

غربال گری کاندیدا تروپیکالیس se29w، جدا شده از پساب کارخانه تولید لاستیک، با

توان بالقوه‌ی زیست پالایی سلنیت سمی

دکتر مراحم آشنگرف^{*}، راضیه ارجمند^۱

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

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی سلوی - 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 سلوی 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، غربال گری اولیه براساس جداسازی در محیط کشت انتخابی کلرامفونیکل رزبنگال آگار غنی شده با سلنیت انجام شد. ارزیابی الگوی تحمل پذیری ذاتی سویه‌های غربال گری شده نسبت به سلنیت با استفاده از 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 ۳ و ۳- دی‌آمینو بنزیدین هیدروکلراید استفاده شد. تعیین هویت سویه مخمری کارآمد بر مبنای آنالیزهای فنتیپی و فیلوزتیکی انجام شد.

یافته‌ها: در مجموع ۳۲ جدایه مخمری مقاوم به سلنیت از نمونه‌های پساب و لجن فعال جدا گردید. براساس نتایج الگوی تحمل پذیری و تأیید نتایج به کمک دورت بدست آمده از رسم منحنی‌های رشد، سویه se29w (جدا شده از پساب کارخانه تولید لاستیک) با ماکریم تحمل پذیری ۱۸ گرم در لیتر نسبت به یون سمی سلنیت، به عنوان سویه کارآمد تحت نام کاندیدا تروپیکالیس مورد شناختی 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 به عنوان کاتالیست زیستی جهت آزمایشات سلنیت زدایی استفاده شد که براساس نتایج پس از ۶۰ ساعت گرماداری، 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 ۷/۲ و غلظت ۲۰ گرم در لیتر وزن تر توده سلوی مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: در این مقاله برای نحس‌تین بار حذف و احیای سلنیت در گونه‌ی مخمری کاندیدا تروپیکالیس گزارش شد. روش‌های غربال گری 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:

Ashengroh 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 شsst 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 (۲، ۳). با این حال مواجهه با

با توسعه روزافزون فعالیت‌های صنعتی و کشاورزی و مصرف بی‌رویه‌ی مواد سنتیک 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 نمایش: ۶۶۲۴۱۳۳؛ پست الکترونیک: m.ashengroh@uok.ac.ir

Phanerochaete (۱۶)، *Rhodotorula mucilaginosa*-13B و *Candida utilis* *Saccharomyces cerevisiae* 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 به عنوان کاتالیست‌های ایمن در فرآیندهای زیست‌پالایی، به دلیل وجود آنزیم‌ها و پروتئین‌های ویژه در این میکرووارگانیسم‌ها، قابلیت تکثیر و متابولیسم سریع، سطح تعامل بالا با محیط اطراف، جذب کارآمد موادمعدنی و تبدیل 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 یا سوچ 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 داشگاه کردستان منتقل و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد محافظت شدند. جهت جداسازی و خالص‌سازی مخمرهای بومی با پتانسیل ذاتی تحمل پذیری بالا نسبت به اکسی‌آنیون سمی سلنیت سدیم (تهیه شده از کمپانی سیگما-آلدریج انگلستان)، تراکم‌های متفاوت از نمونه‌های پساب جمع‌آوری شده (۵۰ و ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرولیتر) به طور 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

غلظت‌های بالاتر از ۳ ppm 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، 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 هوایی یافت می‌شوند و تمايل به تجمع زیستی دارند (۵). اکسی‌آنیون سلنیت با توجه به حلایت 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 به کارگیری تکنیک‌های فیزیکوشیمیایی متعدد در راستای حذف سلنیت مانند تبادل یونی، اسمز معکوس، احیای کاتالیستی، رسوب‌گذاری و تیمار الکتروشیمیایی (۷،۸)، 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 به عنوان روش جایگزین پیشنهاد شده است (۹،۱۰). کاربرد میکرووارگانیسم‌ها به عنوان 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. میکرووارگانیسم‌ها 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 بهسازی در چرخه‌های زیست‌پالایی و ژئوشیمیایی سلنیوم ایفا می‌کند (۱۲).

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

اطراف دیسک به وسیله خط کش میلی‌متری مورد بررسی قرار گرفت. به منظور کاهش خطا، آزمایش سه بار تکرار شد. نمودار منحنی‌های رشد سویه‌های مخمری برتر با پاتنسیل ذاتی بالا در تحمل پذیری و احیای یون سمی سلنتیت در محیط‌های کشت YPD براث فاقد سلنتیت و YPD براث حاوی ۵ گرم در لیتر سلنتیت 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 تاریخی سه تکرار در نظر گرفته شد. پس از ترسیم منحنی‌های رشد، بهترین خط میاس بر فاز لگاریتمی منحنی‌های رشد رسم شد. سپس با محاسبه شیب خط و از طریق فرمول زیر، زمان دو برابر شدن سلول‌های مخمری محاسبه گردید (۱۹).

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

در ادامه، محاسبه‌ی درصد بازدارندگی رشد سویه‌های مخمری در حضور اکسی‌آنیون سمی سلنتیت 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 رشد OD_{600nm} control و OD_{600nm} test: جذب نوری مخمر در محیط YPD براث بدون حضور سلنتیت 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 سلنتیت 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 مرتکوب از کشت یک روزه‌ی مخمر در محیط کشت YPD براث تهیه و بررسی گردید. مورفولوژی کلنی سویه‌ی مخمری YPD se29w روی محیط‌های کشت YPD آگار و YPD آگار حاوی سلنتیت سدیم بررسی شد. جهت انجام شناسایی جذب قند‌ها از محیط Yeast Nitrogen Base (YNB) (خریداری شده از کمپانی HiMedia هند) استفاده گردید. پس از اضافه نمودن منابع قندی مختلف در

هر نمونه در ۹۰ میلی لیتر محلول ایزوتوئنیک آب پیتونه استریل (۱۰ گرم در لیتر پیتون 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 رزینگال آگار حاوی ۲ گرم در لیتر سلنتیت برداشته و در محیط کشت آگار حاوی (گلوكز ۲٪، پیتون ۲٪ و عصاره مخمر ۱٪ و ۰٪ آگار) حاوی ۲ گرم در لیتر یون سمی سلنتیت کشت داده شد و در شرایط تاریکی در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. کلنی‌های خالص ایجاد شده از نظر ریخت‌شناسی مورد بررسی قرار گرفتند. کلیه مخمرهای مقاوم پس از کشت روی محیط کشت YPD براث در میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری حاوی گلیسروول ۲۰ درصد در فریزر -۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

با هدف ارزیابی الگوی تحمل پذیری ذاتی سویه‌های مخمری بومی نسبت به اکسی‌آنیون سمی سلنتیت، 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 سلنتیت ۲۰ تا ۱۸ گرم در لیتر، پس از سترون کردن به وسیله 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 سوپیازسیون مخمری با کدورت معادل نیم مک فارلند ($1/5 \times 10^6 \text{ cells/ml}$) روی محیط آگاردار قرار گرفت و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت گرمگذاری شد. نتایج به صورت الگوی تحمل پذیری همراه با احیای یون سلنتیت که با ایجاد کلنی قرمز رنگ در نتیجه‌ی احیای سلنتیت 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 سوپیازسیون استاندارد مخمری آن را بر روی محیط کشت YPD آگار با استفاده از سوپاپ استریل کشت داده، سپس دیسک‌های بلانک در پتري‌دishes‌های استریل حاوی ۱۰ گرم در لیتر اکسی‌آنیون سلنتیت 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 سلنتیت روی سطح محیط کشت YPD تلقیح شده با سویه‌های مخمری قرار داده شد. پلیت‌های مذکور به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳ درجه سانتی‌گراد گرمگذاری شدند. میانگین قطر هاله عدم رشد در

استفاده از اتانول ۷۰ درصد شستشو داده شد. مخلوط حاصله به مدت ۱۰ دقیقه روی بخ قرار داده شد. پس از آن به مدت ۵ دقیقه در دور $15000 \times g$ سانتریفیوژ شده و سپس مایع رویی بهوسیله سمپلر خارج شد. پس از تبخیر کامل اتانول به رسوب حاصل ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر TE اضافه نموده و تا زمان انجام فرآیند PCR در فریزر -۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری شد (۲۲). صحت استخراج DNA ژنومی با استفاده از الکتروفوروز ژل آگارز ۱/۵ درصد و رنگ آمیزی با اتیدیوم بررسی شد. پس از استخراج DNA ژنومی سویه مخمری ITS1 (tccgttaggtgaacctgcgg) و ITS4 (tcctcccgcttattgatatgc) استفاده از دو پرایمر همگانی ITS1 که از آنها برای شناسایی و طبقه بندی انواع یو کاریوت ها استفاده می شود، تکثیر ژن ITS مربوطه انجام پذیرفت. با استفاده از پرایمرهای نواحی (Internal Transcribed Spacers) که برای نواحی حفاظت شده ی ژن های ریبوزومی 18S (ITS1) و 28S (ITS4) طراحی شده اند، بخش کاملی از زیر واحد ریبوزومی 5.8S و همچنین نواحی غیر کدینگ ITS2 و ITS1 تکثیر شد. واکنش زنجیره ای پلیمراز در دستگاه ترموماسایکلر ساخت شرکت BioRad ۲۵ ک شور آمریکا انجام شد. مخلوط واکنش PCR میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر Master mix (حاوی بافر Taq-polymerase dNTPs MgCl₂ و آنزیم PCR میکرولیتر آغاز گرهای بالادرست و پایین درست (۱۰ میکرومولار)، یک میکرولیتر DNA الگو (غلظت تقریبی ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر) و ۹/۵ میکرولیتر آب مقطر سترون و دیونیزه استفاده شد. همه می مواد مصرفی از شرکت سیناکلون خریداری شد. شرایط دمایی واکنش در این فرآیند PCR به شرح زیر بود: وا سر شت اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. چرخه تکثیر شامل ۳۰ سیکل تکرار شونده با دمای وا سر شت اولیه ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و دمای بسط ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه. پس از اتمام سیکل ها و به منظور تکثیر و تکمیل نهایی DNA استخراج شده، نمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد گرم اگذاری شدند. پس از اطمینان از صحت انجام PCR و عدم وجود آلودگی از طریق الکتروفوروز بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد، تحت شرایط بافری TAE و در ولتاژ ۸۰، توالی نوکلئوتیدی سویه مخمری se29w ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر TE (۱۰ mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% SDS, 2% Triton X-100) اضافه و ورتكس شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از محلول فنل- کلروفرم (با نسبت ۱ به ۱) و همچنین ۳۰۰ میلی گرم از دانه های شیشه ای اضافه شد. سپس به مدت ۳ دقیقه به شدت ورتكس شد. پس از ورتكس نمودن، ۲۰۰ میکرولیتر بافر TE (۱۰ mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA ۵ دقیقه با دور $15000 \times g$ سانتریفیوژ شد. محلول رویی برداشته شد و به میکروتیوب استریل دیگری منتقل گردید. هم حجم محلول رویی برداشت شده، اتانول اضافه شد. نمونه به مدت ۵ دقیقه در دور $15000 \times g$ در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. پس از آن، به منظور حذف نمک های اضافی و سایر ناخالصی ها، DNA رسوب یافته با

غلظت ۵ درصد به محیط مذکور، محلول های فوق با استفاده از فیلترهای سرنگی ۲۲/۰ میکرونی استریل شد. سپس به لوله های حاوی مواد قندی تهیه شده، سو سپانسیون رقیقی از سویه مخمری فوق تلقیح شد. پس از آن، لوله ها در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد 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 تست های تخمیری هیدرات های کربن، معادل ۲ گرم از منابع قندی مختلف در محلول ۱ درصد عصاره مخمر حل شد و سپس ۵ میلی لیتر از محیط ساخته شده قندی به لوله های آزمایش حاوی لوله های دور هام، اضافه شد. بدنبال اتوکلاو نمودن با استفاده از لوپ های سوزنی از یک کشت فعل مخمری به محیط های فوق تلقیح و سپس لوله ها در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳ هفته در انکوباتور قرار داده شدند. رشد در دماهای مختلف روی محیط YPD آغاز انجام شد. سایر تست های بیوشیمیایی مهم به ویژه هیدرولیز نشاسته و اوره نیز بر مبنای دستور العمل توصیه شده Kurtzman and Fell (۲۱) انجام شد. برای بررسی ملکولی مخمر جدا شده، DNA ژنومی با استفاده از روش استاندارد تخریب به کمک دانه های شیشه ای، استخراج شد (۲۲). برای این منظور، بعد از کشت ۲۴ ساعته سویه مخمری در محیط YPD براث، ۱ میلی لیتر از محیط $3000 \times g$ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ می شود. سپس توده هی سلولی مخمری ر رسوب داده شده، به وسیله آب مقطر استریل، کاملاً شستشو داده شد. سپس سو سپانسیون 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 ۱۰ mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% SDS, 2% Triton X-100 بافر لیز کننده (۱۰ mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA, ۱۰۰ mM NaCl, ۱% SDS, ۲% Triton X-100) اضافه و ورتكس شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از محلول فنل- کلروفرم (با نسبت ۱ به ۱) و همچنین ۳۰۰ میلی گرم از دانه های شیشه ای اضافه شد. سپس به مدت ۳ دقیقه به شدت ورتكس شد. پس از ورتكس نمودن، ۲۰۰ میکرولیتر بافر TE (۱۰ mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA ۵ دقیقه با دور $15000 \times g$ سانتریفیوژ شد. محلول رویی برداشته شد و به میکروتیوب استریل دیگری منتقل گردید. هم حجم محلول رویی برداشت شده، اتانول اضافه شد. نمونه به مدت ۵ دقیقه در دور $15000 \times g$ در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. پس از آن، به منظور حذف نمک های اضافی و سایر ناخالصی ها، DNA رسوب یافته با

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)، از این سلول‌های برداشت شده به عنوان کاتالیست 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 اسپکتروفوتومتر 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 برآسانس 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 تحمل پذیری ذاتی نزدیک به ۴۶/۸ درصد از سویه‌های مقاوم در محدوده ۲/۵ تا ۵ گرم در لیتر، ۳۷/۵ درصد در محدوده ۵ تا ۱۰ گرم در لیتر و ۱۵/۷ درصد در محدوده ۱۱ تا ۱۸ گرم در لیتر قرار داشت. از مجموع سویه‌های جدا شده، تنها ۵ سویه مخمری دارای بالاترین مقاومت همراه با احیای یون سمی سلنیت به سلنیوم عنصری را نشان دادند. سویه مخمری Se29w (جدا شده از پساب کارخانه تولید لا ستیک) دارای ماکزیمم تحمل پذیری (رشد تا ۱۸ گرم در لیتر) و احیای سلنیت تا ۱۶ گرم در لیتر بود (جدول ۱).

نرم افزارهای بیوانفورماتیکی ClustalW و BioEdit و MEGA 6 توالي‌های در یافته مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (۲۳).

برای ارزیابی حذف میکروبی سلنیت از تکنیک کالریمتري و معرف ۳-دی‌آمینوبنزیدین (Diaminobenzidine hydrochloride 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 اسپکتروفوتومتر (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 کالیبراژیون، با قرار دادن جذب در معادله 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:

$$\text{Selenite removal (\%)} = \frac{(C_i - C_r)}{C_i} \times 100$$

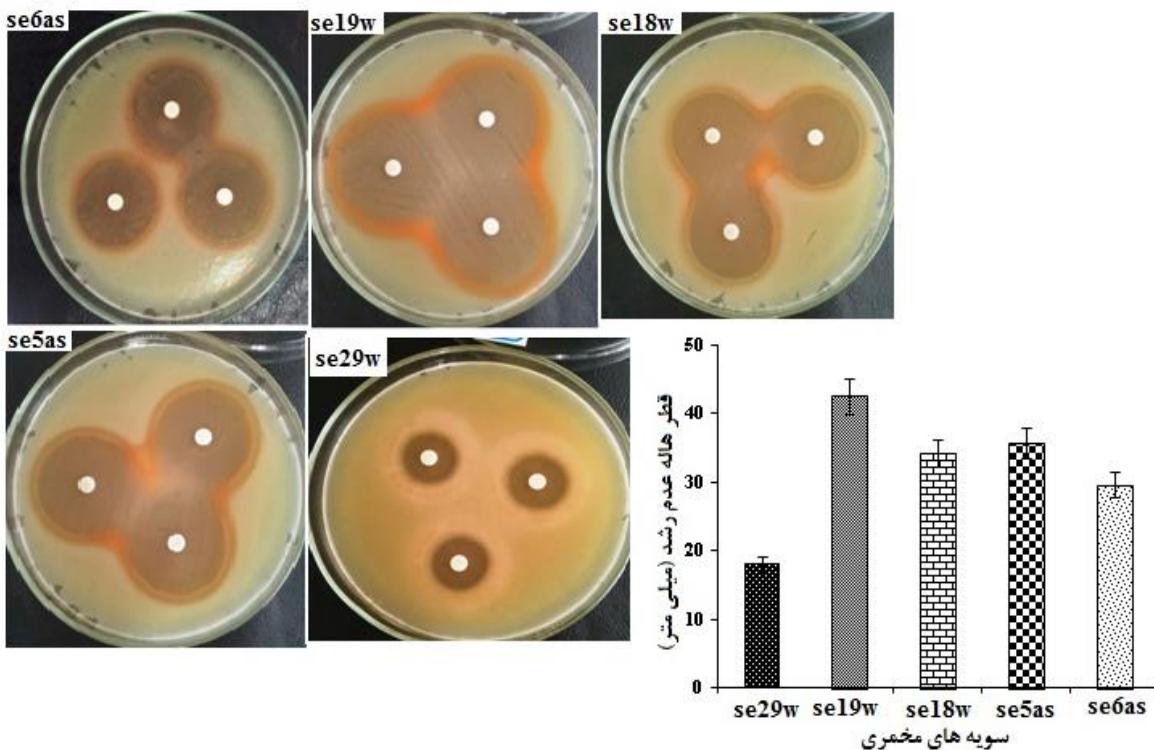
که در آن C_i : غلظت اولیه سلنیت در محیط واکنش زیست تبدیلی و C_r : غلظت سلنیت باقیمانده در محیط واکنش است. برای تهیه سلول‌های در حال استراحت سویه‌ی مخمری Se29w با هدف انجام واکنش حذف زیستی سلنیت، از روش زیر استفاده شد. سویه‌ی مخمری مذکور در محیط کشت YPD براث تا رسیدن به انتهای فاز رشد لگاریتمی رشد داده شد. سپس سلول‌های مخمری با استفاده از سانتریفیوژ

جدول ۱. الگوی تحمل پذیری 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)	ماکزیمم تحمل پذیری (گرم در لیتر)
Se29w	پساب تولیدات لاستیکی-یزد	۱۸	۱۸	۱۶
Se6as	لجن فعال برک-اصفهان	۱۵	۱۵	۱۳
Se18w	پساب کارخانه شیشه و بلور-شیراز	۱۴	۱۴	۱۲
Se5as	لجن فعال رودخانه-یاسوج	۱۳	۱۳	۱۳
Se19w	پساب کارخانه مواد بهداشتی-اصفهان	۱۱	۱۱	۱۱

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

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



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.

تعیین زمان دو برابر شدن سلول‌ها که از شب خطف رشد لگاریتمی محاسبه شد، فراهم گردید (شکل ۲). همچنین به کمک دانسیته‌های نوری بدست 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).

در این قسمت از پژوهش، با هدف انتخاب سویه‌ی مخمری کارآمد جهت آزمایشات سلنیت‌زدایی، اثر سمتی 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

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).

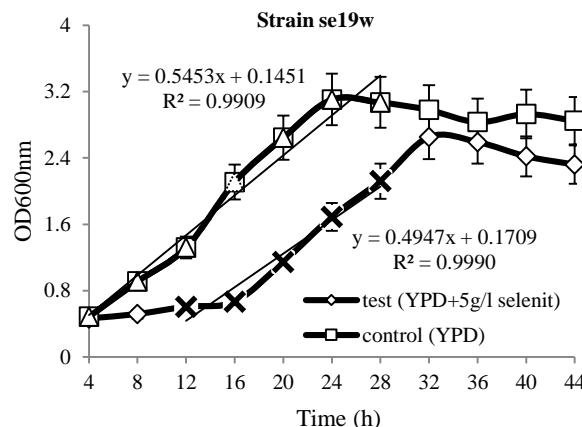
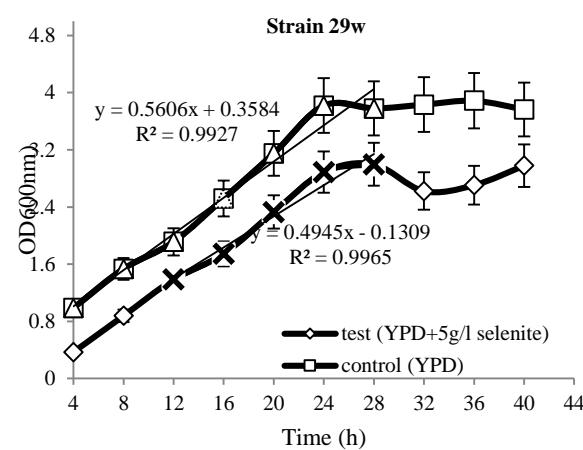
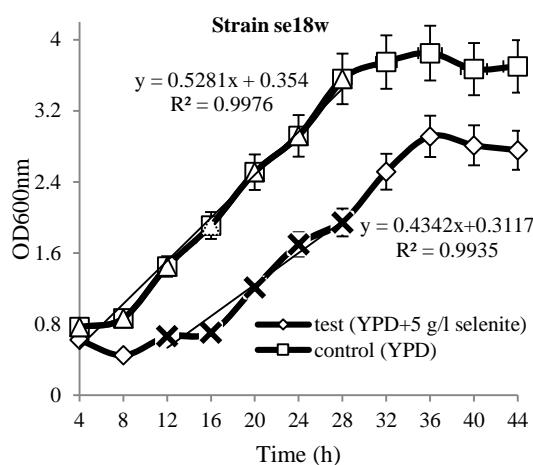
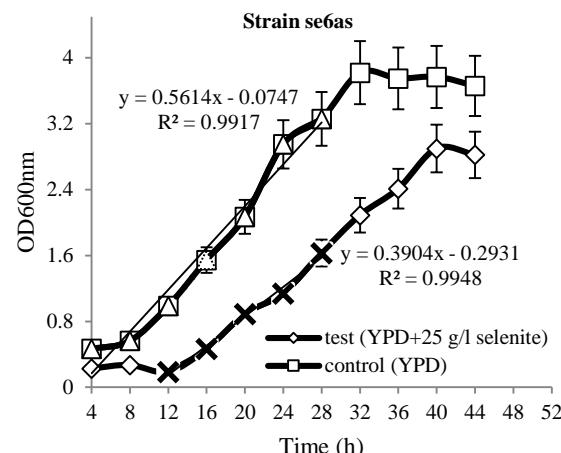
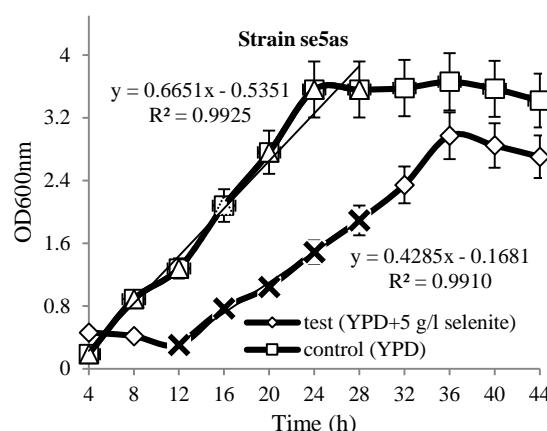
% Growth inhibition in YPD broth+5 g/l SeO_3^{2-}	Doubling time (hour)		سویه‌ی مخمری
	YPD broth+5g/l SeO_3^{2-}	YPD broth	
11.1	1.40	1.23	Se29w
24.1	1.40	1.27	Se19w
20.7	1.59	1.31	Se18w
21.2	1.62	1.04	Se5as
16.73	1.77	1.23	Se6as

(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

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

همچنین نتایج بهدست 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 سلنتیت انتخاب و مورد شناسایی فنوتیپی و ملکولی قرار گرفت.

زمان دو برابر شدن سلولی که معادل ۱/۴ ساعت است، متعلق به جدایهای 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 سلنتیت (زمان تقریبی دو برابر شدن ۷۳ دقیقه ای در برابر ۷۶ دقیقه ای) و



شکل ۲. منحنی رشد جدایهای مخمری مقاوم به سلنتیت در محیط‌های کشت حاوی سلنتیت در غلظت نهایی ۵ گرم در لیتر و بدنه حضور سلنتیت. آزمایشات سه بار تکرار شد و با ± 1 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 اکسی آنیون سمی سلنیت به فرم سلنیوم عنصری است (شکل ۳).

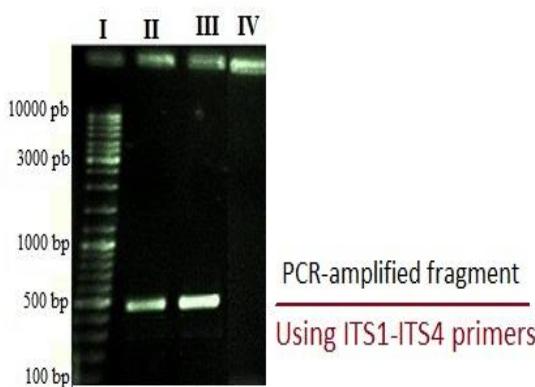
شناسایی اولیه سویه مخمری se29w براساس ویژگی های فنوتیپی و بیوشیمیایی صورت گرفت. سویه مورد بررسی از نظر میکروسکوپی به صورت تک سلولی و فاقد ریسه و به شکل کروی دیده شد که با جوانه زدن تکثیر می یابد. از نظر ماکروسکوپی، کلني سویه مذکور در محیط کشت YPD



شکل ۳. مورفولوژی کلني سویه مخمری se29w روی محیط های کشت YPD آگار فاقد سلنیت و آگار حاوی سلنیت سدیم.

لاکتوز، رافینوز و نیترات سدیم در سویه جداسازی شده منفی بود. براساس نتایج بررسی های میکرو سکوپی، ماکرو سکوپی و آزمون های بیوشیمیایی و مطابقت نتایج مذکور با کتاب مرجع شنا سایی مخمرها (۲۱)، سویه se29w به طور موقت تحت نام سایی مخمرها *Candida tropicalis* تعیین هویت شد. در ادامه جهت شناسایی دقیق تر، آزمون های ملکولی و فیلوجنتیکی 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 به دست آمد (شکل ۴).

نتایج آزمون های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی نشان داد که سویه مذکور از نظر هیدرولیز اوره و نشاسته منفی و رشد در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد مشبت است. از نظر تخمیر هیدرات های کربن، سویه مذکور توانایی تخمیر قند های گلوکز، مالتوز، تری هالوز و گالاكتوز را دارد. این در حالی است که تخمیر قند های لاکتوز و سوکروز منفی است. همچنین نتایج جذب منابع کربن و ازت حکایت از مشبت بودن تست های مصرف گلوکز، مالتوز، سوکروز، ال- آرابینوز، مانیتول، گلیسرول و سیترات سدیم توسط سویه مذکور دارد. رشد بر روی



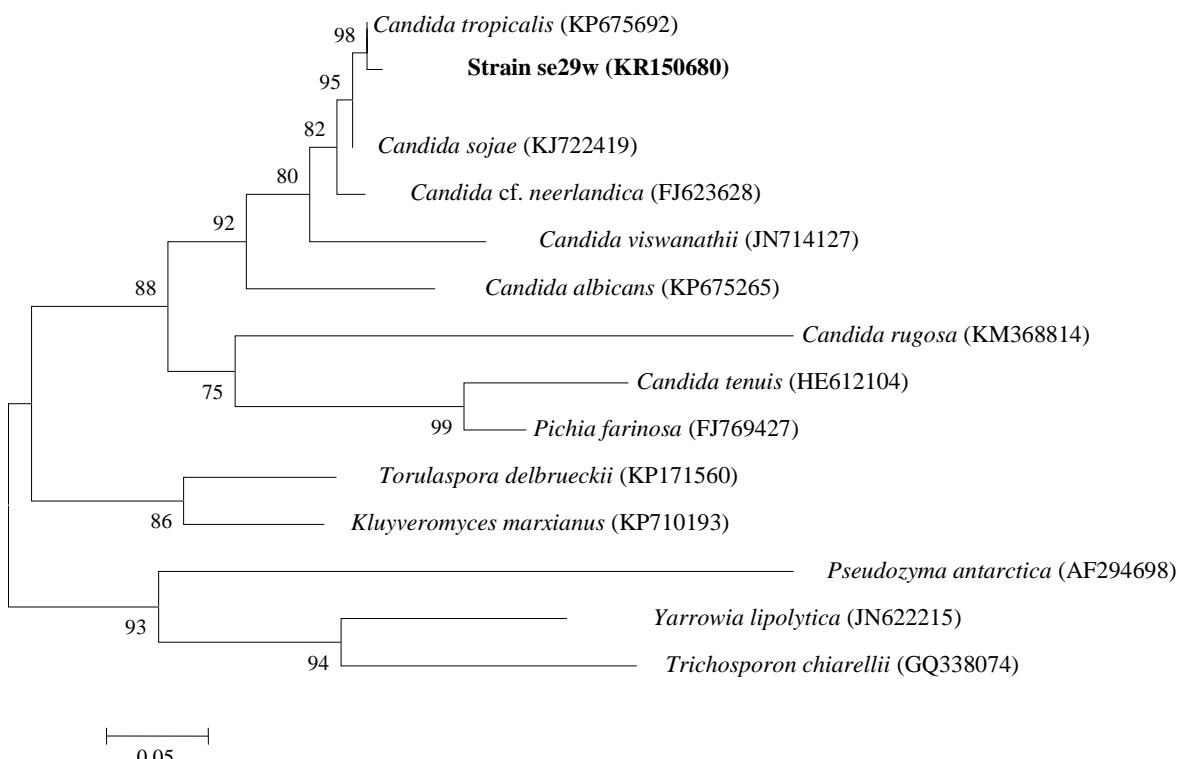
شکل ۴. تصویر ژل الکتروفورز تکثیر rDNA ژنومی با استفاده از پرایم رفت ITS1 و برگشت ITS4 و ظهور باند منفرد ۴۹۹ جفت بازی. I: مارکر، II: سویه مخمری se29w و III: سویه مخمری MCF7 کنترل منفی.

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

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

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

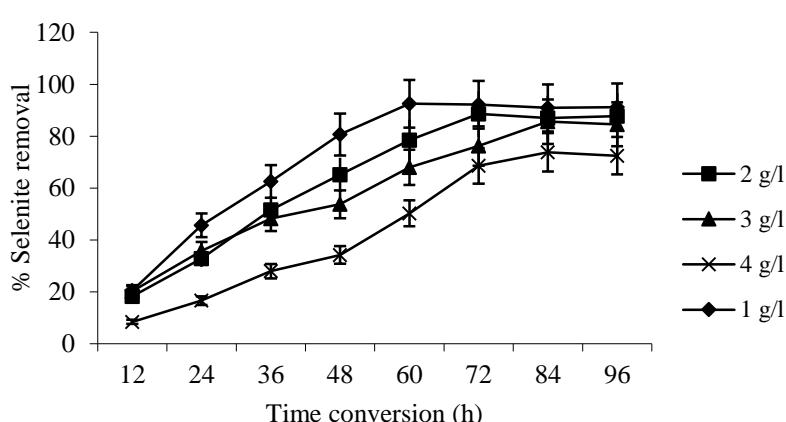
سویه‌ی se29w با سویه‌های ثبت شده در بانک ژنی، درخت فیلوجنتیکی به روش نزدیکترین هم‌جواری (Neighbor-joining) و با شرایط cut off=50 و مقدار پایداری شاخه‌ها با Bootstrap=1000 ترسیم شد (شکل ۵). رسم درخت



شکل ۵. درخت فیلوجنتیکی 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 سلنتی 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 متابولیکی و بدون رشد) مخمر بومی (*C. tropicalis* به عنوان کاتالیست زیستی برای حذف میکروبی سلنتیت از محیط‌های واکنش زیست تبدیلی استفاده



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

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 سلنجیت 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 خاک ریزو-سفر گیاه گون دارای تحمل پذیری ۵۰ میلی‌مولاری نسبت به یون سمی سلنجیت است (۲۷). در مطالعه‌ی دیگری که توسط Hunter و Kuykendall در سال ۲۰۰۶ صورت گرفت، یک سویه‌ی باکتری تحت نام *Aeromonas* با حداکثر تحمل پذیری ۲۵ میلی‌مولار نسبت به سلنجیت 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 سلنجیت 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 سلنجیت را گزارش دادند (۱۳). در جدیدترین مطالعات صورت گرفته در ارتباط با حذف و احیای سلنجیت 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 سلنجیت، جدا سازی نمودند (۳۰). لازم به توضیح است که در بیشتر مطالعات ذکر شده، تعیین الگوی تحمل پذیری با هدف انتخاب سویه‌ی کارآمد، تنها با روش‌های رقت در آگار و یا میکرو‌دایلوشن براث صورت گرفته است. در حالی که در مطالعه‌ی حاضر، از ترکیبی از روش‌ها از جمله رقت در آگار، دیسک دیفیوژن آگار و بررسی منحنی رشد مخمر در حضور غلظت‌های سمی سلنجیت با هدف انتخاب کارآمدتر سویه‌ی بومی غربال‌گری شده جهت آزمایشات سلنجیت‌زادی ا استفاده شده است. با وجود تنوع مطالعات بررسی حذف و احیای سلنجیت 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 سلنجیت (حداکثر تحمل پذیری در حدود ۴ میلی‌مولار) و نقش احتمالی سیستم گلوتاتیون سلولی در سمزدایی و احیای سلنجیت به سلنجیوم می‌باشد (۳۱). در بخش

براساس این نتایج، مخمر مورد مطالعه، قادر به حذف نسبتاً مناسبی از سلنجیت 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 سلنجیت در نتیجه‌ی کاهش فعالیت متابولیکی و سسمیت یون سلنجیت، کاسته شد. لذا می‌توان نتیجه گرفت که میزان حذف، به غلظت اولیه‌ی یون سلنجیت در محیط زیست تبدیلی ارتباط دارد. پس از ۶۰ ساعت گرمگذاری، سلول‌های در حالت استراحت سویه‌ی مخمری مذکور توانست به میزان ۹۲/۵ درصد از سلنجیت 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 سلنجیت سمی در غلظت‌های پایین دارد.

بحث

انتشار مقدایر بالای سلنجیوم 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 میکرووارگانیسم‌های مقاوم است، بنابراین در بخش نخست این مطالعه، پس از نمونه‌گیری از پساب‌های آلوده به سلنجیت با توجه به سازگاری فیزیولوژیک و ژنتیکی میکرووارگانیسم‌های کارآمد، جداسازی و شناسایی ملکولی مخمرهای بومی با پتانسیل ذاتی تحمل پذیری بالا به سلنجیت مورد بررسی قرار گرفت. پس از انجام موفقیت آزمایشات مرتبط با الگوی تحمل پذیری شامل روش‌های رقت در آگار، دیسک دیفیوژن آگار و بررسی سنتیک رشد سویه‌های مخمری برتر، در نهایت از میان ۳۲ سویه‌ی مخمری جدا شده، سویه‌ی مخمری se29W جدا شده از کارخانه تولید لاستیک در یزد، به عنوان سویه‌ی کارآمد مورد شناسایی *C. tropicalis* و ملکولی قرار گرفت و تحت نام KR150680 شناسایی و در بانک ژنی با شماره قابل دسترس ۱۸ ثبت شد. مخمر مذکور پتانسیل تحمل پذیری و احیای نسبتاً بالایی از اکسی‌آنیون سمی سلنجیت به ترتیب در غلظت‌های ۱۶ 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 تحمل پذیری و مقاومت میکرووارگانیسم‌های غربال‌گری شده نسبت به سلنجیت صورت گرفته که در ذیل به برخی از

نتیجه‌گیری

با توجه به مقاومت بالا همراه با حذف و احیای اکسی‌آنیون سمی سلنجیت توسط مخمر بومی *C. tropicalis* strain se29w در یک نتیجه‌گیری کلی می‌توان ترکیب روش‌های غربال‌گری استفاده شده در پژوهش اخیر را به عنوان گامی مؤثر در راستای جداسازی بهتر مخمرهای کارآمد به کار گرفته شده به عنوان کاتالیست‌های طبیعی این و ارزان برای آزمایشات سلنجیت‌زدایی، 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 سلنجیت، با استفاده از روش‌های اسپکتروسکوپی اتمیک و میکرو‌سکوپی، می‌تواند مبنای 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 و سیله، مؤلفین این مقاله، مرا تب تشکر و قدردانی خود را اعلام می‌دارند.

دوم این پژوهش، استفاده از سلول‌های در حال استراحت سویه‌ی مخمری se29w به عنوان کاتالیزور در حذف سلنجیت سمی از محیط‌های زیست تبدیلی حاوی اکسی‌آنیون مورد ارزیابی قرار گرفت که براساس نتایج به دست آمده پس از ۶۰ ساعت گرم‌گذاری، سلول‌های در حال استراحت سویه‌ی مخمری مذکور توانست به میزان ۹۲/۵ درصد از سلنجیت 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 سلنجیت سمی در غلظت‌های پایین دارد. لازم به توضیح است که راندمان به دست آمده تحت شرایط بهینه نشده بوده و با بهینه‌سازی فاکتورهای واکنش زیست تبدیلی از جمله غلظت اولیه کاتالیزور میکروبی (توهدی زیستی استفاده شده)، pH، دور شیکر و سایر متغیرهای احتمالی مؤثر به راندمان‌های مطلوب‌تر در غلظت‌های بالاتر از سلنجیت اولیه‌ی به کار گرفته شده به عنوان سویس‌ترای واکنش دست یافته. همچنین، در این پژوهش مشخص شد سویه بومی se29w توانایی احیای سلنجیت سمی به سلنیوم را دارا بوده که تعیین دقیق میزان احیای سلنجیت 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 testosteronei* 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, 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. Ashengroh 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.