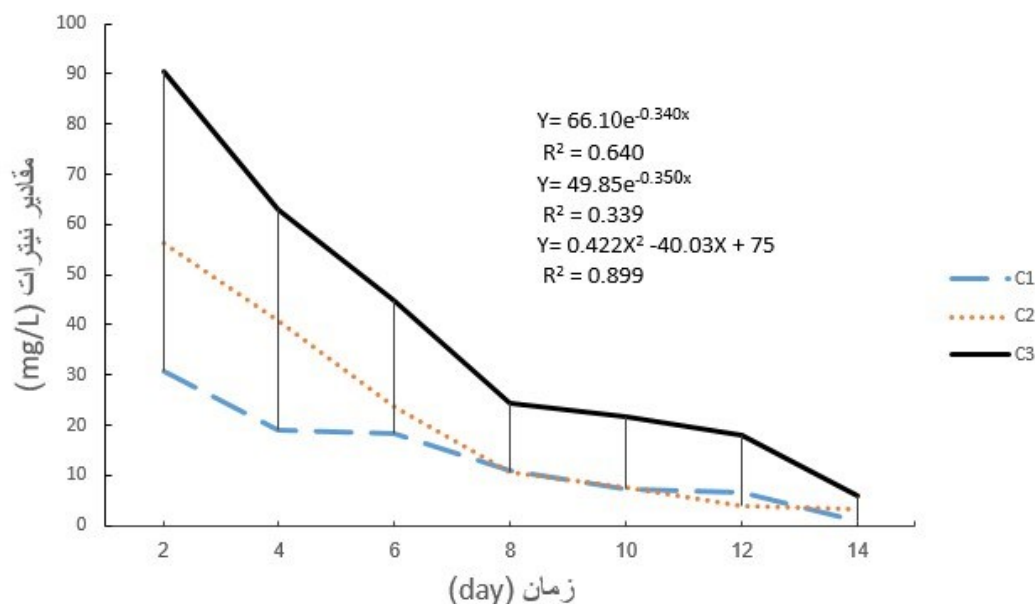
در میان مواد مغذی در بین ترکیبات  $\text{NO}_2^-$  و  $\text{NO}_3^-$  بیشترین میزان حذف در طول دوره برای ترکیب نیتريت در تیمار C1 نشان داده شد ( $p < 0/01$ ).

مقدار  $\text{BOD}_5$  و COD در تیمار C1 با میزان  $95/8$  و  $95/1$  درصد بیشترین میزان کاهش را داشته است در بین 3 تیمار نیز مقدار TOC در تیمار C1 با میزان  $87$  درصد در بین سایر تیمارهای بالاترین میزان کاهش را نشان داده شده است.

نیتريت و نیترات در نمودارهای 1 و 2 روند تغییرات میزان مواد مغذی در



نمودار ۱- روند حذف نیترات در طول زمان در جلبک کلامیدوموناس



نمودار ۲- روند حذف نیتريت در طول زمان در جلبک کلامیدوموناس

– هیدروکربن‌های نفتی اثر زیست پالایی بوسیله جلبک بر روی میزان برخی هیدروکربن‌های نفتی براساس آنالیز دستگاهی محاسبه و نتایج در جدول ۴ قابل مشاهده است.

جدول ۴- تغییرات هیدروکربن‌های نفتی

پارامتر	جلبک در غلظت مختلف	روز اول	روز هفتم	روز چهاردهم
نفتالن (ppm)	C1	$4/7^{Af} \pm 0/1$	$1^{Ba} \pm 0$	$0/1^{Ba} \pm 0$
	C2	$8/6^{Acd} \pm 0/1$	$1/4^{Ba} \pm 0$	$0/6^{Ba} \pm 0$
	C3	$9/6^{Ab} \pm 0/1$	$1/6^{Ba} \pm 0$	$0/7^{Ba} \pm 0$
فلورن (ppm)	C1	$5/3^{Aa} \pm 0/1$	$0^{Ba} \pm 0$	$0^{Ba} \pm 0$
	C2	$5/8^{Aac} \pm 0/1$	$0/1^{Ba} \pm 0$	$0^{Ba} \pm 0$
	C3	$11^{Ac} \pm 0/1$	$0/2^{Ba} \pm 0$	$0^{Ba} \pm 0$
فنانترون (ppm)	C1	$3/4^{Ad} \pm 0/1$	$0/1^{Ba} \pm 0$	$0^{Ba} \pm 0$
	C2	$4/7^{Ab} \pm 0/1$	$0/2^{Ba} \pm 0$	$0^{Ba} \pm 0$
	C3	$4/7^{Ab} \pm 0/1$	$0/3^{Bab} \pm 0$	$0^{Ba} \pm 0$
آنتراسن (ppm)	C1	$2/3^{Acd} \pm 0/1$	$0^{Ba} \pm 0$	$0^{Ba} \pm 0$
	C2	$2/5^{Ac} \pm 0/1$	$0/2^{Ba} \pm 0$	$0^{Ba} \pm 0$
	C3	$2/6^{Acd} \pm 0/1$	$0/1^{Ba} \pm 0$	$0^{Ba} \pm 0$

حروف غیر مشترک (A, B, C و ...) بیانگر اختلاف معنی‌دار آماری ( $p < 0/05$ ) در مقادیر پارامتر مورد آزمایش در هر ردیف حروف غیر مشترک (a, b, c و ...) بیانگر اختلاف معنی‌دار آماری ( $p < 0/05$ ) در مقادیر پارامتر مورد آزمایش در هر ستون

### بحث

تجزیه زیستی هیدروکربن‌ها به مقدار و ماهیت هیدروکربن موجود و همچنین شرایط محیطی بستگی دارد. تخریب PAH به عوامل فیزیکی و شیمیایی مختلفی مانند وزن مولکولی، غلظت، دما و در دسترس بودن مواد مغذی بستگی دارد. تخریب PAH درجا توسط میکروارگانیسم‌ها تحت تاثیر دما قرار می‌گیرد. با انتخاب رنج مناسب دمایی قابلیت دسترسی زیستی، قابلیت انحلال و سرعت نفوذ افزایش می‌یابد که افزایش فرایند تجزیه زیستی را به دنبال خواهد داشت. در

با توجه به نتایج جدول ۴ در بین چهار تیمار مورد آزمایش ترکیبات فلورن، فنانترون و آنتراسن در کل تیمارهای کل‌امیدوموناس در تمامی غلظت‌ها با ۱۰۰ درصد راندمان، بیشترین مقدار کاهش در محیط کشت دیده شد. در تمامی تیمارها در محیط کشت روند کاهشی در روز هفتم نسبت به روز اول معنی‌دار بوده است ( $p < 0/05$ ). با توجه به نتایج به دست آمده مقادیر آنتراسن فلورن و فنانترون در بین روزهای هفتم تا چهاردهم اختلاف معنی‌داری نشان نداده است ( $p < 0/05$ ).

گونه سیانو باکتری *Sphingomonas sp* جهت حذف هیدروکربن‌های نفتی چند حلقه‌ای مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که این ریز جلبک قادر است در شرایط بدون نور و هیچ گونه تغییر در ساختار برخی از هیدروکربن‌ها با ساختار پیچیده‌تر از جمله فنل اتفاق نیفتاد. اگرچه این سیانوباکتری در دیگر هیدروکربن‌های آروماتیک ساده‌تر از جمله نانو دکان و ایکوزان عملکرد مناسبی داشته است (۳). در تحقیقی که Arias و همکاران (۲۰۱۶) با هدف بررسی قابلیت تجزیه سه ترکیب پیرن، فلورانتن و فنانتن با استفاده از جلبک سندسموس تحت شرایط تنش شوری در غلظت‌های مختلف نفتی انجام شد، قابلیت حذف این ترکیبات تا ۷۰ درصد به خوبی نشان داده شد (۳۲).

ترکیبات حلقوی سطح تماس بیشتری نسبت به زنجیره باز دارند و بنابراین فعل و انفعالات بین مولکولی آن قوی‌تر است. هیدروکربن‌های نفتی بر چگالی، اسیدیته، هدایت الکتریکی، ماده آلی و کربن آلی کل اثرگذار هستند. نتیجه این است که نقاط جوش و ذوب آنها بیشتر است (۳۳). به همین دلیل می‌توان اختلافات زیادی را در شاخص‌های شکست یا تجزیه آنها در محیط‌های مختلف مشاهده کرد. میکروارگانیسم‌ها پاسخ‌های فیزیولوژیک متفاوتی در برخورد با ترکیبات هیدروکربنی دارند. از طرفی غلظت‌های پایین نفتی موجب افزایش نفوذپذیری غشاء می‌شوند در حالی که غلظت‌های بالای هیدروکربن‌های نفتی در نفوذپذیری غشاء اختلال ایجاد می‌کنند (۳۴). با توجه به این نکات می‌توان نتیجه گرفت بخشی از تفاوت در میزان جذب و عملکرد میکروارگانیسم‌ها در حذف هیدروکربن‌های نفتی در این پژوهش به ساختار فیزیولوژیکی جلبک‌ها و خصوصیات شیمیایی ترکیبات نفتی بر می‌گردد.

نتایج حاصل از انجام گاز کروماتوگرافی در تشخیص میزان توانمندی این جلبک در تجزیه غلظت‌های پایین نفتی نفت خام نیز نتایج حاصل از دیگر پژوهش‌ها را تایید می‌کند. به طور مثال El-Sheekh در سال ۲۰۱۳ به بررسی توانایی تجزیه نفت خام توسط دو جلبک سبز *S.obliquus* و *C.vulgaris* پرداخت. نتایج نشان داد بیشترین میزان تجزیه

پژوهش حاضر براساس بررسی مطالعات گذشته دمای محیط بین ۲۰ تا ۲۲ °C تنظیم شد. Bartha و همکاران (۲۰۰۰) گزارش کرده‌اند که بیشترین تخریب هیدروکربن‌ها در دمای ۲۵ تا ۳۰ °C در محیط‌های خاکی، ۲۰ تا ۲۵ °C در آب شیرین و ۱۵ تا ۲۰ °C در محیط‌های دریایی رخ می‌دهد (۲۹). Siron و همکاران، بیشترین تجزیه نفتالن و فنانتن از نفت خام در آب در دمای ۲۰ °C به ترتیب با مقدار حذف ۵۰ درصد و ۶۰ درصد بود (۳۰).

براساس نتایج بدست آمده، درصد حذف هیدروکربن‌های نفتی فلورن، فنانتن و آنتراسن در تیمار C1، C2، C3 در روز ۱۴ به ۱۰۰ درصد رسید ( $p < 0/05$ ). برخی از ترکیبات موجود در نفت را می‌توان با میکروارگانیسم‌ها، در نتیجه کاهش میزان متابولیسم آنها، مهار کرد. با این حال، ترکیبات با ساختار ساده‌تر (فلورن) و هیدروکربن‌های دیگر به عنوان مثال فنانتن و آنترسن با ۱۰۰ درصد راندمان در غلظت اولیه ۰/۵ g در ۱۰۰ mL نفت خام به طور موثری توسط میکروارگانیسم‌های موجود در آب پاکسازی شدند ( $p < 0/01$ ) بررسی نتایج گویای آن است که جلبک کلامیدوموناس در مواجهه با هیدروکربن‌های با حلقه‌های پایین‌تر عملکرد کاملاً مناسبی داشته است. در حالی که جلبک تا روز هفتم در غلظت‌های بالاتر میزان بالایی از هیدروکربن‌های نفتی را به عنوان یک منبع تغذیه‌ای استفاده کرده با این حال پس از این زمان از قدرت تجزیه‌کنندگی آن کاسته شده است. یکی از دلایل توقف روند رشدی را می‌توان به رسیدن به فاز ثابت جلبک دانست با توجه به مطالعات گذشته ریزجلبک‌ها به برخی آلاینده‌های آلی سمی حساس هستند، به طوری که در تحقیقی Wang و همکاران (۲۰۲۰) روی دو گونه جلبک *Microcystis aeruginosa* و *Chlorella pyrenoidosa* انجام دادند. نتایج آنها نشان می‌دهد جلبک کلرلا مقاومت در برابر ۱۰ mg/L از ترکیب فنانتن را از خود نشان نداده است این درحالی است که جلبک آرجینوزا تا غلظت‌های بالاتر دارای مقاومتی خوبی در برابر آلاینده‌های آلی از خود نشان داده است (۳۱).

در تحقیقی دیگر، Chen و همکاران (۲۰۰۸) توانایی یک

به طور مثال، Hassanzadeh و همکاران (۲۰۱۶) ۹۸ درصد کاهش فعالیت فتوسنتز را در غلظت ۰ تا ۳۰ mg/L را گزارش داده‌اند. در تحقیق آنها اشاره شده غلظت بالای اکسیژن می‌تواند دلیل خوبی بر حذف کامل آلاینده‌ها باشد (۳۹). کربن یک از مواد مغذی مورد نیاز جهت در ریزجلبک‌ها است. به همین خاطر از اکسیداسیون بیولوژیکی ماده آلی، برای کاهش بیشتر TOC و COD می‌توان بهره برد. نتایج حاصل از روند تغییرات میزان کربن آلی در کل دوره کشت نشان می‌دهد به طور پیوسته و معنی‌داری در هر ۳ سطح غلظتی میزان کربن کاهش یافته است ( $p < 0/05$ ). در تایید این موضوع در تحقیقی که Labbe و همکاران (۲۰۱۷) در ارتباط با استفاده از جلبک‌ها در بهبود فرایند تصفیه انجام داده‌اند تمامی پارامترهای کیفی آب به طور مناسبی کاهش پیدا کرده‌اند (۴۰).

مواد مغذی نقش حیاتی در تجزیه موفقیت‌آمیز PAHS ها دارند برای تجزیه زیستی کارآمد، رشد و نسبت متابولیسم سلولی فسفر، نیتروژن و کربن بسیار حیاتی است. با این حال، غلظت بالاتر مواد مغذی نیز می‌تواند تاثیر منفی بر قابلیت تجزیه زیستی داشته باشد. بنابراین برخی مواد مغذی می‌توانند به یک عامل محدود کننده موثر بر فرایند تخریب تبدیل شوند (۴۱). طبق نتایج بدست آمده از مقادیر نترات و نیتريت بیشترین میزان حذف در طول دوره برای ترکیب نیتريت در تیمار با غلظت ۲/۵ g/L از نفت خام (C۱) مشاهده شد. نیتروژن به شکل نترات در سلول‌های میکروجلبک جذب می‌شود و به عنوان یک منبع مغذی برای افزایش رشد جلبکی مورد استفاده قرار می‌گیرد. رشد بالاتر زیست توده حاصل در شرایط حضور ترکیبات نیتروژنی ممکن است ناشی از دخالت آن در تشکیل دی ان ای همراه با افزایش رشد باشد. رشد مناسب زیست توده جلبکی با ترکیب فسفر و کربن ممکن است به خاطر عملکرد منحصر به فرد هر دو ماده مغذی در تسهیل تقسیم سلولی سلول‌های جلبکی باشد (۴۲). از طرفی ترکیب‌های نیتروژن فسفر و کربن در محیط‌های آبی برای رشد ضروری هستند. از طرف دیگر این اجزا منجر به تشکیل فیبرهای رشد و بافت‌ها می‌شوند در نتیجه به بهبود رشد ریز

توسط این دو جلبک در حضور ۰/۵ و ۱ درصد نفت خام بوده است (۲۱).

به طور قابل توجهی، محتوای کلروفیل آ، مقدار زی توده به طور متناوب تا انتهای دوره افزایش داشته است. به بیان دیگر، جلبک با ورود به فاز لگاریتمی با افزایش رشد مواجه شده است. این در شرایطی است که، بعد از روز ۷ در مقادیر بالاتر از غلظت‌های نفتی، رشد جلبک با محدودیت روبرو شده است. در راستای این نتایج، مکانیسم متابولیک سلول‌های جلبکی سندسموس رشد یافته در غلظت‌های مختلف نفت توسط Geu و همکاران (۲۰۱۴) در مطالعات قبل مورد بررسی قرار گرفته‌اند. نتایج پژوهش آنها نشان داد که هر دو عامل نرخ بالای نفتی و کاهش اکسیژن زیستی در محیط کشت می‌تواند رشد جلبک را مهار می‌کند (۳۵). اشاره به این نکته لازم است که، علاوه بر رنگیزه‌های فتوسنتزی اصلی، ریزجلبک‌های حاوی رنگیزه‌های فتوسنتزی کمکی نیز با استفاده از انرژی نوری، تجزیه زیستی را در شرایط اتوتروفی بهبود می‌بخشند (۳۶). مقدار وزن ماده خشک در تیمار C۱ و C۲ با یکدیگر همبستگی معنی‌داری نداشته است ( $p < 0/05$ ) با نگاهی دقیق‌تر به موضوع، در نتایج مشابه‌ایی نیز در کشت جلبک سندسموس در یک پساب مصنوعی توسط Li و همکاران (۲۰۱۱) نشان داده شد که حداکثر عملکرد زیست توده جلبکی با افزایش دما و غلظت نفت بهبود یافته است، اما وقتی دما از ۲۰ °C و غلظت از ۳ mg/L تجاوز کرد، بهبود حداکثر عملکرد زیست توده معنی‌دار نبود (۳۷).

کارایی میکروجلبک‌ها در بهبود کیفیت آب در پساب‌ها در مطالعات مختلف نشان داده شده است (۱۲).

با توجه به نتایج بیشترین میزان کاهش مقادیر BOD، با ۹۵/۸ درصد، همچنین با میزان ۹۵/۱ درصد و ۸۷ درصد برای COD و TOC به تیمار C۱ تعلق داشته است ( $p < 0/05$ ). از مقایسه روز ۱ و ۱۴ در نسبت میزان کاهش COD و BOD اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ( $p < 0/01$ ) غلظت بالای اکسیژن به دلیل شدت بخشیدن به فتواکسیداسیون می‌تواند باعث صدمه به سلول‌های ریزجلبک شود (۳۸).

آروماتیک چند حلقه‌ای (PAH) به وسیله جلبک *Chlamydomonas reinhardtii* در یک پساب ساختگی از نفت خام انجام شد. نتایج بدست آمده نشان داد بیشترین نرخ حذف زیستی هیدروکربن‌های نفتی با ۱۰۰ درصد راندمان در ۳ ترکیب فلورن، فنانترن و آنتراسن هر سه غلظت تیمارها C<sub>۱</sub>، C<sub>۲</sub>، C<sub>۳</sub> مشاهده شد. همچنین بیشترین میزان کاهش مقادیر BOD، با ۹۵/۸ و ۹۵/۱ و ۸۷ درصد به ترتیب برای COD و TOC به تیمار C<sub>۱</sub> تعلق داشته است. شواهد این پژوهش نشان می‌دهد افزایش نرخ زیست توده و کلروفیل آ و بهبود کیفی پارامترهای آب بدان معنی است که گونه‌های جلبکی می‌توانند از ترکیبات آلی موجود در نفت خام به عنوان ماده مغذی استفاده کنند. با این وجود سمیت برخی ترکیبات شیمیایی نفتی می‌تواند از عوامل بازدارنده نرخ رشد محسوب شود. با این حال، تحقیقات بیشتری در این زمینه لازم است.

### ملاحظات اخلاقی

نویسندگان کلیه نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را در این مقاله رعایت کرده‌اند.

### تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از رساله دکتری تخصصی محیط زیست مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان با عنوان "ارزیابی کارایی دو جلبک *Chlamydomonas reinhardtii* و *Scenedesmus obliquus* در فرآیند تصفیه بیولوژیکی آلاینده‌های نفتی" و با کد ۱۶۲۲۹۷۶۰۰ است.

جلبک کمک کنند. نتایج آزمایشات نشان می‌دهد از روز ۱۰ تا انتهای دوره کشت در غلظت‌های ۵/۷ و ۱۲/۵ g/L نفتی مقدار حذف زیستی نیتريت و نیترات در تیمارها به طور یکسان کاهش پیدا کرده است ( $p < 0.05$ ). Ansari و همکاران (۲۰۱۷) تصفیه پساب را به کمک جلبک‌های محلی برای تولید سوخت زیستی مورد مطالعه قرار دادند آنها مشاهده کردند جلبک‌های *sp. Chlorella* و *sp. Scenedesmus* به ترتیب قادر به حذف ۹۹/۷ و ۹۸/۲ درصد نیترات، و ۸۰/۵ و ۷۰ درصد فسفات هستند (۴۳). در مطالعه‌ای که توسط Alemu و همکاران (۲۰۱۸) بر روی بررسی حذف نیتروژن و فسفات از فاضلاب شهری به کمک ریزجلبک‌ها صورت گرفت جلبک‌های کلرلا، کلامیدوموناس، سندسموس از رده کلروفیتا جز گونه‌های غالب اعلام شدند. حداکثر حذف TN و TP به ترتیب ۹۱/۷۰ و ۸۱/۸۲ درصد بود (۴۴).

نتایج نشان می‌دهد که ریزجلبک از کربن برای رشد به خوبی استفاده می‌کند. در مقابل در حذف برخی از ترکیبات حلقوی همچون نفتالن در غلظت‌های بالا با محدودیت مواجه می‌شود. علاوه بر این میزان کربن مصرفی در طی ۷ روز به طور پیوسته افزایش یافت. در همین حال، در این مرحله، جلبک مکمل‌های غذایی (به عنوان مثال کربن نیتروژن و فسفر) را نیز از منبع نفتی دریافت کرده، بنابراین ممکن است به دلیل کاهش این سه ماده غذایی ریزجلبک توانسته با موفقیت رشد خود را تا پایان دوره به تدریج حفظ کند.

### نتیجه گیری

این مطالعه با هدف بررسی حذف برخی هیدروکربن‌های

## References

1. Boufadel M, Geng X, An C, Owens E, Chen Z, Lee K, et al. A Review on the Factors Affecting the

Deposition, Retention, and Biodegradation of Oil Stranded on Beaches and Guidelines for Designing Laboratory Experiments. *Current Pollution Reports*. 2019;5(4):407-23.

2. Tezcan Demirel Y, Yati I, Donmez R, Bulbul Sonmez H. Clean-up of oily liquids, fuels and organic solvents from the contaminated water fields using poly(propylene glycol) based organogels. *Chemical Engineering Journal*. 2017;312:126-35.
3. Chen J, Wong MH, Wong YS, Tam NF. Multi-factors on biodegradation kinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by *Sphingomonas* sp. a bacterial strain isolated from mangrove sediment. *Marine Pollution Bulletin*. 2008;57(6-12):695-702.
4. Zubillaga A, Soto LA, Salcedo DL, Botello AV. Presence of Oil Mineral Aggregates (OMAs) in Surface Sediments from Mexico's Exclusive Economic Zone, NW Gulf of Mexico. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 2018;101(2):173-77.
5. Zhang E, Wang B, Wang Q, Zhang S, Zhao B. Ammonia-nitrogen and orthophosphate removal by immobilized *Scenedesmus* sp. isolated from municipal wastewater for potential use in tertiary treatment. *Bioresource Technology*. 2008;99(9):3787-93.
6. Chen H, An W, You Y, Lei F, Zhao Y, Jianwei I. Numerical study of underwater fate of oil spilled from deepwater blowout. *Ocean Engineering*. 2015;110:227-43.
7. Vila J, Grifoll M. Actions of *Mycobacterium* sp. Strain AP1 on the Saturated- and Aromatic-Hydrocarbon Fractions of Fuel Oil in a Marine Medium. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009;75(19):6232-39.
8. Fetzer J. The chemistry and analysis of large PAHs. *Polycyclic Aromatic Compounds*. 2007;27:143-62.
9. Holliger C, Gaspard S, Glod G, Heijman C, Schumacher W, Schwarzenbach RP, et al. Contaminated environments in the subsurface and bioremediation: organic contaminants. *FEMS Microbiology Reviews*. 1997;20(3-4):517-23.
10. Venkatesagowda B, Pugazhendi A, Ebenezer P. Enzymatic bioremediation of polyaromatic hydrocarbons by fungal consortia enriched from petroleum contaminated soil and oil seeds. *Journal of Environmental Biology / Academy of Environmental Biology, India*. 2014;35:521-29.
11. Ahmad S, Pandey A, Pathak VV, Tyagi VV, Kothari R. Phycoremediation: Algae as eco-friendly tools for the removal of heavy metals from wastewaters. In: Bharagava RN, Saxena G, editors. *Bioremediation of industrial waste for environmental safety: Volume II: Biological agents and methods for industrial waste management*. Singapore: Springer Singapore; 2020. p. 53-76.
12. Steffy DA, Nichols AC, Morgan LJ, Gibbs R. Evidence that the deepwater horizon oil spill caused a change in the nickel, chromium, and lead average seasonal concentrations occurring in sea bottom sediment collected from the eastern Gulf of Mexico continental shelf between the years 2009 and 2011. *Water, Air, & Soil Pollution*. 2013;224(11):1756.
13. Prathima Devi M, Venkata Subhash G, Venkata Mohan S. Heterotrophic cultivation of mixed microalgae for lipid accumulation and wastewater treatment during sequential growth and starvation phases: Effect of nutrient supplementation. *Renewable Energy*. 2012;43:276-83.
14. Abdel-Hameed M. Effect of algal density in bead, bead size and bead concentrations on wastewater nutrient removal. *African Journal of Biotechnology*. 2007;6(10):1185-91.
15. Milledge JJ, Heaven S. Methods of energy extraction from microalgal biomass: a review. *Reviews in Environmental Science and Bio-Technology*. 2014;13(3):301-20.
16. Abolhasani Mh, Hosini Sa, Ghorbani R, Vince O. Phosphate and nitrate removal from municipal wastewater by algae *Scenedesmus obliquus* cultivation and production of algal biomass. *Journal of Aquatic Ecology*. 2016;5(4):33-39.
17. Riaño B, Molinuevo B, García-González MC. Treatment of fish processing wastewater with

- microalgae-containing microbiota. *Bioresource Technology*. 2011;102(23):10829-33.
18. Rippka R, Deruelles J, Waterbury JB, Herdman M, Stanier RY. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Microbiology*. 1979;111(1):1-61.
  19. Chong AM, Wong YS, Tam NF. Performance of different microalgal species in removing nickel and zinc from industrial wastewater. *Chemosphere*. 2000;41(1-2):251-57.
  20. Chawla P, Malik A, Sreekrishnan TR, Dalvi V, Gola D. Selection of optimum combination via comprehensive comparison of multiple algal cultures for treatment of diverse wastewaters. *Environmental Technology & Innovation*. 2020;18:100758.
  21. El-Sheekh MM, Hamouda RA, Nizam AA. Biodegradation of crude oil by *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella vulgaris* growing under heterotrophic conditions. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2013;82:67-72.
  22. Xaaldi Kalhor A, Movafeghi A, Mohammadi-Nassab AD, Abedi E, Bahrami A. Potential of the green alga *Chlorella vulgaris* for biodegradation of crude oil hydrocarbons. *Marine Pollution Bulletin*. 2017;123(1):286-90.
  23. Delgadillo-Mirquez L, Lopes F, Taidi B, Pareau D. Nitrogen and phosphate removal from wastewater with a mixed microalgae and bacteria culture. *Biotechnology reports (Amsterdam, Netherlands)*. 2016;11:18-26.
  24. Premila VE, Rao MU. Effect of crude oil on the growth and reproduction of some benthic marine algae of Visakhapatnam coastline. *Indian Journal of Marine Sciences*. 1997;26:195-200.
  25. Tonghui X, Jing L, Kaifeng D, Bin L. Enhanced Biofuel Production from High-Concentration Bioethanol Wastewater by a Newly Isolated Heterotrophic Microalga, *Chlorella vulgaris* LAM-Q. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2013;23(10):1460-71.
  26. Tunali Akar S, Çabuk A, Akar T. Removal of Lead and Copper Ions from Aqueous Solutions by Bacterial Strain Isolated from Soil. *Chemical Engineering Journal*. 2006;115:203-11.
  27. Kamyab H, Din MFM, Keyvanfar A, Majid MZA, Talaiekhazani A, Shafaghat A, et al. Efficiency of microalgae *chlamydomonas* on the removal of pollutants from palm oil mill effluent (POME). *Energy Procedia*. 2015;75:2400-408.
  28. Johnson RJ, Jurawan I, Frenzel M, Price AC. The identification and mechanism of a *Scenedesmus* spp. causing bio-fouling of an oil field produced water treatment plant. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2016;108:207-13.
  29. Bartha R, Bossert I. *Pet microbiol treatment and disposal of petroleum wastes*. New York: Macmillan Publ Co; 1984.
  30. Siron R, Pelletier É, Brochu C. Environmental factors influencing the biodegradation of petroleum hydrocarbons in cold seawater. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 1995;28(4):406-16.
  31. Wang Z, An C, Lee K, Owens E, Chen Z, Boufadel M, et al. Factors influencing the fate of oil spilled on shorelines: a review. *Environmental Chemistry Letters*. 2021;19(2):1611-28.
  32. Arias AH, Souissi A, Gliippa O, Roussin M, Dumoulin D, Net S, et al. Removal and biodegradation of phenanthrene, fluoranthene and pyrene by the marine algae *rhodomonas baltica* enriched from north atlantic coasts. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 2017;98(3):392-99.
  33. Harmsen J. Measuring bioavailability: From a scientific approach to standard methods. *Journal of Environmental Quality*. 2007;36(5):1420-28.
  34. Shanthy S, Kk S. Study of physiological and biochemical alterations in cyanobacterium under organic stress. *American Journal of Plant Physiology*. 2011;6(1):1-16.
  35. Guo H, Madzak C, Du G, Zhou J, Chen J. Effects

- of pyruvate dehydrogenase subunits overexpression on the  $\alpha$ -ketoglutarate production in *Yarrowia lipolytica* WSH-Z06. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2014;98(16):7003-12.
36. Del Campo JA, García-González M, Guerrero MG. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2007;74(6):1163-74.
37. Li X, Hu HY, Zhang YP. Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. under different cultivation temperature. *Bioresource Technology*. 2011;102(3):3098-102.
38. Lu Q, Li J, Wang J, Li K, Li J, Han P, et al. Exploration of a mechanism for the production of highly unsaturated fatty acids in *Scenedesmus* sp. at low temperature grown on oil crop residue based medium. *Bioresource Technology*. 2017;244:542-51.
39. Hassanzadeh S, Hajrasouliha O, Rezaei-Latifi A. The Role of Wind in Modeling of Oil Pollution Transport and Diffusion in the Persian Gulf. *Environmental Modeling & Assessment*. 2016;21.
40. Labbé JI, Ramos-Suárez JL, Hernández-Pérez A, Baeza A, Hansen F. Microalgae growth in polluted effluents from the dairy industry for biomass production and phytoremediation. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 2017;5(1):635-43.
41. Gale PM. Wetlands, second edition. *Journal of Environmental Quality*. 1994;23(5):1118-19.
42. Chaillan F, Le Flèche A, Bury E, Phantavong YH, Grimont P, Saliot A, et al. Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. *Research in Microbiology*. 2004;155(7):587-95.
43. Ansari AA, Khoja AH, Nawar A, Qayyum M, Ali E. Wastewater treatment by local microalgae strains for CO<sub>2</sub> sequestration and biofuel production. *Applied Water Science*. 2017;7(7):4151-58.
44. Alemu K, Assefa B, Kifle D, Kloos H. Nitrogen and phosphorous removal from municipal wastewater using high rate algae ponds. *INAE Letters*. 2018;3(1):21-32.



Available online: <https://ijhe.tums.ac.ir>

Original Article



## Bioremediation of selected polycyclic aromatic hydrocarbons by *Chlamydomonas reinhardtii* algae in synthetic crude oil wastewater

Navid Ahmadi<sup>1</sup>, Mozhgan Ahmadi Nodushan<sup>2\*</sup>, Mohammad Hadi Abolhasani<sup>1</sup>, Seyed Abbas Hosseini<sup>3</sup>

1- Department of Environmental Sciences, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

2- Department of Environmental Sciences, Waste and Wastewater Research Center, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

3- Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

### ARTICLE INFORMATION:

**Received:** 14 May 2022

**Revised:** 16 July 2022

**Accepted:** 20 July 2022

**Published:** 12 September 2022

### ABSTRACT

**Background and Objective:** The presence of PAHs in the environment can cause a problem as their presence has a deleterious effect on humans and animals. They also have the ability to cause tumors in humans and animals. Generally, to remove crude oil pollutants from seawater, various physicochemical and biological treatment methods have been applied worldwide. A biological treatment method using bacteria, fungi, and algae has recently gained a lot of attention due to its efficiency and lower cost. *Chlamydomonas reinhardtii*, microalgae have features such as a high proliferation rate, and cultivability in various water ecosystems.

**Materials and Methods:** In the present study, a total of 12 samples of synthetic oil wastewater were prepared at 2.5 g/L, 7.5 g/L, and 12.5 g/L that were called C1, C2 and C3. The gas chromatography/mass spectrometry (GC-MS) method was used for the determination of PAHs compounds in the samples. Furthermore, water samples were further analyzed for the amounts of biological oxygen demand (BOD), Chemical oxygen demand (COD), and total organic carbon (TOC). Chlorophyll A, biomass, amounts of nitrate, and nitrite were also measured. Statistical analysis was performed using SAS 9/8 software.

**Results:** Results indicated that the removal rates from crude oil by *C. reinhardtii* microalgae were 100% on the 14th day for the three compounds of phenanthrene, fluorine, and anthracene at all concentrations, and 97.8%, 93%, and 92.7% for naphthalene compound at concentrations of 2.5 g in 1L, 7.5 g in 1L, and 12.5 g in 1 L, respectively ( $p < 0.05$ ). In terms of nutrients ( $\text{NO}_2^-$  and  $\text{NO}_3^-$ ), the highest amount of nitrate removal was observed at a concentration of 2.5 g/L from crude oil (C1) ( $p < 0.05$ ). The highest biomass was observed in the C3 treatment ( $p < 0.05$ ). Moreover, the greatest decline in BOD was observed in treatment C3 at 47.4%, while the greatest COD and TOC decline were observed in C1 treatment with the value of 84% and 94%, respectively ( $p < 0.01$ ).

**Conclusion:** The results showed that the cultivation of *C. reinhardtii* in crude oil in terms of nutrient removal potential, hydrocarbon composition, improving water quality and production of suitable biomass can be an acceptable option for exploitation in the biological treatment process.

**Keywords:** Polycyclic aromatic hydrocarbons, Algal culture, *Chlamydomonas reinhardtii*, Bio-remediation

**\*Corresponding Author:**

m.ahmadi@khuif.ac.ir

Please cite this article as: Ahmadi N, Ahmadi Nodushan M, Abolhasani MH, Hosseini SA. Bioremediation of selected polycyclic aromatic hydrocarbons by *Chlamydomonas reinhardtii* algae in synthetic crude oil wastewater. *Iranian Journal of Health and Environment*. 2022;15(2):261-74.

