

غربال‌گری کاندیدا/تروپیکالیس se29w، جدا شده از پساب کارخانه تولید لاستیک، با

توان بالقوه‌ی زیست‌پالایی سلنیت سمی

دکتر مراحم آشنگرف^{۱*}، راضیه ارجمند^۲

۱. استادیار میکروبیولوژی، عضو هیأت علمی دانشگاه کردستان، دانشکده علوم، گروه علوم زیستی، سنندج، ایران

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد زیست‌شناسی سلولی-مولکولی دانشگاه کردستان، دانشکده علوم، گروه علوم زیستی، سنندج، ایران

چکیده

سابقه و هدف: مواجهه‌ی دراز مدت با غلظت‌های بالای سلنیت می‌تواند به بروز ناراحتی‌های پوستی، از دست رفتن مو، تغییر شکل ناخن‌ها، نکروز کبد و کلیه، اشکالات تنفسی و در نهایت مرگ سلولی منجر شود. در این راستا، جداسازی و تعیین هویت ملکولی مخمرهای بومی مقاوم به سلنیت، بعنوان کاتالیست‌های ایمن طبیعی و مناسب در آزمایشات زیست‌پالایی اکسی‌آنیون سمی سلنیت مورد توجه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه‌ی تجربی، پس از نمونه‌برداری از حوضچه‌های جمع‌آوری پساب و لجن فعال، غربال‌گری اولیه براساس جداسازی در محیط کشت انتخابی کلرامفنیکل رزبنگال آگار غنی شده با سلنیت انجام شد. ارزیابی الگوی تحمل‌پذیری ذاتی سویه‌های غربال‌گری شده نسبت به سلنیت با استفاده از روش‌های رقت در آگار و دیسک دیفیوژن آگار انجام شد. زمان دو برابر شدن سلول‌ها و تعیین درصد بازدارندگی رشد سویه‌های مخمری مقاوم با ترسیم منحنی‌های استاندارد رشد در حضور سلنیت مورد سنجش قرار گرفت. برای ارزیابی حذف میکروبی سلنیت از تکنیک کالریمتری با کمک معرف ۳و۳- دی آمینو بنزیدین هیدروکلراید استفاده شد. تعیین هویت سویه مخمری کارآمد بر مبنای آنالیزهای فنوتیپی و فیلوژنتیکی انجام شد.

یافته‌ها: در مجموع ۳۲ جدایه مخمری مقاوم به سلنیت از نمونه‌های پساب و لجن فعال جدا گردید. براساس نتایج الگوی تحمل‌پذیری و تأیید نتایج به کمک کدورت به‌دست آمده از رسم منحنی‌های رشد، سویه se29w (جدا شده از پساب کارخانه تولید لاستیک) با ماکزیمم تحمل‌پذیری ۱۸ گرم در لیتر نسبت به یون سمی سلنیت، به‌عنوان سویه‌ی کارآمد تحت نام کاندیدا/تروپیکالیس مورد شناسایی ملکولی قرار گرفت و در بانک ژنی با شماره شناسایی KR150680 ثبت شد. همچنین در این پژوهش مشخص شد مخمر بومی مذکور قادر است سلنیت سمی را به سلنیوم احیا کند. در ادامه‌ی این پژوهش، از سلول‌های در حال استراحت مخمر مذکور به‌عنوان کاتالیست زیستی جهت آزمایشات سلنیت زدایی استفاده شد که براساس نتایج پس از ۶۰ ساعت گرماگذاری، کاهش ۹۲/۵ درصدی از سلنیت موجود در محیط زیست تبدیلی با غلظت اولیه یک گرم در لیتر تحت شرایط دمایی ۳۰ درجه سانتی‌گراد، pH برابر ۷/۲ و غلظت ۲۰ گرم در لیتر وزن تر توده سلولی مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: در این مقاله برای نخستین بار حذف و احیای سلنیت در گونه‌ی مخمری کاندیدا/تروپیکالیس گزارش شد. روش‌های غربال‌گری پیشنهاد شده در پژوهش اخیر، می‌تواند ما را در انتخاب هدفمند کاتالیست‌های میکروبی کارآمد برای آزمایشات زیست‌پالایی سلنیت، در جهت ارتقای سلامت و حفظ محیط زیست یاری کند.

واژگان کلیدی: سلنیت، زیست‌پالایی، رقت در آگار، دیسک دیفیوژن آگار، سلول در حال استراحت، کاندیدا/تروپیکالیس

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Ashengroph M, Arjmand R. Potential of *Candida tropicalis* strain se29w isolated from waste rubber plant for the bio-remediation of the toxic selenite (SeO_3^{2-}). *Pejouhandeh* 2016;21(1): 40-51.

مقدمه

انسان و محیط زیست محسوب می‌شوند. همین امر موجب توسعه‌ی تکنیک‌های مؤثر به منظور حذف این آلاینده‌ها شده است (۱). شبه فلز سلنیوم شصت و ششمین عنصر فراوان پو سته‌ی زمین است که در غلظت‌های بسیار پایین ۰/۵-۰/۱ ppm به دلیل شرکت در ساختار آنزیم‌هایی مانند گلوکاتایون پراکسیداز و تیوردوکتازها و نقش آنتی‌اکسیدانی آن رتبه مهمی در هرم غذایی دارا می‌باشد (۲،۳). با این حال مواجهه با

با توسعه روزافزون فعالیت‌های صنعتی و کشاورزی و مصرف بی‌رویه‌ی مواد سنتتیک مضرر، اکوسیستم‌های طبیعی در معرض نابودی قرار گرفته‌اند. پسماندهای آلوده به فلزات سنگین و اکسی‌آنیون‌های سمی تهدیدی جدی برای سلامت

* نویسنده مسؤول مکاتبات: دکتر مراحم آشنگرف؛ استادیار گروه علوم زیستی، دانشکده علوم، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران؛ تلفن و نمابر: ۶۶۲۴۱۳۳
(۰۸۷۱)؛ پست الکترونیک: m.ashengroph@uok.ac.ir

غلظت‌های بالاتر از ۳ ppm به‌ویژه در فرم اکسی‌انیون منجر به بروز مسمومیت‌های حاد از جمله اشکالات تنفسی جدی، ریزش مو، دفرمه شدن ناخن، نکروز پوستی، اختلالات تنفسی و گوارشی، اختلالات روانی، ناراحتی‌های کلیوی و کبدی، نکروز و حتی مرگ سلولی می‌شود (۴). سلنیت (SeO_3^{2-}) و سلنات (SeO_4^{2-}) دو گونه‌ی انحلال‌پذیر سلنیوم هستند که اغلب در محیط‌های هوازی یافت می‌شوند و تمایل به تجمع زیستی دارند (۵). اکسی‌انیون سلنیت با توجه به حلالیت بالاتر در محیط‌های آبی، سمیت بیشتری برای موجودات دارد. بنابراین حذف این ترکیب قبل از تخلیه‌ی پساب‌های صنایع مرتبط با سلنیوم، ضروری است (۶).

با وجود به‌کارگیری تکنیک‌های فیزیکوشیمیایی متعدد در راستای حذف سلنیت مانند تبادل یونی، اسمز معکوس، احیای کاتالیستی، رسوب‌گذاری و تیمار الکتروشیمیایی (۸،۷)، با توجه به هزینه‌بر بودن، سختی مسیر فرآیند، آلودگی زیست محیطی و ناکارآمدی روش‌های مذکور در حذف غلظت‌های پایین سلنیت، استفاده از فرآیند زیست‌پالایی میکروبی به‌عنوان روش جایگزین پیشنهاد شده است (۱۰،۹). کاربرد میکروارگانیسم‌ها به‌عنوان فناوری شیمی سبز در پالایش زیستی مناطق آلوده به سلنیت دارای مزایایی از قبیل دستیابی به بی‌شترین راندمان با حداقل مصرف انرژی، کمترین آلودگی محیطی و عملکرد مناسب در حذف غلظت‌های بسیار پایین است. میکروارگانیسم‌ها دارای مکانیسم‌های راهبردی برای مقابله با اثرات سمی سلنیت هستند که از آن جمله کاهش جذب و افزایش دفع اکسی‌انیون، تشکیل کمپلکس خارج سلولی، فرآیند تبخیر و احیای آنزیمی را می‌توان نام برد (۱۱). در این میان، احیای آنزیمی مهمترین مکانیسم سم‌زدایی است که نقش به‌سزایی در چرخه‌های زیست‌پالایی و ژئوشیمیایی سلنیوم ایفا می‌کند (۱۲).

با وجود به‌کارگیری تکنیک‌های فیزیکوشیمیایی متعدد در راستای حذف سلنیت مانند تبادل یونی، اسمز معکوس، احیای کاتالیستی، رسوب‌گذاری و تیمار الکتروشیمیایی (۸،۷)، با توجه به هزینه‌بر بودن، سختی مسیر فرآیند، آلودگی زیست محیطی و ناکارآمدی روش‌های مذکور در حذف غلظت‌های پایین سلنیت، استفاده از فرآیند زیست‌پالایی میکروبی به‌عنوان روش جایگزین پیشنهاد شده است (۱۰،۹). کاربرد میکروارگانیسم‌ها به‌عنوان فناوری شیمی سبز در پالایش زیستی مناطق آلوده به سلنیت دارای مزایایی از قبیل دستیابی به بی‌شترین راندمان با حداقل مصرف انرژی، کمترین آلودگی محیطی و عملکرد مناسب در حذف غلظت‌های بسیار پایین است. میکروارگانیسم‌ها دارای مکانیسم‌های راهبردی برای مقابله با اثرات سمی سلنیت هستند که از آن جمله کاهش جذب و افزایش دفع اکسی‌انیون، تشکیل کمپلکس خارج سلولی، فرآیند تبخیر و احیای آنزیمی را می‌توان نام برد (۱۱). در این میان، احیای آنزیمی مهمترین مکانیسم سم‌زدایی است که نقش به‌سزایی در چرخه‌های زیست‌پالایی و ژئوشیمیایی سلنیوم ایفا می‌کند (۱۲).

در دو دهه‌ی گذشته، تحقیقات قابل توجهی با هدف جداسازی و غربال‌گری میکروارگانیسم‌های مقاوم به سلنیت با پتانسیل حذف و احیای این اکسی‌انیون صورت گرفته و طیف وسیعی از سویه‌های میکروبی عمده‌تاً متعلق به جنس‌های باکتریایی *Aeromonas*, *Thauera*, *Comamonas*, *Duganella*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Agrobacterium* (۱۳)، *Stenotrophomonas*, *Rhodopseudomonas*, *Rhodobacter*, *Rhodospirillum* (۱۴،۱۲)، *Shewanella* (۱۵) و تعدادی از سویه‌های قارچی متعلق به کپک‌های رشته‌ای *Trichoderma*, *Fusarium*, *Aspergillus* و

در این تحقیق آزمایشگاهی، نمونه‌برداری از حوضچه‌های جمع‌آوری پساب کارخانه‌های تولیدات لاستیکی، شیشه و بلور، مواد بهداشتی و همچنین لجن فعال برکه و رودخانه واقع در استان‌های اصفهان، شیراز، یزد و یاسوج با استفاده از ظروف جمع‌آوری استریل صورت گرفت. در هر نمونه، تاریخ نمونه‌برداری، محل و منبع نمونه روی برچسب ثبت گردید. نمونه‌ها به آزمایشگاه میکروبیولوژی و زیست فناوری دانشگاه کردستان منتقل و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد محافظت شدند. جهت جداسازی و خالص‌سازی مخمرهای بومی با پتانسیل ذاتی تحمل‌پذیری بالا نسبت به اکسی‌انیون سمی سلنیت سدیم (تهیه شده از کمپانی سیگما-آلد ریچ انگلستان)، تراکم‌های متفاوت از نمونه‌های پساب جمع‌آوری شده (۵۰ و ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرولیتر) به‌طور مستقیم روی محیط کشت کلرامفنیکل رزبنگال آگار (خریداری شده از شرکت مرک آلمان) حاوی ۱۰ گرم در لیتر یون سلنیت، که محیطی انتخابی برای رشد و جداسازی مخمرهای مقاوم محسوب می‌شود، در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت انکوبه‌گذاری شد. در ارتباط با نمونه‌های لجن فعال، ۱۰ گرم از

مواد و روش‌ها

در این تحقیق آزمایشگاهی، نمونه‌برداری از حوضچه‌های جمع‌آوری پساب کارخانه‌های تولیدات لاستیکی، شیشه و بلور، مواد بهداشتی و همچنین لجن فعال برکه و رودخانه واقع در استان‌های اصفهان، شیراز، یزد و یاسوج با استفاده از ظروف جمع‌آوری استریل صورت گرفت. در هر نمونه، تاریخ نمونه‌برداری، محل و منبع نمونه روی برچسب ثبت گردید. نمونه‌ها به آزمایشگاه میکروبیولوژی و زیست فناوری دانشگاه کردستان منتقل و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد محافظت شدند. جهت جداسازی و خالص‌سازی مخمرهای بومی با پتانسیل ذاتی تحمل‌پذیری بالا نسبت به اکسی‌انیون سمی سلنیت سدیم (تهیه شده از کمپانی سیگما-آلد ریچ انگلستان)، تراکم‌های متفاوت از نمونه‌های پساب جمع‌آوری شده (۵۰ و ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرولیتر) به‌طور مستقیم روی محیط کشت کلرامفنیکل رزبنگال آگار (خریداری شده از شرکت مرک آلمان) حاوی ۱۰ گرم در لیتر یون سلنیت، که محیطی انتخابی برای رشد و جداسازی مخمرهای مقاوم محسوب می‌شود، در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت انکوبه‌گذاری شد. در ارتباط با نمونه‌های لجن فعال، ۱۰ گرم از

اطراف دیسک به وسیله خط کش میلی متری مورد بررسی قرار گرفت. به منظور کاهش خطا، آزمایش سه بار تکرار شد. نمودار منحنی های رشد سویه های مخمری برتر با پتانسیل ذاتی بالا در تحمل پذیری و احیای یون سمی سلنیت در محیط های کشت YPD براث فاقد سلنیت و YPD براث حاوی ۵ گرم در لیتر سلنیت بررسی شد. برای این منظور، از کشت ۲۴ ساعته سویه های مخمری، استاندارد ۰/۵ مک فارلند تهیه و سپس به میزان یک درصد به ارلن های ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۵۰ میلی لیتر از محیط های کشت مذکور افزوده شد. ارلن ها در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و دور شیکر ۱۸۰ انکوبه شدند. جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر (OD_{600nm}) در فواصل زمانی ۴ ساعت تا رسیدن به فاز سکون تعیین شد. برای هر آزمایش سه تکرار در نظر گرفته شد. پس از ترسیم منحنی های رشد، بهترین خط مماس بر فاز لگاریتمی منحنی های رشد رسم شد. سپس با محاسبه شیب خط و از طریق فرمول زیر، زمان دو برابر شدن سلول های مخمری محاسبه گردید (۱۹).

$$\text{زمان دو برابر شدن} = \frac{\ln 2 = 0.694}{\mu_{\max} = \text{slope}}$$

در ادامه، محاسبه درصد بازدارندگی رشد سویه های مخمری در حضور اکسی آنیون سمی سلنیت مطابق فرمول زیر انجام گرفت (۲۰).

$$I = \frac{(OD_{600nm} \text{ Control} - OD_{600nm} \text{ test}) \times 100}{OD_{600nm} \text{ Control}}$$

در این فرمول I: درصد بازدارندگی ر شد، OD_{600nm} control: جذب نوری مخمر در محیط YPD براث بدون حضور سلنیت در طول موج ۶۰۰ نانومتر و OD_{600nm} test: جذب نوری مخمر در محیط YPD براث غنی شده با ۵ گرم در لیتر اکسی آنیون سمی سلنیت در طول موج ۶۰۰ نانومتر.

شناسایی اولیه سویه مخمری se29w بر اساس صفات ریخت شناسی، خصوصیات فیزیولوژیک و آزمون های بیوشیمیایی انجام شد (۲۱). جهت تشخیص شکل سلولی با میکروسکوپ نوری، لام مرطوب از کشت یک روزه مخمر در محیط کشت YPD براث تهیه و بررسی گردید. مورفولوژی کلنی سویه مخمری se29w روی محیط های کشت YPD آگار و YPD آگار حاوی سلنیت سدیم بررسی شد. جهت انجام شناسایی جذب قندها از محیط (YNB Yeast Nitrogen Base) (خریداری شده از کمپانی HiMedia هند) استفاده گردید. پس از اضافه نمودن منابع قندی مختلف در

هر نمونه در ۹۰ میلی لیتر محلول ایزوتونیک آب پپتونه استریل (۱۰ گرم در لیتر پپتون و ۵ گرم در لیتر نمک کلرید سدیم) تهیه و مشابه نمونه های مربوط به پساب عمل شد. از کلنی های رشد کرده در محیط کشت کلرامفنیکل رزینگال آگار حاوی ۲ گرم در لیتر سلنیت برداشته و در محیط کشت YPD آگار (گلوکز ۲٪، پپتون ۲٪ و عصاره مخمر ۱٪ و ۲٪ آگار) حاوی ۲ گرم در لیتر یون سمی سلنیت کشت داده شد و در شرایط تاریکی در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری شد. کلنی های خالص ایجاد شده از نظر ریخت شناسی مورد بررسی قرار گرفتند. کلیه مخمرهای مقاوم پس از کشت روی محیط کشت YPD براث در میکروتیوب های ۱/۵ میلی لیتری حاوی گلیسرول ۲۰ درصد در فریزر -۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

با هدف ارزیابی الگوی تحمل پذیری ذاتی سویه های مخمری بومی نسبت به اکسی آنیون سمی سلنیت، از دو روش رقت در آگار (Agar dilution method) و دیسک دیفیوژن آگار (Disk diffusion agar) استفاده شد (۱۸). در روش رقیق سازی در آگار، تراکم مناسب از غلظت های یون سلنیت (۲ تا ۱۸ گرم در لیتر)، پس از سترون کردن به وسیله فیلترهای غشایی سرسرنگی ۰/۲۲ میکرونی، به ۲۰ میلی لیتر محیط کشت YPD آگار استریل ذوب شده اضافه گردید و در پلیت پخش شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از سوپانسیون مخمری با کدورت معادل نیم مک فارلند ($1/5 \times 10^6$ cells/ml) روی محیط آگاردار قرار گرفت و در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۷۲ ساعت گرماگذاری شد. نتایج به صورت الگوی تحمل پذیری همراه با احیای یون سلنیت که با ایجاد کلنی قرمز رنگ در نتیجه احیای سلنیت به سلنیوم عنصری بود، گزارش شد. در روش دیسک دیفیوژن آگار، از دیسک های بلانک استریل ۴ میلی متری ساخت شرکت پادتن طب استفاده شد. برای این منظور، پس از تهیه سوپانسیون استاندارد مخمری آن را بر روی محیط کشت YPD آگار با استفاده از سوپ استریل کشت داده، سپس دیسک های بلانک در پتری دیش های استریل حاوی ۱۰ گرم در لیتر اکسی آنیون سلنیت غوطه ور شد. بعد از ۱۵ دقیقه و پس از جذب کامل، دیسک ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند تا کاملاً خشک و جهت دیسک گذاری آماده شوند. دیسک های آغشته شده به ۱۰ گرم در لیتر یون سلنیت روی سطح محیط کشت YPD تلقیح شده با سویه های مخمری قرار داده شد. پلیت های مذکور به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳ درجه سانتی گراد گرماگذاری شدند. میانگین قطر هاله عدم رشد در

غلظت ۵ درصد به محیط مذکور، محلول‌های فوق با استفاده از فیلترهای سرنگی ۰/۲۲ میکرونی استریل شد. سپس به لوله‌های حاوی مواد قندی تهیه شده، سوسپانسیون رقیقی از سویه‌ی مخمری فوق تلقیح شد. پس از آن، لوله‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۳ هفته در انکوباتور شیکردار قرار داده شدند. جذب قندها از روی کدورت در مقایسه با شاهد‌ها تخمین زده شد. جهت شناسایی تست‌های تخمیری هیدرات‌های کربن، معادل ۲ گرم از منابع قندی مختلف در محلول ۱ درصد عصاره مخمر حل شد و سپس ۵ میلی‌لیتر از محیط ساخته شده‌ی قندی به لوله‌های آزمایش حاوی لوله‌های دورهام، اضافه شد. بدنبال اتوکلاو نمودن با استفاده از لوپ‌های سوزنی از یک کشت فعال مخمری به محیط‌های فوق تلقیح و سپس لوله‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ هفته در انکوباتور قرار داده شدند. رشد در دماهای مختلف روی محیط YPD آگار انجام شد. سایر تست‌های بیوشیمیایی مهم به ویژه هیدرولیز نشاسته و اوره نیز بر مبنای دستورالعمل توصیه شده Kurtzman and Fell (۲۱) انجام شد. برای بررسی ملکولی مخمر جدا شده، DNA ژنومی با استفاده از روش استاندارد تخریب به کمک دانه‌های شیشه‌ای، استخراج شد (۲۲). برای این منظور، بعد از کشت ۲۴ ساعته‌ی سویه‌ی مخمری در محیط YPD براث، ۱ میلی‌لیتر از محیط YPD تلقیح شده با سویه‌ی مخمری را برداشته و در دور $3000 \times g$ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ می‌شود. سپس توده‌ی سلولی مخمری رسوب داده شده، به وسیله آب مقطر استریل، کاملاً شستشو داده شد. سپس سوسپانسیون مخمری در دور $3000 \times g$ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و پس از تخلیه محلول رویی، به بیومس سلولی رسوب یافته ۲۰۰ میکرولیتر از بافر لیزکننده (10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% SDS, 2% Triton X-100) اضافه و ورتکس شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از محلول فنل - کلروفرم (با نسبت ۱ به ۱) و همچنین ۳۰۰ میلی‌گرم از دانه‌های شیشه‌ای اضافه شد. سپس به مدت ۳ دقیقه به شدت ورتکس شد. پس از ورتکس نمودن، ۲۰۰ میکرولیتر بافر TE (10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA) اضافه و نمونه به مدت ۵ دقیقه با دور $15000 \times g$ سانتریفیوژ شد. محلول رویی برداشته شد و به میکروتیوب استریل دیگری منتقل گردید. هم‌حجم محلول رویی برداشته شده، اتانول اضافه شد. نمونه به مدت ۵ دقیقه در دور $15000 \times g$ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. پس از آن، به منظور حذف نمک‌های اضافی و سایر ناخالصی‌ها، DNA رسوب یافته با

استفاده از اتانول ۷۰ درصد شستشو داده شد. مخلوط حاصله به مدت ۱۰ دقیقه روی یخ قرار داده شد. پس از آن به مدت ۵ دقیقه در دور $15000 \times g$ سانتریفیوژ شده و سپس مایع رویی به وسیله سمپلر خارج شد. پس از تبخیر کامل اتانول به رسوب حاصل ۱۰۰ میکرولیتر بافر TE اضافه نموده و تا زمان انجام فرآیند PCR در فریزر -۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۲۲). صحت استخراج DNA ژنومی با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بر مایه بررسی شد. پس از استخراج DNA ژنومی سویه‌ی مخمری se29w، با استفاده از دو پرایمر همگانی ITS1 (tccgtaggtgaacctgcgg) و ITS4 (tcctccgcttattgatatgc) که از آنها برای شناسایی و طبقه‌بندی انواع یوکاریوت‌ها استفاده می‌شود، تکثیر ژن مربوطه انجام پذیرفت. با استفاده از پرایمرهای نواحی ITS (Internal Transcribed Spacers) که برای نواحی حفاظت شده‌ی ژن‌های ریبوزومی 18S (ITS1) و 28S (ITS4) طراحی شده‌اند، بخش کاملی از زیرواحد ریبوزومی 5.8S و همچنین نواحی غیرکدینگ ITS1 و ITS2 تکثیر شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در دستگاه ترموسایکلر ساخت شرکت BioRad کشور آمریکا انجام شد. مخلوط واکنش PCR (۲۵ میکرولیتر) شامل ۱۲/۵ میکرولیتر Master mix (حاوی بافر PCR، $MgCl_2$ ، dNTPs و آنزیم Taq-polymerase)، یک میکرولیتر آغازگرهای بالادست و پایین‌دست (۱۰ میکرومولار)، یک میکرولیتر DNA الگو (غلظت تقریبی ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر) و ۹/۵ میکرولیتر آب مقطر سسترون و دیونیزه استفاده شد. همه‌ی مواد مصرفی از شرکت سیناکلون خریداری شد. شرایط دمایی واکنش در این فرآیند PCR به شرح زیر بود: واشر شت اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. چرخه تکثیر شامل ۳۰ سیکل تکرار شونده با دمای واشر شت اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و دمای بسط ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه. پس از اتمام سیکل‌ها و به منظور تکثیر و تکمیل نهایی DNA استخراج شده، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. پس از اطمینان از صحت انجام PCR و عدم وجود آلودگی از طریق الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد، تحت شرایط بافری TAE و در ولتاژ ۸۰، توالی نوکلئوتیدی سویه‌ی مخمری se29w جهت تعیین توالی به همراه پرایمرهای رفت (ITS1) و برگشت (ITS4) به شرکت ماکروژن کره جنوبی (توسط شرکت تکاپو زیست) ارسال شد. سپس به کمک الگوریتم BLASTN در پایگاه اطلاعات ژنی NCBI و

یخچالی به مدت ۱۰ دقیقه در دور $3000 \times g$ برداشت و پس از شستشو بیومس سلولی در بافر فسفات (K_2HPO_4/KH_2PO_4) (100 mM, pH 7.2)، از این سلول‌های برداشت شده به عنوان کاتالیز است برای مطالعات حذف زیستی سلنیت استفاده شد (۲۵). آزمایشات در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر بافر فسفات، ۲۰ گرم در لیتر توده سلولی (وزن تر بیومس سلولی) و تحت شرایط دمایی ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دور شیکر ۱۸۰ rpm انجام شد. به محیط واکنش، سلنیت در غلظت‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ گرم در لیتر افزوده شد. نمونه‌ها در فواصل زمانی مشخص برداشت و مقدار غلظت باقیمانده یون سمی سلنیت در سوپرناتانت محیط واکنش با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

تحلیل آماری نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS 11.5، در دو سطح توصیفی و استنباطی صورت گرفت. در سطح توصیفی از شاخص‌های میانگین و انحراف معیار و در بخش آمار استنباطی از آنالیز واریانس یک طرفه و براساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن استفاده گردید. حداقل سطح معناداری در تمام آزمون فرضیه‌های مربوط $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در مجموع ۳۲ سویه مخمری از پساب‌ها و لجن فعال جداسازی شد. از میان سویه‌های جداسازی شده، الگوی تحمل‌پذیری ذاتی نزدیک به ۴۶/۸ درصد از سویه‌های مقاوم در محدوده‌ی ۲/۵ تا ۵ گرم در لیتر، ۳۷/۵ درصد در محدوده‌ی ۵ تا ۱۰ گرم در لیتر و ۱۵/۷ درصد در محدوده‌ی ۱۱ تا ۱۸ گرم در لیتر قرار داشت. از مجموع سویه‌های جدا شده، تنها ۵ سویه‌ی مخمری دارای بالاترین مقاومت همراه با احیای یون سمی سلنیت به سلنیوم عنصری را نشان دادند. سویه‌ی مخمری se29w (جدا شده از پساب کارخانه تولید لاستیک) دارای ماکزیمم تحمل‌پذیری (رشد تا ۱۸ گرم در لیتر) و احیای سلنیت تا ۱۶ گرم در لیتر بود (جدول ۱).

نرم افزارهای بیوانفورماتیکی BioEdit، ClustalW و MEGA 6 توالی‌های در یافتی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (۲۳).

برای ارزیابی حذف میکروبی سلنیت از تکنیک کالریمتری و معرف ۳-و-دی آمینو بنزیدین هیدروکلراید (3,3-Diaminobenzidine hydrochloride) (تهیه شده از شرکت مرک) استفاده شد (۲۴). اساس کار این روش بر مبنای واکنش معرف دی‌آمینوبنزیدین (در غلظت ۰/۵ درصد وزنی/حجمی) در محیط اسیدی (اسید کلریدریک ۵ مولار) با یون سلنیت (SeO_3^{2-}) موجود در محیط واکنش و ایجاد کمپلکس زرد نامحلول piazselenol است که پس از استخراج آن در حلال تولوئن، جذب آن توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Jena's Spectrophotometer SPECORD 210, Carel Zeiss Technology, Germany) در طول موج ۴۲۰ نانومتر خوانده شد. برای رسم منحنی استاندارد سلنیت، محلول استوک از این ماده با غلظت یک گرم در لیتر تهیه شد. سپس از این محلول پایه، غلظت‌های مختلف (۱۵، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۲۵ میلی‌گرم در لیتر) آماده شد و پس از واکنش با معرف مذکور، جذب نمونه‌ها قرائت شد. پس از رسم منحنی کالیبراسیون، با قرار دادن جذب در معادله‌ی خط مربوط به منحنی استاندارد، میزان سلنیت باقیمانده در محیط واکنش زیست تبدیلی محاسبه شد. در نهایت برای اندازه‌گیری درصد حذف میکروبی سلنیت از فرمول زیر استفاده شد:

$$\text{Selenite removal (\%)} = \frac{(Ci - Cr)}{Ci} \times 100$$

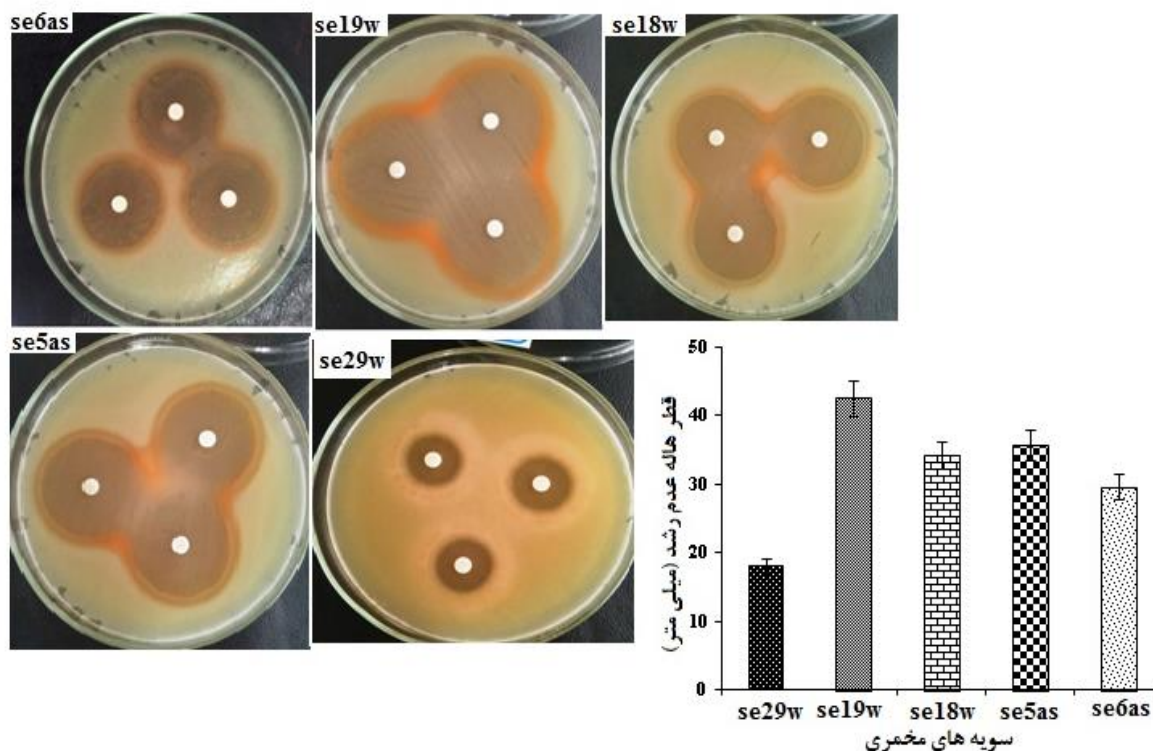
که در آن Ci: غلظت اولیه سلنیت در محیط واکنش زیست تبدیلی و Cr: غلظت سلنیت باقیمانده در محیط واکنش است. برای تهیه‌ی سلول‌های در حال استراحت سویه‌ی مخمری se29w با هدف انجام واکنش حذف زیستی سلنیت، از روش زیر استفاده شد. سویه‌ی مخمری مذکور در محیط کشت YPD براث تا رسیدن به انتهای فاز رشد لگاریتمی رشد داده شد. سپس سلول‌های مخمری با استفاده از سانتریفیوژ

جدول ۱. الگوی تحمل‌پذیری سویه‌های مخمری جدا شده به روش رقت در آگار.

سویه مخمر	محل جداسازی	ماکزیمم تحمل‌پذیری (گرم در لیتر)	ماکزیمم تحمل‌پذیری همراه با احیا (گرم در لیتر)
Se29w	پساب تولیدات لاستیکی-یزد	۱۸	۱۶
Se6as	لجن فعال برکه- اصفهان	۱۵	۱۳
Se18w	پساب کارخانه شیشه و بلور- شیراز	۱۴	۱۲
Se5as	لجن فعال رودخانه- یاسوج	۱۳	۱۳
Se19w	پساب کارخانه مواد بهداشتی- اصفهان	۱۱	۱۱

کمترین اثر مهار کنندگی سلنیت با میانگین قطر هاله‌ی عدم رشد ۱۸/۲ میلی‌متر در سویه‌ی مخمری se29w مشاهده شد. بیشترین قطر هاله‌ی عدم رشد با میانگین ۴۲/۶ میلی‌متر متعلق به سویه‌ی مخمری se19w بود. در سایر جدایه‌های

مخمري، میانگین قطر هاله‌ی عدم رشد بین ۲۹/۷ تا ۳۵/۸ میلی‌متر گزارش شد. نتایج به‌دست آمده با نتایج روش رقت در آگار همخوانی داشت (شکل ۱).



شکل ۱. میانگین هاله‌ی عدم رشد ایجاد شده با اکسی‌آنیون سمی سلنیت (با غلظت ۱۰ گرم در لیتر) در سویه‌های مخمری مقاوم به روش دیسک‌گذاری.

در این قسمت از پژوهش، با هدف انتخاب سویه‌ی مخمری کارآمد جهت آزمایشات سلنیت‌زدایی، اثر سمیت اکسی‌آنیون سلنیت علیه پنج جدایه مخمری se18w, se19w, se29w, se5as و se6as در محیط‌های کشت حاوی سلنیت در غلظت نهایی ۵ گرم در لیتر و بدون حضور سلنیت بررسی شد. با ترسیم منحنی‌های رشد سویه‌های مخمری مذکور، امکان

تعیین زمان دو برابر شدن سلول‌ها که از شیب خط فاز رشد لگاریتمی محاسبه شد، فراهم گردید (شکل ۲). همچنین به‌کمک دانسیته‌های نوری به‌دست آمده در طول موج ۶۰۰ نانومتر در محیط‌های کشت کنترل و آزمایش، امکان تعیین درصد بازدارندگی اکسی‌آنیون سمی سلنیت علیه پنج سویه‌ی مخمری مذکور فراهم شد (جدول ۲).

جدول ۲. نتایج درصد بازدارندگی رشد و زمان دو برابر شدن سویه‌های مخمری در محیط‌های کشت کنترل (فاقد سلنیت) و محیط آزمایش (حاوی ۵ گرم در لیتر سلنیت).

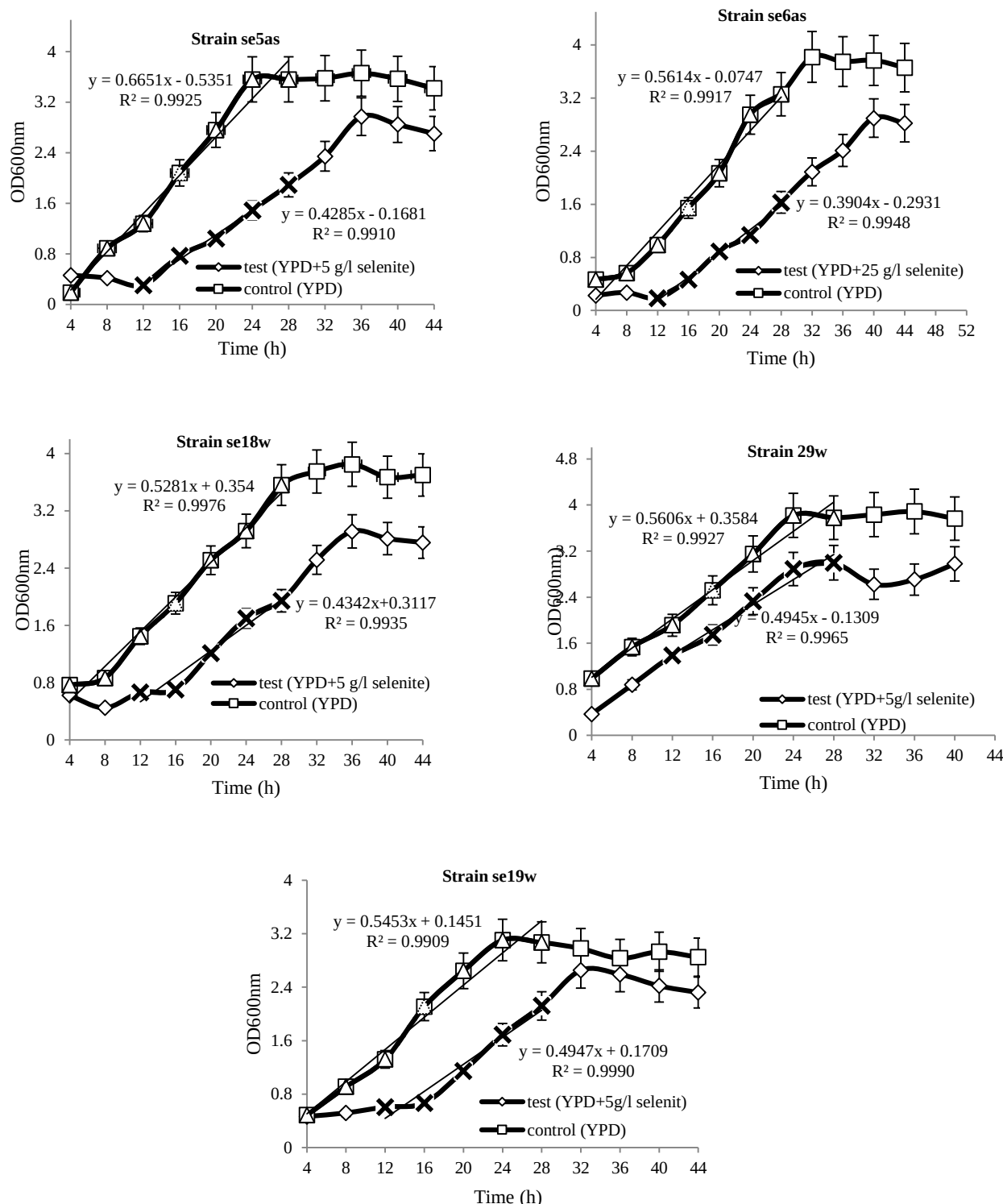
% Growth inhibition in YPD broth+5 g/l SeO ₃ ⁻²	Doubling time (hour)		سویه مخمري
	YPD broth+5g/l SeO ₃ ⁻²	YPD broth	
11.1	1.40	1.23	Se29w
24.1	1.40	1.27	Se19w
20.7	1.59	1.31	Se18w
21.2	1.62	1.04	Se5as
16.73	1.77	1.23	Se6as

همانگونه که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، کمترین میانگین درصد بازدارندگی رشد در حضور سلنیت (۱۱/۱ درصد) مربوط به سویه‌ی مخمری se29w و بیشترین درصد بازدارندگی

(۲۴/۱ درصد) متعلق به سویه‌ی مخمری se19w بود. میانگین درصد بازدارندگی در سایر سویه‌های مخمری بین ۱۶/۷ تا ۲۱/۲ درصد بود. در ارتباط با نتایج doubling time، کمترین

همچنین نتایج به دست آمده از آزمایشات رقیق سازی در آگار (جدول ۱) و دیسک دیفیوژن آگار (شکل ۱) در نهایت، سویه مخمری se29w، به عنوان بهترین سویه جهت آزمایشات حذف میکروبی سلنیت انتخاب و مورد شناسایی فنوتیپی و ملکولی قرار گرفت.

زمان دو برابر شدن سلولی که معادل ۱/۴ ساعت است، متعلق به جدایه های مخمری se19w و se29w بود که با توجه به نتایج درصد بازدارندگی (۱۱ درصدی در برابر ۲۴ درصد) و همچنین رشد نسبتاً سریع تر در محیط فاقد سلنیت (زمان تقریبی دو برابر شدن ۷۳ دقیقه ای در برابر ۷۶ دقیقه ای) و



شکل ۲. منحنی رشد جدایه های مخمری مقاوم به سلنیت در محیط های کشت حاوی سلنیت در غلظت نهایی ۵ گرم در لیتر و بدن حضور سلنیت. آزمایشات سه بار تکرار شد و بار ۱ ± معرف انحراف معیار است.

آگار فاقد سلنیت به صورت کرم رنگ و در محیط کشت YPD آگار حاوی سلنیت سدیم قرمز رنگ بود که نمایانگر پتانسیل ذاتی مخمر مذکور در احیای اکسی‌انیون سمی سلنیت به فرم سلنیوم عنصری است (شکل ۳).

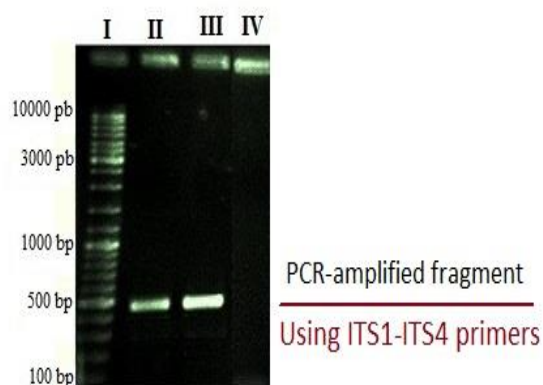
شناسایی اولیه سویه مخمری se29w براساس ویژگی‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی صورت گرفت. سویه‌ی مورد بررسی از نظر میکروسکوپی به صورت تک سلولی و فاقد ریشه و به شکل کروی دیده شد که با جوانه زدن تکثیر می‌یابد. از نظر ماکروسکوپی، کلنی سویه‌ی مذکور در محیط کشت YPD



شکل ۳. مورفولوژی کلنی سویه مخمری se29w روی محیط‌های کشت YPD آگار فاقد سلنیت و YPD آگار حاوی سلنیت سدیم.

لاکتوز، رافینوز و نیترات سدیم در سویه جداسازی شده منفی بود. براساس نتایج بررسی‌های میکروسکوپی، ماکروسکوپی و آزمون‌های بیوشیمیایی و مطابقت نتایج مذکور با کتاب مرجع شناسایی مخمرها (۲۱)، سویه‌ی se29w به‌طور موقت تحت نام *Candida tropicalis* تعیین هویت شد. در ادامه جهت شناسایی دقیق‌تر، آزمون‌های ملکولی و فیلوژنتیکی صورت گرفت. در این راستا پس از استخراج DNA ژنومی، واکنش تکثیر به کمک پرایمرهای اختصاصی صورت گرفت و توالی نوکلئوتیدی با ۴۹۹ جفت باز به‌دست آمد (شکل ۴).

نتایج آزمون‌های فیزبولوژیک و بیوشیمیایی نشان داد که سویه‌ی مذکور از نظر هیدرولیز اوره و نشاسته منفی و رشد در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مثبت است. از نظر تخمیر هیدرات‌های کربن، سویه‌ی مذکور توانایی تخمیر قندهای گلوکز، مالتوز، تری‌هالوز و گالاکتوز را دارد. این در حالی است که تخمیر قندهای لاکتوز و سوکروز منفی است. همچنین نتایج جذب منابع کربن و ازت حکایت از مثبت بودن تست‌های مصرف گلوکز، مالتوز، سوکروز، ال-آرابینوز، مانیتول، گلیسرول و سیترات سدیم توسط سویه‌ی مذکور دارد. رشد بر روی



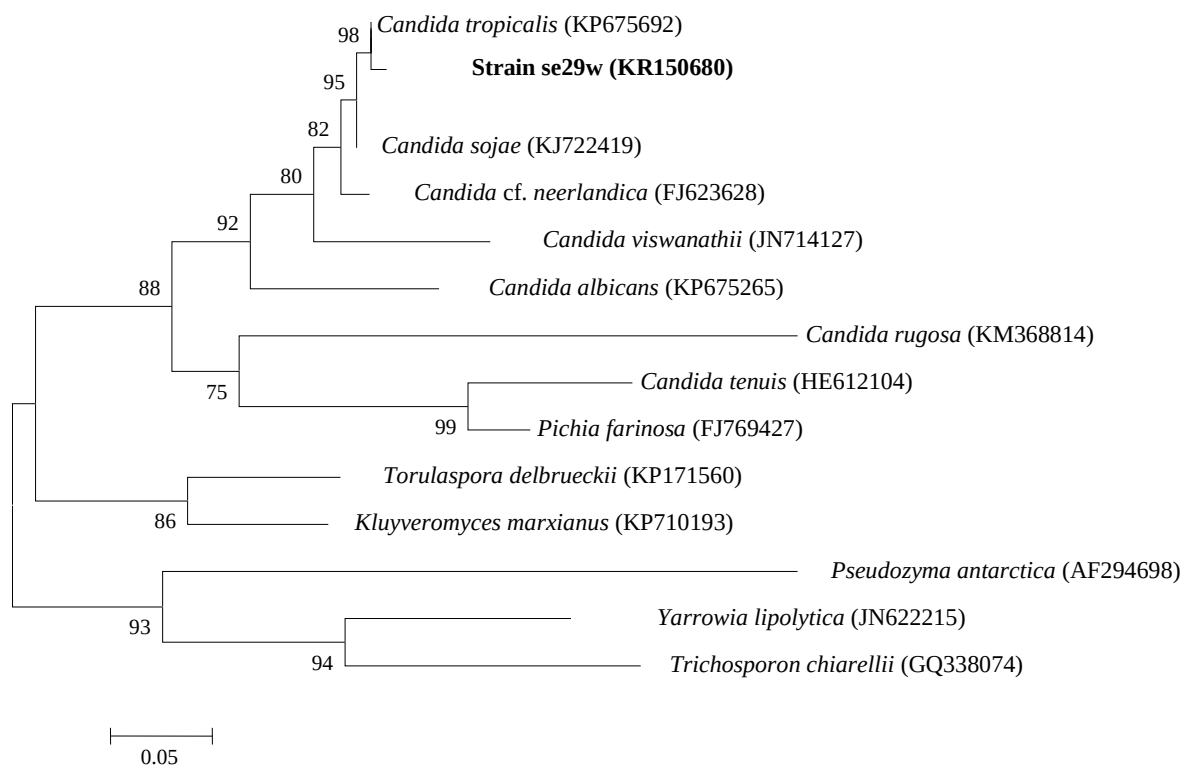
شکل ۴. تصویر ژل الکتروفورز تکثیر rDNA ژنومی با استفاده از پرایمر رفت ITS1 و برگشت ITS4 و ظهور باند منفرد ۴۹۹ جفت بازی. DNA: I: مارکر، II و III: سویه‌ی مخمری se29w و IV: کنترل منفی.

میزان ۹۹ درصد با مخمر *C. tropicalis* به‌دست آمد. در نهایت به منظور تعیین هویت دقیق ارتباط فیلوژنتیکی بین

پس از تأیید محصول واکنش PCR، تعیین توالی و مقایسه‌ی ترادف ژنی در بانک اطلاعات NCBI، بالاترین شباهت به

فیلوژنتیکی حکایت از شباهت بالای سویه‌ی se29w با *C. tropicalis* و تأیید صحت نتایج حاصل از انجام هم‌ترازی توالی‌ها در پایگاه ژنی NCBI بود.

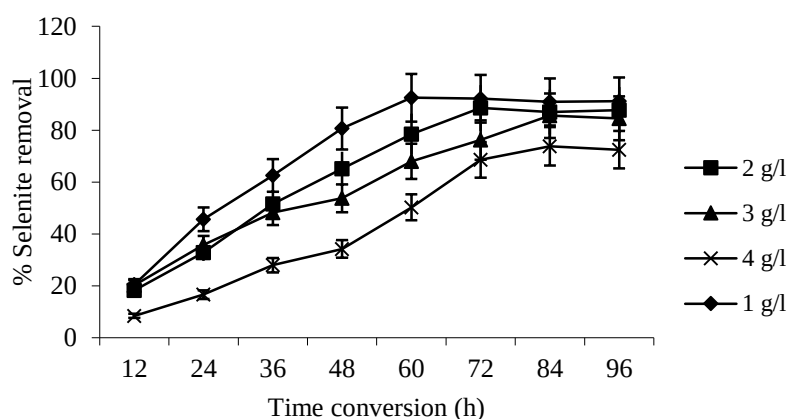
سویه‌ی se29w با سویه‌های ثبت شده در بانک ژنی، درخت فیلوژنتیکی به روش نزدیک‌ترین هم‌جواری (Neighbor-joining) و با شرایط cut off=50 و مقدار پایداری شاخه‌ها Bootstrap=1000 ترسیم شد (شکل ۵). رسم درخت



شکل ۵. درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده بر مبنای توالی نوکلئوتیدی ITS1-5.8S rDNA-ITS2 سویه‌ی مخمری se29w با سویه‌های ثبت شده در بانک ژنی. اعداد داخل پرانتز نشان‌دهنده‌ی شماره‌ی دسترسی سویه‌های مخمری ثبت شده در پایگاه بانک اطلاعات ژنی است.

شد. نتایج حاصل از اثر غلظت‌های مختلف یون سمی سelenite در فرآیند تجزیه زیستی توسط مخمر مذکور در نمودار شکل ۶ نشان داده شده است.

در این بخش از پژوهش، از سلول‌های در حال استراحت (سلول‌های فعال از نظر متابولیسم و بدون رشد) مخمر بومی *C. tropicalis* به‌عنوان کاتالیزور زیستی برای حذف میکروبی سelenite از محیط‌های واکنش زیست تبدیلی استفاده



شکل ۶. نمودار بررسی اثر غلظت‌های مختلف یون سمی سelenite در حذف میکروبی سelenite توسط ۲۰ گرم در لیتر (وزن تر سلولی) سلول در حال استراحت مخمر بومی *C. tropicalis* strain se29w در محیط بافری فسفات با pH برابر ۷/۲، دور شیکر rpm ۱۸۰ و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد. آزمایشات سه بار تکرار شد و بار ۱ ± معرف انحراف معیار است.

براساس این نتایج، مخمر مورد مطالعه، قادر به حذف نسبتاً مناسبی از سلنیت در غلظت ۱ تا ۴ گرم در لیتر می‌باشد. هرچند بیشترین کارایی در غلظت بهینه ۱ گرم در لیتر مشاهده شد و در غلظت‌های بالاتر، میزان تجزیه سلنیت در نتیجه‌ی کاهش فعالیت متابولیکی و سمیت یون سلنیت، کاسته شد. لذا می‌توان نتیجه گرفت که میزان حذف، به غلظت اولیه‌ی یون سلنیت در محیط زیست تبدیلی ارتباط دارد. پس از ۶۰ ساعت گرماگذاری، سلول‌های در حالت استراحت سویه‌ی مخمری مذکور توانست به میزان ۹۲/۵ درصد از سلنیت موجود در محیط زیست تبدیلی را حذف نموده و غلظت آن را از ۱ گرم در لیتر به ۷۵ میلی‌گرم در لیتر برساند که حکایت از کارایی کاتالیزور میکروبی مذکور در حذف سلنیت سمی در غلظت‌های پایین دارد.

بحث

انتشار مقادیر بالای سلنیوم ناشی از چرخه‌های ژئوشیمیایی و همچنین صنایع مرتبط به محیط‌های طبیعی، مستلزم بهره‌گیری بیشتر از فناوری‌های طبیعی مبتنی بر زیست‌پالایی میکروبی برای حفاظت از منابع آب و خاک است. با توجه به اینکه قدم اول در پالایش زیستی محیط‌های آلوده به فلزات و اکسی‌آنیون‌های سمی، انتخاب میکروارگانیسم‌های مقاوم است، بنابراین در بخش نخست این مطالعه، پس از نمونه‌گیری از پساب‌های آلوده به سلنیت با توجه به سازگاری فیزیولوژیک و ژنتیکی میکروارگانیسم‌های کارآمد، جداسازی و شناسایی ملکولی مخمرهای بومی با پتانسیل ذاتی تحمل‌پذیری بالا به سلنیت مورد بررسی قرار گرفت. پس از انجام موفقیت آمیز ایشات مرتبط با الگوی تحمل‌پذیری شامل روش‌های رقت در آگار، دیسک دیفیوژن آگار و بررسی سنتتیک رشد سویه‌های مخمری برتر، در نهایت از میان ۳۲ سویه‌ی مخمری جدا شده، سویه‌ی مخمری se29w جدا شده از کارخانه تولید لاستیک در یزد، به‌عنوان سویه‌ی کارآمد مورد شناسایی فنوتیپی و ملکولی قرار گرفت و تحت نام *C. tropicalis* KR150680 ثبت شد. مخمر مذکور پتانسیل تحمل‌پذیری و احیای نسبتاً بالایی از اکسی‌آنیون سمی سلنیت به ترتیب در غلظت‌های ۱۸ گرم در لیتر (معادل ۱۴۱ میلی‌مولار) و ۱۶ گرم در لیتر (معادل ۱۲۶ میلی‌مولار) را دارا بود.

در طول دو دهه‌ی اخیر مطالعات وسیعی در ارتباط با تعیین الگوی تحمل‌پذیری و مقاومت میکروارگانیسم‌های غربال‌گری شده نسبت به سلنیت صورت گرفته که در ذیل به برخی از

مطالعات شاخص در این ارتباط می‌شود. Rathgeber و همکاران، با استفاده از نمونه‌های جمع‌آوری شده از کف اقیانوس آرام، یک جدایه باکتری متعلق به جنس *Pseudoalteromonas* را با قابلیت تحمل‌پذیری و احیای سلنیت سدیم در غلظت ۷ گرم در لیتر (معادل ۴۰ میلی‌مولار) گزارش دادند (۲۶). در مطالعه‌ی انجام شده توسط Gregorio و همکاران مشخص شد که جدایه باکتری *Stenotrophomonas* sp. SeITE02 جدا شده از نمونه‌ی خاک ریزو سفر گیاه گون دارای تحمل‌پذیری ۵۰ میلی‌مولاری نسبت به یون سمی سلنیت است (۲۷). در مطالعه‌ی دیگری که توسط Hunter و Kuykendall در سال ۲۰۰۶ صورت گرفت، یک سویه‌ی باکتری تحت نام *Aeromonas salmonicida* با حداکثر تحمل‌پذیری ۲۵ میلی‌مولار نسبت به سلنیت گزارش شد (۲۸). در مطالعات انجام شده توسط Hunter و Manter، یک سویه‌ی باکتری تحت نام *Pseudomonas* sp. strain CA5 با حداکثر تحمل‌پذیری ۱۵۰ میلی‌مولاری نسبت به یون سمی سلنیت تعیین خصوصیت شد (۲۹). Zheng و همکاران در سال ۲۰۱۴، در باکتری *Comamonas testosteroni* S44 جدا شده از خاک‌های آلوده به فلزات سمی مقاومت ۱۰۰ میلی‌مولاری نسبت به یون سمی سلنیت را گزارش دادند (۱۳). در جدیدترین مطالعات صورت گرفته در ارتباط با حذف و احیای سلنیت سدیم، Khalilian و همکاران در سال ۲۰۱۵ یک سویه‌ی باکتری تحت نام *Bacillus* sp. QW90 را با قابلیت تحمل‌پذیری بالا (۵۵۰ میلی‌مولار) از پساب‌های آلوده به سلنیت، جدا سازی نمودند (۳۰). لازم به توضیح است که در بیشتر مطالعات ذکر شده، تعیین الگوی تحمل‌پذیری با هدف انتخاب سویه‌ی کارآمد، تنها با روش‌های رقت در آگار و یا میکروداپلوشن براث صورت گرفته است. درحالی‌که در مطالعه‌ی حاضر، از ترکیبی از روش‌ها از جمله رقت در آگار، دیسک دیفیوژن آگار و بررسی منحنی رشد مخمر در حضور غلظت‌های سمی سلنیت با هدف انتخاب کارآمدتر سویه‌ی بومی غربال‌گری شده جهت آزمایشات سلنیت‌زدایی استفاده شده است. با وجود تنوع مطالعات بررسی حذف و احیای سلنیت در باکتری‌های غربال‌گری شده، در مورد مخمرها مطالعات نادری صورت گرفته است. مطالعه‌ی جامع در این ارتباط، تعیین الگوی مقاومت مخمر *Saccharomyces cerevisiae* نسبت به سلنیت (حداکثر تحمل‌پذیری در حدود ۴ میلی‌مولار) و نقش احتمالی سیستم گلوکوتائون سلولی در سم‌زدایی و احیای سلنیت به سلنیوم می‌باشد (۳۱). در بخش

نتیجه‌گیری

با توجه به مقاومت بالا همراه با حذف و احیای اکسی‌آنیون سمی سلنیت توسط مخمر بومی *C. tropicalis* strain se29w، در یک نتیجه‌گیری کلی می‌توان ترکیب روش‌های غربال‌گری استفاده شده در پژوهش اخیر را به‌عنوان گامی مؤثر در راستای جداسازی بهتر مخمرهای کارآمد به‌کار گرفته شده به‌عنوان کاتالیست‌های طبیعی ایمن و ارزان برای آزمایشات سلنیت‌زدایی، در جهت ارتقای سلامت و حفظ محیط زیست، معرفی نمود. در ضمن پیشنهاد تعیین کمی میزان سلنیوم غنی شده در بیومس مخمری در نتیجه‌ی حذف سلنیت، با استفاده از روش‌های اسپکترو سکوپي اتمیک و میکرو سکوپي، می‌تواند مبنایی برای تحقیقات آتی باشد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش مستخرج از رساله کارشناسی ارشد خانم راضیه ارجمند تحت راهنمایی دکتر مراحم آشنگرف و با حمایت مالی و معنوی دانشگاه کردستان اجرا شده است که بدین وسیله، مؤلفین این مقاله، مراتب تشکر و قدردانی خود را اعلام می‌دارند.

دوم این پژوهش، استفاده از سلول‌های در حال استراحت سویه‌ی مخمری *C. tropicalis* se29w به‌عنوان کاتالیزور در حذف سلنیت سمی از محیط‌های زیست تبدیلی حاوی اکسی‌آنیون مورد ارزیابی قرار گرفت که براساس نتایج به‌دست‌آمده پس از ۶۰ ساعت گرماگذاری، سلول‌های در حالت استراحت سویه‌ی مخمری مذکور توانست به میزان ۹۲/۵ درصد از سلنیت موجود در محیط زیست تبدیلی را حذف نموده و غلظت آن را از ۱ گرم در لیتر به ۷۵ میلی‌گرم در لیتر برساند که حکایت از کارایی کاتالیزور میکروبی مذکور در حذف سلنیت سمی در غلظت‌های پایین دارد. لازم به توضیح است که راندمان به‌دست آمده تحت شرایط بهینه نشده بوده و با بهینه‌سازی فاکتورهای واکنش زیست تبدیلی از جمله غلظت اولیه کاتالیزور میکروبی (توده‌ی زیستی استفاده شده)، دما، pH، دور شیکر و سایر متغیرهای احتمالی مؤثر به راندمان‌های مطلوب‌تر در غلظت‌های بالاتر از سلنیت اولیه‌ی به‌کارگرفته شده به‌عنوان سوبسترای واکنش دست یافت. همچنین، در این پژوهش مشخص شد سویه بومی se29w توانایی احیای سلنیت سمی به سلنیوم را دارا بوده که تعیین دقیق میزان احیای سلنیت به فرم سلنیوم عنصری نیازمند انجام آزمایشات تکمیلی است.

REFERENCES

1. Bopp LH. Microbiological removal of chromate from contaminated waste water. General Electric Company (Schenectady, NY) 1981; US Patent No. 4,468,461.
2. Earnshaw A, Greenwood N. Chemistry of the elements, Butterworth-Heinemann, Burlington Massachusetts; 1997.
3. Rayman MP. The importance of selenium to human health. Lancet 2006; 356:233–41.
4. Pedrero Z, Madrid Y. Novel approaches for selenium speciation in foodstuffs and biological specimens: A review. Anal Chim Acta 2009;634:135–52.
5. Dungan RS, Frankenberger WT. Microbial transformations of selenium and the bio-remediation of seleniferous environments. Bioremediat J 1999;J.3:171–88.
6. Stolz JF1, Basu P, Oremland RS. Microbial transformation of elements: the case of arsenic and selenium. Int Microbiol 2002;5(4):201–7.
7. Bleiman N, Mishael YG.2010. Selenium removal from drinking water by adsorption to chitosan-clay composites and oxides: batch and columns tests. J Hazard Mat 2010;183:590–5.
8. Geoffroy N, Demopoulos GP. The elimination of selenium (IV) from aqueous solution by precipitation with sodium sulfide. J Hazard Mater 2011;185:148–54.
9. Kashiwa M, Nishimoto S, Takahashi K, Ike M, Fujita M. Factors affecting soluble selenium removal by a selenate-reducing bacterium *Bacillus* sp. SF-1. J Biosci Bioengin 2000;89:528–33.
10. Espinosa-Ortiz EJ, Rene ER, van Hullebusch ED, Lens PNL. Removal of selenite from wastewater in a *Phanerochaete chrysosporium* pellet based fungal bioreactor. Int Biodeter Biodegr 2015;102:361–9.
11. Bruins MR, Kapil S, Oehme FW. Microbial resistance to metals in the environment. Ecotoxicol Environ Saf 2000; 45:198–207.
12. Kessi J. Enzymic systems proposed to be involved in the dissimilatory reduction of selenite in the purple non-sulfur bacteria *Rhodospirillum rubrum* and *Rhodobacter capsulatus*. Microbiology 2006;152:731–43.
13. Zheng S, Su J, Wang L, Yao R, Wang D, Deng Y, et al. Selenite reduction by the obligate aerobic bacterium *Comamonas testosteroni* S44 isolated from a metal-contaminated soil. BMC Microbiol 2014;14: 204.

14. Antonioli P, Lampis S, Chesini I, Vallini G, Rinalducci S, Zolla L, *et al.* *Stenotrophomonas maltophilia* SeITE02, a new bacterial strain suitable for bio-remediation of selenite-contaminated environmental matrices. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007;73(21):6854–63.
15. Klonowska A, Heulin T, Vermeglio A. Selenite and tellurite reduction by *Shewanella oneidensis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2005;71(9):5607–9.
16. Ramadan SE1, Razak AA, Yousseff YA, Sedky NM. Selenium metabolism in a strain of *Fusarium*. *Biol Trace Elem Res* 1988;18:161–70.
17. Kieliszek M, Błażej S, Gientka, Bzducha-Wróbel. Accumulation and metabolism of selenium by yeast cells. *Appl Microbiol Biotechnol* 2015; doi: 10.1007/s00253-015-6650-x (In press).
18. Washington JA, Sutter VL. Dilution susceptibility test: agar and macro-broth dilution procedures. In: Lennette EH, Balows A, Hausler WJJR, Truant JP, editors. *Manual of clinical microbiology*. 3rd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.; 1980. p. 453–58.
19. Madigan MT, Martinko JM, Parker J. *Brock biology of microorganisms*. Upper Saddle River: Prentice -Hall; 2000.
20. Strotmann UJ, Eglsäer H, Pagga U. Development and evaluation of a growth inhibition test with sewage bacteria for assessing bacterial toxicity of chemical compounds. *Chemosphere* 1994;28:755–66.
21. Kurtzman CP, Fell JW. *The yeasts: a taxonomic study* (4th revised and enlarged edition). Amsterdam: Elsevier; 2000. p. 1–525.
22. Amberg DC, Burke DJ, Strathern JN. *Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2005.
23. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol* 2013;30(12):2725–9.
24. Hurlbut JA, Burkepile RG, Geisler CA, Kijak PJ, Rummel NG. Colorimetric determination of selenium in mineral premixes. *J AOAC Int* 1997;80(4):709–16.
25. Ashengroph M, Nahvi I, Zarkesh-Esfahani H, Momenbeik F. *Candida galli* strain PGO6: a novel isolated yeast strain capable of transformation of isoeugenol into vanillin and vanillic acid. *Curr Microbiol* 2011;62 (3):990–8.
26. Rathgeber C, Yurkova N, Stackebrandt E, Thomas Beatty J, Yurkov V. Isolation of Tellurite- and Selenite-resistant bacteria from hydrothermal vents of the Juan de Fuca Ridge in the Pacific Ocean. *Appl Microbiol Biotechnol* 2002; 68(9):4613–22.
27. Di Gregorio S, Lampis S, Vallini G. Selenite precipitation by a rhizospheric strain of *Stenotrophomonas* sp. isolated from the root system of *Astragalus bisulcatus*: a biotechnological perspective. *Environ Int* 2005;31(2):233–41.
28. Hunter WJ, Kuykendall LD. Identification and characterization of an *Aeromonas salmonicida* (syn *Haemophilus piscium*) strain that reduces selenite to elemental red selenium. *Curr Microbiol* 2006;52:305–9.
29. Hunter WJ, Manter DK. Reduction of selenite to elemental red selenium by *Pseudomonas* sp. strain CA5. *Curr Microbiol* 2009;58:493–8.
30. Khalilian M, Zolfaghari MR, Soleimani M, Zand Monfared MR. *Bacillus* sp. strain QW90, a bacterial strain with a high potential application in bioremediation of selenite. *Rep Health Care* 2015;1(1):6–10.
31. Gharieb MM, Gadd GM. Role of glutathione in detoxification of metal(loid)s by *Saccharomyces Cerevisiae*. *BioMetals* 2004;17:183–8.