پژوهنده (مجله پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی)
سال بیست و یکم، شماره ۱، پی‌درپی ۱۰۹، صفحات ۴۰ تا ۵۱
فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۵

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۷/۱۱
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۲/۳

غربال‌گری *کاندیدا تروپیکالیس* se29w، جدا شده از پساب کارخانه تولید لاستیک، با توان بالقوه‌ی زیست پالایی سلنیت سمی

دکتر مراحم آشنگرف[*1]*، راضیه ارجمند*[2]

۱. استادیار میکروبیولوژی، عضو هیأت علمی دانشگاه کردستان، دانشکده علوم، گروه علوم زیستی، سنندج، ایران
۲- دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی 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 ناخن ها، 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 زیست پالایی اکسی آنیون 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 سویه های 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 تحمل پذیری 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، زیست پالایی، 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

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 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 پوسته‌ی زمین است که در غلظت‌های بسیار پایین ۰/۵-۰/۱ ppm به دلیل شرکت در ساختار آنزیم‌هایی مانند گلوتاتیون پراکسیداز و تیوردوکتازها و نقش آنتی‌اکسیدانی آن رتبه مهمی در هرم غذایی دارا می‌باشد (۳،۲). با این حال مواجهه با

*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 ppm ۳ به‌ویژه در فرم اکسی‌آنیون منجر به بروز مسمومیت‌های حاد از جمله اشکالات تنفسی جدی، ریزش مو، دفرمه شدن ناخن، نکروز پوستی، اختلالات تنفسی و گوارشی، اختلالات روانی، ناراحتی های 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). اکسی‌آنیون سلنیت با توجه به حلالیت بالاتر در محیط های 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 روش های مذکور در حذف غلظت های 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 اکسی‌آنیون، 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 اکسی‌آنیون صورت گرفته و طیف وسیعی از سویه‌های میکروبی عمدتاً متعلق به جنس‌های باکتریایی *Aeromonas*، *Thauera*، *Comamonas*، *Rhizobium*، *Bacillus*، *Pseudomonas*، *Duganella*، *Agrobacterium* (۱۳)، *Stenotrophomonas*، *Rhodopseudomonas*، *Rhodobacter*، *Rhodospirillum* (۱۴،۱۲)، *Shewanella* (۱۵) و تعدادی از سویه‌های قارچی متعلق به کپک‌های رشته‌ای *Aspergillus*، *Fusarium*، *Trichoderma* و *Phanerochaete* (۱۶،۱۰) و همچنین حذف سلنیت در مخمرهای *Rhodotorula mucilaginosa-13B*، *Saccharomyces cerevisiae*، *Candida utilis* و *Candida albicans* مطالعه شده است (۱۷).

علی‌رغم گستردگی حجم مقالات منتشره در ارتباط با حذف میکروبی سلنیت توسط سویه‌های باکتریایی و قارچی در سطح دنیا، تا به امروز مطالعه‌ی جامعی در مورد مخمرهای بومی صورت نگرفته است. بنابراین نیاز به مطالعه و گسترش واکنش‌های زیست‌پالایی در محیط‌های آلوده به این ترکیبات سمی توسط مخمرهای مقاوم به سلنیت، ضروری است. استفاده از سویه‌های مخمری به‌عنوان کاتالیست‌های ایمن در فرآیندهای زیست پالایی، به دلیل وجود آنزیم‌ها و پروتئین‌های ویژه در این میکروارگانیسم‌ها، قابلیت تکثیر و متابولیسم سریع، سطح تعامل بالا با محیط اطراف، جذب کارآمد مواد معدنی وتبدیل آنها در ساختارهای سلولی از جذابیت بالایی برخوردار است (۱۷). هدف از انجام این پژوهش، جداسازی و تعیین هویت مخمرهای بومی مقاوم به سلنیت جدا شده از پساب‌های صنعتی و ارزیابی عملکرد آنها به عنوان کاتالیست‌های طبیعی و ایمن در زیست‌پالایی سلنیت در جهت ارتقای سلامت و حفظ محیط زیست بود.

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 اکسی‌آنیون سمی سلنیت سدیم (تهیه شده از کمپانی سیگما-آلدریچ 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

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 نمونه‌های مربوط به پساب عمل شد. از کلنی‌های رشد کرده در محیط کشت کلرامفنیکل رزبنگال 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 سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. کلنی‌های خالص ایجاد شده از نظر ریخت شناسی مورد بررسی قرار گرفتند. کلیه مخمرهای مقاوم پس از کشت روی محیط کشت YPD براث در میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری حاوی گلیسرول ۲۰ درصد در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

با هدف ارزیابی الگوی تحمل‌پذیری ذاتی سویه‌های مخمری بومی نسبت به اکسی‌آنیون 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 غلظت‌های یون سلنیت (۲ تا ۱۸ گرم در لیتر)، پس از سترون کردن به‌وسیله فیلترهای غشایی سرسرنگی ۰/۲۲ میکرونی، به ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت YPD آگار استریل ذوب شده اضافه گردید و در پلیت پخش شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون مخمری با کدورت معادل نیم مک فارلند ($1/5\times10^{6}$ cells/ml) روی محیط آگاردار قرار گرفت و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت گرماگذاری شد. نتایج به‌صورت الگوی تحمل‌پذیری همراه با احیای یون سلنیت که با ایجاد کلنی قرمز رنگ در نتیجه‌ی احیای سلنیت به سلنیوم عنصری بود، گزارش شد. در روش دیسک دیفیوژن آگار، از دیسک‌های بلانک استریل ۴ میلی‌متری ساخت شرکت پادتن طب استفاده شد. برای این منظور، پس از تهیه‌ی سوسپانسیون استاندارد مخمری آن را بر روی محیط کشت YPD آگار با استفاده از سواپ استریل کشت داده، سپس دیسک‌های بلانک در پتری‌دیش‌های استریل حاوی ۱۰ گرم در لیتر اکسی‌آنیون سلنیت غوطه‌ور شد. بعد از ۱۵ دقیقه و پس از جذب کامل، دیسک‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا کاملاً خشک و جهت دیسک‌گذاری آماده شوند. دیسک‌های آغشته شده به ۱۰ گرم در لیتر یون سلنیت روی سطح محیط کشت YPD تلقیح شده با سویه‌های مخمری قرار داده شد. پلیت‌های مذکور به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. میانگین قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک به‌وسیله خط‌کش میلی‌متری مورد بررسی قرار گرفت. به منظور کاهش خطا، آزمایش سه بار تکرار شد.

نمودار منحنی‌های رشد سویه‌های مخمری برتر با پتانسیل ذاتی بالا در تحمل‌پذیری و احیای یون سمی سلنیت در محیط‌های کشت YPD براث فاقد سلنیت و YPD براث حاوی ۵ گرم در لیتر سلنیت بررسی شد. برای این منظور، از کشت ۲۴ ساعته سویه‌های مخمری، استاندارد ۰/۵ مک فارلند تهیه و سپس به میزان یک درصد به ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر از محیط‌های کشت مذکور افزوده شد. ارلن‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد 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 منحنی‌های رشد رسم شد. سپس با محاسبه‌ی شیب خط و از طریق فرمول زیر، زمان دو برابر شدن سلول‌های مخمری محاسبه گردید (۱۹).

$$\text{زمان دو برابر شدن} = \frac{\text{Ln } 2 = 0.694}{\mu\text{max} = \text{slope}}$$

در ادامه، محاسبه‌ی درصد بازدارندگی رشد سویه‌های مخمری در حضور اکسی‌آنیون 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: در صد بازدارندگی رشد، 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 اکسی‌آنیون سمی سلنیت در طول موج ۶۰۰ نانومتر.

شناسایی اولیه سویه مخمری se29w بر اساس صفات ریخت‌شناسی، خصوصیات فیزیولوژیک و آزمون‌های بیوشیمیایی انجام شد (۲۱). جهت تشخیص شکل سلولی با میکروسکوپ نوری، لام مرطوب از کشت یک روزه‌ی مخمر در محیط کشت YPD براث تهیه و بررسی گردید. مورفولوژی کلنی سویه‌ی 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

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 برمبنای 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 g×۳۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ می‌شود. سپس توده‌ی سلولی مخمری رسوب داده شده، به‌وسیله آب مقطر استریل، کاملاً شستشو داده شد. سپس سوسپانسیون مخمری در دور g×۳۰۰۰ 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 g×۱۵۰۰۰ سانتریفیوژ شد. محلول رویی برداشته شد و به میکروتیوب استریل دیگری منتقل گردید. هم‌حجم محلول رویی برداشت شده، اتانول اضافه شد. نمونه به‌مدت ۵ دقیقه در دور g×۱۵۰۰۰ 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 g×۱۵۰۰۰ سانتریفیوژ شده و سپس مایع رویی به‌وسیله سمپلر خارج شد. پس از تبخیر کامل اتانول به رسوب حاصل ۱۰۰میکرولیتر بافر TE اضافه نموده و تا زمان انجام فرآیند PCR درفریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۲۲). صحت استخراج DNA ژنومی با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم برماید 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 ژن های 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 پلیمراز 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 سترون و دیونیزه استفاده شد. همه‌ی مواد مصرفی از شرکت سیناکلون خریداری شد. شرایط دمایی واکنش در این فرآیند PCR به شرح زیر بود: واسرشت اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. چرخه تکثیر شامل ۳۰ سیکل تکرار شونده با دمای واسرشت 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

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

برای ارزیابی حذف میکروبی سلنیت از تکنیک کالریمتری و معرف ۳و۳-دی‌آمینوبنزیدین 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، غلظت های 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 یخچالی به مدت ۱۰ دقیقه در دور g×۳۰۰۰ 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 کاتالیست برای مطالعات حذف زیستی سلنیت استفاده شد (۲۵). آزمایشات در ارلن های 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 شاخص های 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 $P<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

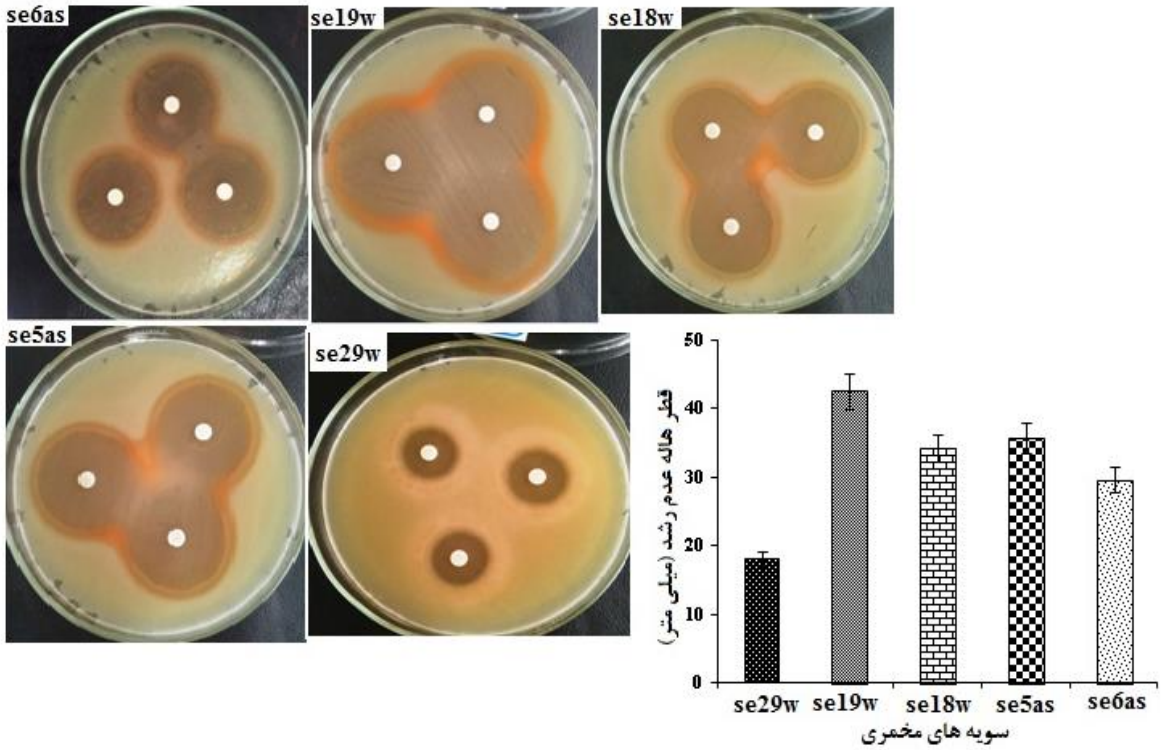
یافته‌ها

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).

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

سویه مخمر	محل جداسازی	ماکزیمم تحمل پذیری (گرم در لیتر)	ماکزیمم تحمل پذیری 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 مخمری، 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.

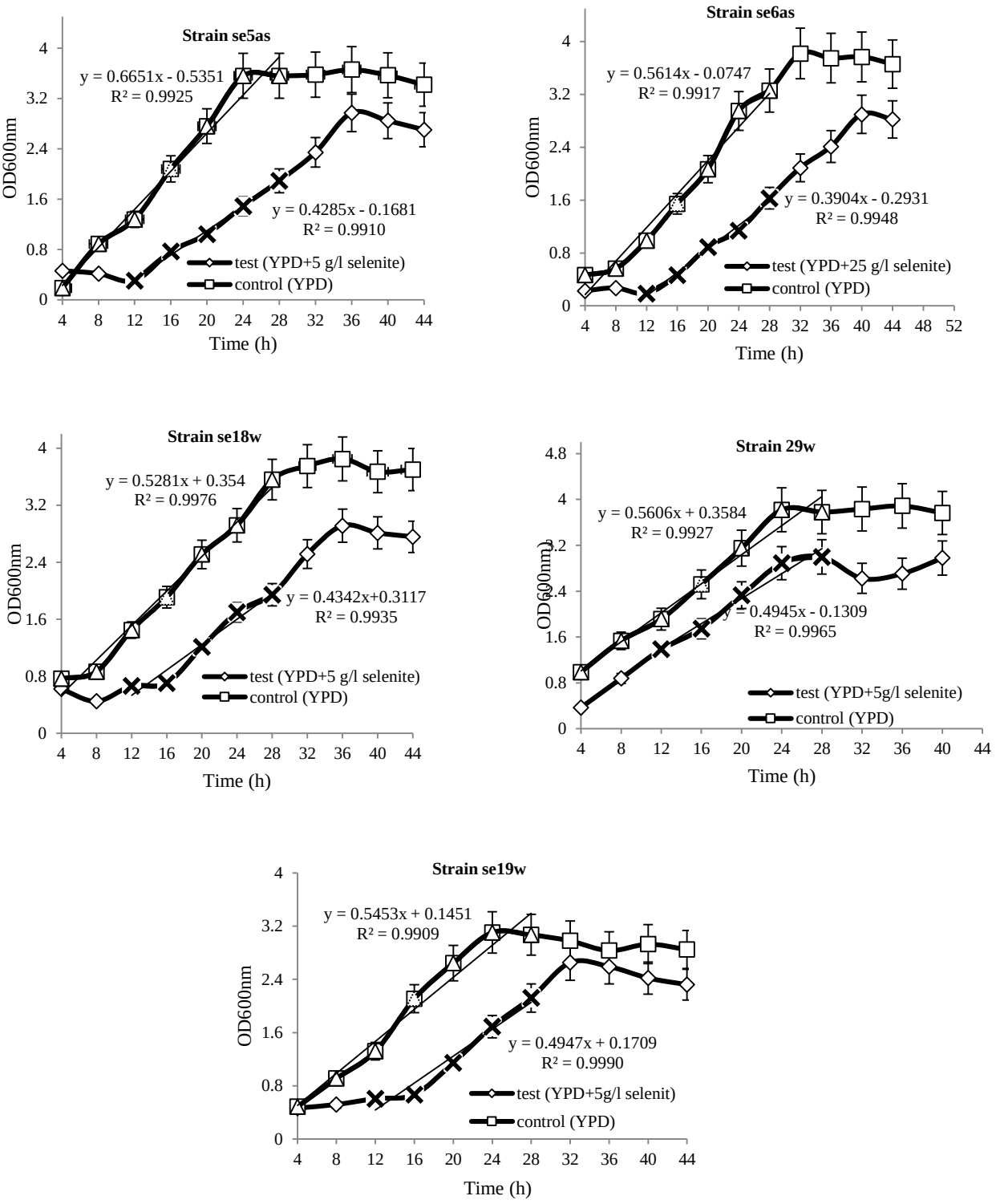
در این قسمت از پژوهش، با هدف انتخاب سویه‌ی مخمری کارآمد جهت آزمایشات سلنیت‌زدایی، اثر سمیت اکسی‌آنیون سلنیت علیه پنج جدایه مخمری se29w، se19w، se18w، se5as و se6as در محیط‌های کشت حاوی سلنیت در غلظت نهایی ۵ گرم در لیتر و بدون حضور سلنیت بررسی شد. با ترسیم منحنی‌های رشد سویه‌های مخمری مذکور، امکان تعیین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

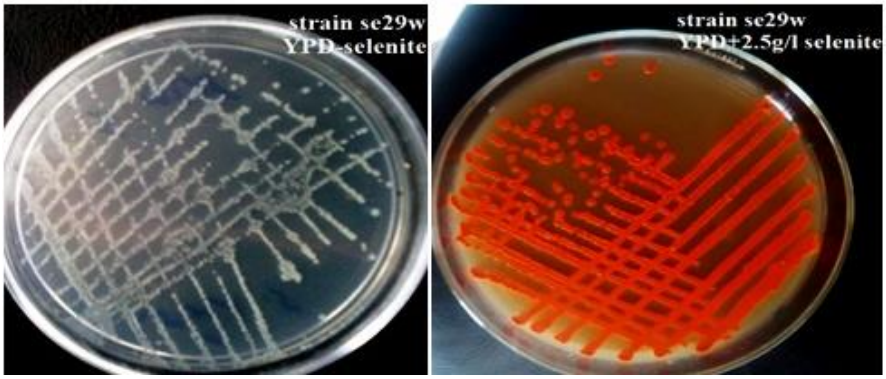
همانگونه که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، کمترین میانگین درصد بازدارندگی رشد در حضور سلنیت (۱۱/۱ درصد) مربوط به سویه‌ی مخمری se29w و بیشترین درصد بازدارندگی (۲۴/۱ درصد) متعلق به سویه‌ی مخمری se19w بود. میانگین درصد بازدارندگی در سایر سویه‌های مخمری بین ۱۶/۷ تا ۲۱/۲ درصد بود. در ارتباط با نتایج doubling time، کمترین

زمان دو برابر شدن سلولی که معادل ۱/۴ ساعت است، متعلق به جدایه‌های مخمری se29w و se19w بود که با توجه به نتایج درصد بازدارندگی (۱۱ درصدی در برابر ۲۴ درصد) و همچنین رشد نسبتاً سریع‌تر در محیط فاقد سلنیت (زمان تقریبی دو برابر شدن ۷۳ دقیقه‌ای در برابر ۷۶ دقیقه‌ای) و همچنین نتایج به‌د ست آمده از آزمایشات رقیق سازی در آگار (جدول ۱) و دیسک دیفیوژن آگار (شکل ۱) در نهایت، سویه‌ی مخمری se29W، به‌عنوان بهترین سویه جهت آزمایشات حذف میکروبی سلنیت انتخاب و مورد شناسایی فنوتیپی و ملکولی قرار گرفت.



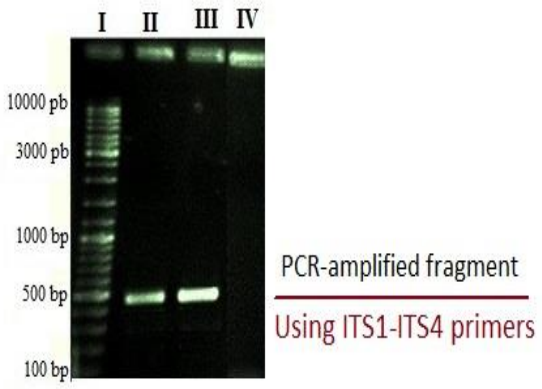
شکل ۲. منحنی رشد جدایه‌های مخمری مقاوم به سلنیت در محیط‌های کشت حاوی سلنیت در غلظت نهایی ۵ گرم در لیتر و بدن حضور سلنیت. آزمایشات سه بار تکرار شد و بار ۱ ± معرف انحراف معیار است.

شناسایی اولیه سویه مخمری se29w براساس ویژگی‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی صورت گرفت. سویه‌ی مورد بررسی از نظر میکروسکوپی به‌صورت تک سلولی و فاقد ریسه و به شکل کروی دیده شد که با جوانه زدن تکثیر می یابد. از نظر ماکروسکوپی، کلنی سویه‌ی مذکور در محیط کشت YPD آگار فاقد سلنیت به‌صورت کرم رنگ و در محیط کشت YPD آگار حاوی سلنیت سدیم قرمز رنگ بود که نمایانگر پتانسیل ذاتی مخمر مذکور در احیای اکسی‌آنیون سمی سلنیت به فرم سلنیوم عنصری است (شکل ۳).



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

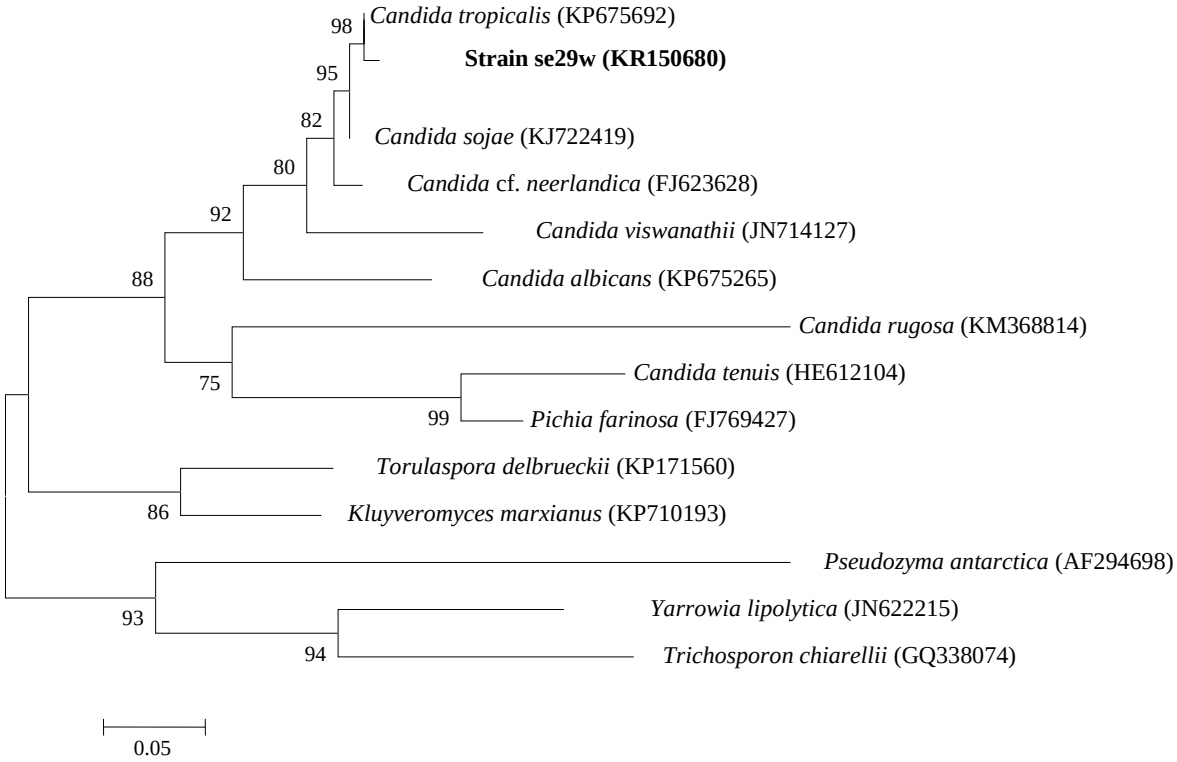
نتایج آزمون‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی نشان داد که سویه‌ی مذکور از نظر هیدرولیز اوره و نشاسته منفی و رشد در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مثبت است. از نظر تخمیر هیدرات‌های کربن، سویه‌ی مذکور توانایی تخمیر قندهای گلوکز، مالتوز، تری‌هالوز و گالاکتوز را دارد. این در حالی است که تخمیر قندهای لاکتوز و سوکروز منفی 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 لاکتوز، رافینوز و نیترات سدیم در سویه جداسازی شده منفی بود. براساس نتایج بررسی‌های میکرو سکوپی، ماکرو سکوپی 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).



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

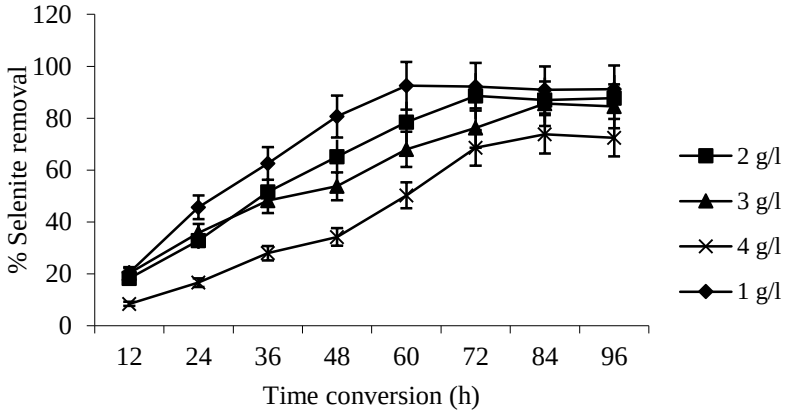
پس از تأیید محصول واکنش PCR، تعیین توالی و مقایسه‌ی ترادف ژنی در بانک اطلاعات NCBI، بالاترین شباهت به میزان ۹۹ درصد با مخمر *C. tropicalis* به‌دست آمد. در نهایت به منظور تعیین هویت دقیق ارتباط فیلوژنتیکی بین

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 شاخه ها با Bootstrap=1000 ترسیم شد (شکل ۵). رسم درخت فیلوژنتیکی حکایت از شباهت بالای سویه‌ی se29w با *C. tropicalis* و تأیید صحت نتایج حاصل از انجام هم‌ترازی توالی‌ها در پایگاه ژنی NCBI بود.



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.

در این بخش از پژوهش، از سلول‌های در حال استراحت (سلول‌های فعال از نظر متابولیکی و بدون رشد) مخمر بومی *C. tropicalis* به‌عنوان کاتالیست زیستی برای حذف میکروبی سلنیت از محیط‌های واکنش زیست تبدیلی استفاده شد. نتایج حاصل از اثر غلظت‌های مختلف یون سمی سلنیت در فرآیند تجزیه زیستی توسط مخمر مذکور در نمودار شکل ۶ نشان داده شده است.



شکل ۶. نمودار بررسی اثر غلظت‌های مختلف یون سمی سلنیت در حذف میکروبی سلنیت 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 ۱۸۰و 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 کارآیی 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 کارآیی 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 آزمایشات 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* شناسایی و در بانک ژنی با شماره قابل دسترس 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 تحمل پذیری 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 ریزوسفر گیاه گون دارای تحمل‌پذیری ۵۰ میلی مولاری 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 تحمل پذیری 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 تحمل پذیری 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 میکرودایلوشن 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 گلوتاتیون سلولی در سم‌زدایی و احیای سلنیت به سلنیوم می‌باشد (۳۱). در بخش

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 کارآیی 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.

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 سکوپی اتمیک و میکرو سکوپی، 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 بدین‌وسیله، مؤلفین این مقاله، مراتب تشکر و قدردانی خود را اعلام می‌دارند.

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 speciments: 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, Błażejak 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, Eglsãer 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.