Archive of SID

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال پنجم، شماره ۱۹، پاییز ۱۳۹۵، صفحه ۷۸- ۶۳
تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۵/۰۶ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۰/۰۹

زیست‌پالایی سلنیت توسط *لاکتوکوکوس رافینولاکتیس* seD2b مقاوم به سلنیت در مقیاس آزمایشگاهی

مراحم آشنگرف [*]: استادیار میکروبیولوژی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران، m.ashengroph@uok.ac.ir
داود صاعدی: دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی- مولکولی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران، davoudsaedi@gmail.com

چکیده

مقدمه: اکسی‌آنیون‌های سلنیوم محلول به‌ویژه سلنیت در منابع آب و خاک وضعیت نگران‌کننده‌ای برای سلامت افراد و محیط زیست ایجاد کرده است. در این بررسی غربالگری باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک مقاوم به سلنیت و توانایی آن‌ها به‌عنوان زیست کاتالیزگر ایمن در زیست‌پالایی سلنیت ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها: تعیین حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی از رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) جدایه‌های باکتری نسبت به سلنیت با روش رقت در آگار تعیین شد. ارزیابی اثر مهارکنندگی سلنیت بر جدایه‌های باکتری با روش انتشار در چاهک انجام شد. از روش کدورت‌سنجی برای بررسی سنتتیک رشد استفاده شد. جدایهٔ باکتری کارآمد براساس تست‌های بیوشیمیایی و فیلوژنتیکی شناسایی شد. برای سنجش حذف سلنیت از رنگ‌سنجی و معرف ۳ و ۳- دی آمینو بنزیدین استفاده شد.

نتایج: نتایج نشان داد *لاکتوکوکوس رافینولاکتیس* جدایهٔ seD2b بالاترین مقادیر MIC (۱۱۰ میلی‌مولار) و MBC (۱۴۰ میلی‌مولار) و کمترین میزان مهارکنندگی با میانگین مهاری ۲۶/۶ میلی‌متر را در محیط‌های کشت حاوی سلنیت به خود اختصاص داد. بعد از ۷۲ ساعت واکنش زیست‌تبدیلی تحت شرایط سلول‌های در حال استراحت باکتری جداسازی شد و راندمان حذف سلنیت از محیط‌های واکنش ۹۰/۲درصد تخمین زده شد.

بحث و نتیجه‌گیری: با توجه به توانمندی باکتری *لاکتوکوکوس رافینولاکتیس* در حذف و احیای سلنیت، غربالگری باکتری‌های مولد اسید لاکتیک به‌عنوان زیست کاتالیزگر طبیعی ایمن در جهت زیست‌پالایی سلنیت و همچنین دارای اهمیت اقتصادی در جهت سنتز سلنیوم عنصری پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: رشد سلولی، زیست‌پالایی، سلنیت، غربالگری، *لاکتوکوکوس رافینولاکتیس*.

* نویسنده مسئول مکاتبات

Copyright ©2016, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

دفع بی‌رویهٔ فلزات و اکسی‌آنیون‌های سمی در خاک و آب، به‌دلیل انقلاب صنعتی، وضعیتی نگران‌کننده برای زندگی بشر، گیاهان و جانوران ایجاد کرده است؛ به همین دلیل لازم است برای حفاظت از منابع آبی و خاک و تجدید آن‌ها اقدامات خاصی صورت بگیرد (۱). عنصر سلنیوم از کلمهٔ یونانی *seleno* به معنای ماه گرفته شده که از نظر فراوانی در میان عناصر طبیعی پوستهٔ زمین در ردهٔ شصت و ششمین عنصر قرار دارد (۲ و ۳). سلنیوم به‌عنوان ترکیب اصلی ساختاری سلنوپروتئین‌ها، یک مادهٔ مغذی ضروری برای رشد انسان و حیوانات به‌خصوص جوجه‌های گوشتی، ماهی‌ها و پرندگان محسوب می‌شود. توصیه شده است که متوسط مصرف روزانهٔ سلنیوم ۶۰ میکروگرم برای مردان و ۵۳ میکروگرم برای زنان باشد. دوز مجاز رژیمی توصیه‌شده ۵۵ میکروگرم بر لیتر (طبق سازمان غذایی و تغذیه‌ای انجمن پزشکی آمریکا) است. مصرف سلنیوم در غلظت‌های مجاز می‌تواند به بهبود ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، تقویت سیستم ایمنی، تقویت عملکرد مغز، حفاظت در برابر بیماری‌های قلبی- عروقی و نکروز کبدی، افزایش قدرت باروری، بهبود عملکرد سیستم گوارشی، بهبود متابولیسم، مسدودکردن رگ‌زایی تومورها و سم‌زدایی آفت‌کش‌های شیمیایی کمک کند (۴ و ۵). باوجود این، مواجهه با غلظت‌های بالای ترکیبات سلنیومی می‌تواند به بروز انواع مسمومیت‌های حاد و مزمن منجر شود. براساس گزارش‌ها غلظت سلنیوم سرم در محدودهٔ بین ۱۴۰۰تا۳۰۰۰۰ میکروگرم در لیتر می‌تواند مسمومیت حاد ایجاد کند که ممکن است با خوردن اتفاقی ترکیبات غیرآلی سلنیوم مثل سلنواسید و سدیم سلنیت ایجاد شود و محدودهٔ ۵۰۰تا۱۴۰۰ میکروگرم در لیتر مسمومیت مزمن ایجاد می‌کند و کمتر از ۵۰۰ میکروگرم در لیتر مسمومیت ندارد (۶). سلنیوم در طبیعت به دو فرم آلی (سلنو پروتئین‌ها) و معدنی وجود دارد. سلنیوم معدنی به فرم‌های سلنیت (SeO_3^{-2})، سلنات (Seo_4^{-2})، سلنید (Se^{-2}) و فرم فلزی (Se^0) یافت می‌شود. در این بین، فرم محلول سلنیت با توجه به حلالیت بالا و تمایل به تجمع زیستی، سمی‌ترین فرم اکسی‌آنیون‌سلنیوم محسوب می‌شود و تقلیل یا حذف آن به فرم‌های کمتر سمی به‌ویژه سلنیوم عنصری که غیرمحلول است و در دسترس سیستم‌های زیستی قرار نمی‌گیرد، از اهمیت زیست‌محیطی بالایی برخوردار است (۷). با توجه به اینکه سلنیت می‌تواند با تنفس سلولی، آنتی‌اکسیدان‌های دفاعی در آسیب سلولی، غیرفعال‌کردن پروتئین از طریق جایگزینی گوگرد و جلوگیری از تعمیر DNA تداخل داشته باشد (۸ و ۹)؛ بنابراین، مواجههٔ درازمدت با غلظت‌های بالای سلنیت می‌تواند به بروز ناراحتی‌های پوستی، تغییرشکل ناخن‌ها، ریزش مو، نکروز سلول‌های کبدی، اختلالات تنفسی و درنهایت نکروز سلولی منجر شود(۱۰). منشأ ورود فرم‌های سمی سلنیوم (سلنیت و سلنات) به محیط زیست می‌تواند ناشی از منابع طبیعی شامل هوازدگی سنگ‌های رسوبی و آذرین سلنو فروسی و نیز فعالیت میکروارگانیسم‌های خاک در چرخه‌های ژئو-شیمیایی سلنیوم و یا درنتیجه کاربرد گستردهٔ سلنیوم و ترکیبات آن در صنایع مرتبط از جمله صنایع شیشه‌سازی، چاپ و عکاسی، نیمه هادی، تولید رنگدانه، ذوب فلزات و تولید آفت‌کش‌های کشاورزی باشد که در این میان، سهم صنایع بر سلامت و تندرستی انسان و حیوان بیشتر است؛ با توجه به تولید پسماندها و زباله‌های حاوی غلظت‌های بسیار بالای سلنیت سمی و

www.SID.ir

Archive of SID

خطـر آلـودگی منـابع آبـی و خـاک (۱۱ و ۱۲). گـزارش‌هـای بسـیاری از میـزان وجـود سـلنیوم در پساب‌های مرتبط با فعالیت‌های صنعتی و کشاورزی وجود دارد که از آن جمله می‌توان به پساب حاصل از کشاورزی به‌میزان ۱۴۰تا۱۴۰۰ میکروگرم بر لیتر، پساب و ضـایعات حاصـل از معـادن اورانیـوم معـادل ۱۶۰۰ میکروگرم بر لیتر، پساب حاصل از معدن‌کاری معادن طلا به میزان ۰/۲ تا ۳۳ میلی‌گرم بر لیتر و پساب حاصل از صنایع پتروشیمی به‌میزان ۷/۵ تـا ۵۵/۹ میکروگـرم بـر لیتر اشاره کرد (۱۳). با وجود تکنیک‌های متفاوت از جملـه رسـوب شـیمیایی، اکسیداسـیون و یـا احیـاء، فیلترینـگ، تبـادل یـونی، اسـمز معکـوس، تکنولـوژی غشـایی، تبخیـر و تیمـار الکتروشـیمیایی بـرای حـذف فرم‌های سمی سلنیوم، بسیاری از این تکنیک ها از نظر مصـرف مـواد شـیمیایی سـمی، حجـم بـالای پسـماند، مصرف انرژی بالا، آلودگی زیست‌محیطی و ناکارآمدی در کـاهش یـا حـذف سـلنیت در غلظـت‌هـای پـایین غیراقتصادی هستند. در محیط‌های طبیعی، سلول‌های زنـده ماننـد بـاکتری‌هـا، قـارچ‌هـا، مخمرهـا و گیاهـان شناخته‌شده هستند که قادر به حذف و احیای سلنیت بـه فرم کمتر سمی سلنیوم هستند. در ایـن میـان، بـاکتری‌هـا بـه‌دلیـل زمـان تقسـیم کوتـاه، سـهولت کشـت، سـهولت پردازش فرایندهای پایین‌دستی و دستکاری برتری دارنـد (۱۴). در سـال‌هـای اخیـر حـذف باکتریـایی سـلنیت بـه اشکال با حلالیت و سمیت کمتر عمدتاً بـه فـرم عنصـری سـلنیوم، در سـویه‌هـای بـاکتری متعلـق بـه جـنس‌هـای *Bacillus*، *Pseudomonas*، *Rhizobium*، *Clostridium*، *Methylococcus*، *Stenotrophomonas*، *Halomonas*، *Tetrathiobacter*، *Comamonas*، *Aeromonas*، *Thauera* و *Agrobacterium* گـزارش شـده اسـت کـه پیشـنهاد مـی‌کنـد ایـن قابلیـت بـه‌عنـوان یـک اسـتراتژی اصلاحی جهت کاهش یا حذف اکسی‌آنیون‌هـای سـمی سلنیوم از آب‌های سطحی و پساب‌هـای صـنعتی بـه کـار گرفته شود (۱۵ و ۱۶). باکتری‌هـای مولـد اسـیدلاکتیک با توجه به پوشش‌دادن استانداردهای GRAS[1] بـه‌عنـوان اسـتارتر در صـنعت مـواد غـذایی و نوشـیدنی شـناخته مـی‌شـوند (۱۷). ایـن ارگانیسـم دارای نقـش اساسـی در غذاهای تخمیری از جمله خواص ضدمیکروبی، فعالیـت ضدتومور، کاهش کلسترول سـرم، کـاهش عـدم تحمـل لاکتوز، تحریک سیستم ایمنی بـدن و تثبیـت فلـور روده هستند (۱۸). علاوه بر نقش‌های پروبیوتیکی باکتری‌هـای اسـیدلاکتیک، گـزارش‌هـایی از پتانسـیل بـاکتری‌هـای ذکرشـده در حـذف میکروبـی فلزهـای سـنگین و اکسی‌آنیون‌های سـمی سـلنیوم از آب‌هـای آشـامیدنی و مواد غذایی در سطح دنیا ارائه شده اسـت (۱۸ – ۲۰). در ایـن پـژوهش، جمـع‌آوری فـرآورده‌هـای لبنـی سـنتی به‌عنوان بسـتری مناسـب جهـت غربـالگری بـاکتری‌هـای اسـیدلاکتیک بـومی مقـاوم بـه سـلینت و بررسـی امکـان به‌کارگیری آن‌ها به‌عنوان زیست‌کاتالیزگر مؤثر و ایمـن، بـرای زیسـت‌پـالایی اکسـی‌آنیـون سـمی سـلنیت از محیط‌های آلوده در شرایط آزمایشگاه ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

۵۶ نمونه ماسـت کـه بـه‌صـورت خـانگی تهیـه شـده بودنـد، از روسـتاهای حومـهٔ شهرسـتان کامیـاران، پـاوه، اسلام آباد غرب، دیواندره، مریوان، بیجـار و سـنندج، بـا رعایت شرایط استریل جمع‌آوری شد و نمونه‌ها تا زمان کشـت در محـیط‌هـای مناسـب در دمـای ۴ درجـه سـانتی‌گـراد در یخچـال نگهـداری شـدند. در ادامـه،

www.SID.ir

Archive of SID

به‌منظور غنی‌سازی باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک با پتانسیل تحمل‌پذیری همراه با احیای اکسی‌آنیون سمی سلنیت به سلنیوم، ۱۰ گرم از هر نمونه لبنی در ۹۰ میلی‌لیتر محلول ایزوتونیک رینگر (نمک کلریدسدیم با غلظت ۲/۲۵ گرم در لیتر، نمک کلرید پتاسیم با غلظت ۰/۱۰۵ گرم در لیتر، نمک کلریدکلسیم با غلظت ۰/۱۲ گرم در لیتر و نمک بیکربنات‌سدیم با غلظت ۰/۰۵ گرم در لیتر) تهیه شد. پس از تهیهٔ سری رقت (10^{-2} تا 10^{-5})، یک میلی‌لیتر از رقت‌های تهیه‌شده به محیط کشت M17 آگار حاوی ۱۰ میلی‌مولار محلول سلنیت‌سدیم کشت داده شد (محلول‌های استوک در آب مقطر تهیه و توسط فیلترهای سرسرنگی ۰/۴۵ میکرونی استریل شد). پلیت‌ها در انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۸ ساعت گرمخانه شدند. پس از تهیهٔ تک‌کلنی‌های خالص، جدایه‌های باکتری در محلول ۱۵درصد گلیسرول و ۰/۶درصد پپتون در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد جهت استفاده‌های بعدی نگهداری شد.

تعیین حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی از رشد[۲] و حداقل غلظت کشندگی[۳] جدایه‌های باکتری نسبت به سلنیت: مقادیر MIC و MBC برای جدایه‌های مقاوم به سلنیت با استفاده از روش استاندارد رقت در آگار[۴] انجام شد (۲۱). برای این منظور، از جدایه‌های باکتری کشت‌داده‌شده به‌مدت ۲۴ ساعت در محیط کشت M17 براث، سوسپانسیونی با کدورت معادل استاندارد نیم مک فارلند (CFU/ml $10^{8}\times$ ۱/۵) تهیه شد و سپس ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون موردِنظر روی محیط‌های کشت M17 آگار حاوی غلظت‌های مختلف یون سلنیت (۱۰ تا ۱۵۰ میلی‌مولار) تلقیح شد. پلیت‌های آگاردار پس از گرمخانه‌گذاری در ۳۰ درجه سانتی‌گراد در ساعت‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت بررسی شد.

ارزیابی اثر مهارکنندگی سلنیت بر جدایه‌های باکتری با روش انتشار در چاهک[۵]: در این روش از سوسپانسیون باکتری تهیه‌شده (CFU/ml $10^{8}\times$ ۱/۵) بر روی محیط کشت M17 آگار به‌وسیلهٔ سواپ استریل کشت چمنی داده شد. پس از تعبیهٔ چاهک‌های استریل (به قطر پنج میلی‌متر) به کمک پی پت پاستور، ۲۵ میکرولیتر از غلظت ۵۰ میلی‌مولار سلنیت استریل، پس از استریل‌کردن به‌وسیلهٔ فیلترهای سرسرنگی ۰/۲۲ میکرونی، در چاهک‌ها ریخته شد. محیط‌های کشت به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. سپس قطر هالهٔ عدم رشد ایجادشده توسط یون سمی سلنیت علیه جدایه‌های باکتری، توسط خطکش اندازه‌گیری شد. به‌منظور کاهش خطا، هر آزمون سه بار تکرار شد.

ترسیم منحنی رشد جدایه‌های باکتری مقاوم به سلنیت: به‌منظور تعیین منحنی رشد باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک در مجاورت با یون سمی سلنیت، از روش کدورت‌سنجی در طول موج ۶۰۰ نانومتر استفاده شد. برای این منظور، به ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتر حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت M17 براث یون سلنیت در غلظت نهایی ۲۵ میلی‌مولار اضافه شد. سپس غلظتی معادل استاندارد نیم مک فارلند از رشد باکتری‌ها تهیه شد و یک درصد از سوسپانسیون تهیه‌شده به محیط‌های مربوطه جهت بررسی سنتتیک رشد اضافه شد. محیط‌های تلقیح‌شده در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد با دور شیکر ۱۸۰ rpm در شرایط تاریکی گرمخانه‌گذاری شد. میزان دانسیته سلولی در غلظت ذکرشده به‌مدت ۴۸ ساعت با فواصل زمانی ۴ ساعت و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. هر آزمایش سه بار تکرار شد

www.SID.ir

Archive of SID

و پراکندگی مربوط به داده‌ها با روش‌های آماری بررسی شد. در ادامه به‌منظور تعیین زمان دوبرابرشدن جمعیت سلول باکتری[۶] در منطقهٔ خطی منحنی رشد (فاز لگاریتمی رشد)، شیب منحنی محاسبه شد. سپس از روی شیب معادله خط و با استفاده از فرمول زیر، زمان دوبرابرشدن سلول باکتری در حضور یون سمی سلنیت محاسبه شد (۲۲).

$$doubling\ time = \frac{\mathrm{Ln}\ 2 = 0.694}{\mu\mathrm{max} = \mathrm{slope}}$$

تعیین هویت جدایهٔ باکتری کارآمد seD2b: شناسایی مورفولوژیک و بیوشیمیایی جدایهٔ خالص seD2b براساس صفات شکلی، رنگ‌آمیزی گرم، تست کاتالاز، تولید CO_2 از سیترات، تولید NH_3 از آرژنین، رشد در دماهای مختلف، رشد در درصدهای مختلف نمک سدیم‌کلراید و همچنین تخمیر قندهای مختلف از جمله گلوکز، سوکروز، مالتوز، آرابینوز، ریبوز و تری هالوز انجام گرفت (۲۳ و ۲۴). شناسایی ملکولی جدایهٔ seD2b براساس توالی نوکلئوتیدی ژن *16SrDNA* انجام گرفت. برای استخراج DNA ژنومی از کیت استخراج DNA مخصوص باکتری‌های گرم‌مثبت، طبق دستورالعمل شرکت سازنده (سیناژن) استفاده شد. کمیت و کیفیت DNA ی استخراجی از طریق روش‌های اسپکتروفتومتر (r=260/280) و همچنین الکتروفورز از طریق بارگذاری دو میکرولیتر از DNA استخراجی در ژل آگارز یک درصد بررسی شد. جهت تکثیر قطعه ۱۵۰۰ جفت‌بازی ناحیه *16SrDNA* از پرایمر بالادست fd1 (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) و پایین‌دست rp2 (ACGGCTACCTTGTTACGACTT) استفاده شد (۲۵). مخلوط واکنش PCR (۲۵ میکرولیتر) شامل ۱۲/۵میکرولیتر Master mix (حاوی بافر PCR، $MgCl_2$، dNTPs و آنزیم Taq-polymerase)، یک میکرولیتر پرایمرهای بالادست و پایین‌دست (غلظت تقریبی ۱۰ میکرومولار)، یک میکرولیتر DNA الگو (غلظت تقریبی ۱۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر) و ۹/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل و دیونیزه استفاده شد.

برنامهٔ تکثیری با واسرشت اولیه[۷] در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه، سپس ۳۰ چرخه به‌صورت واسرشت‌شدن در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمر به DNA ژنومی[۸] در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه و بسط DNA[۹] در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲ دقیقه انجام شد. بسط نهایی[۱۰] در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز یک درصد، در شرایط بافری TAE و با ولتاژ ۷۰ به‌مدت یک ساعت انجام شد. پس از اطمینان از صحت انجام PCR، محصول تخلیص‌شده برای توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کره جنوبی (توسط شرکت تکاپو زیست) ارسال شد. توالی‌های به‌دست‌آمده در پایگاه ژنی NCBI مقایسه شد. سپس با استفاده از برنامهٔ Clustal W هم‌ردیفی چندتایی انجام شد. درنهایت درخت فیلوژنتیکی به کمک نرم‌افزار MEGA.6 رسم شد (۲۶).

سنجش میزان حذف سلنیت تحت شرایط سلول‌های در حال استراحت جدایهٔ باکتری seD2b: برای سنجش حذف سلنیت از روش رنگ‌سنجی و معرف ۳ و ۳- دی آمینو بنزیدین استفاده شد. یون سلنیت موجود در سوپرناتانت (مایع رویی) کشت باکتری با معرف ۳ و۳- دی آمینو بنزیدین ۰/۵درصد (وزنی/حجمی) در محلول اسیدی (HCl پنج مولار) واکنش داده و زرد رنگ می‌شود که پس از استخراج در حلال تولوئن جذب

www.SID.ir

Archive of SID

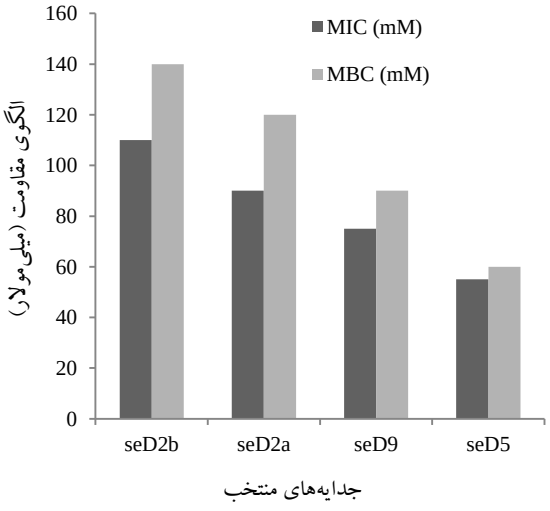
محلول در طول موج ۴۲۰ نانومتر قابل اندازه‌گیری است (۲۷). پس از رسم منحنی کالیبراسیون، درصد حذف سلنیت تحت شرایط سلول‌های در حال استراحت سویهٔ باکتری seD2b، طبق فرمول زیر به دست آمد که در آن، C0: غلظت اولیه سلنیت و C: غلظت سلنیت باقیمانده است.

$$Selenite\ removal\ (\%) = \frac{(C0 - C)}{C0} \times 100$$

برای تهیهٔ سلول‌های در حال استراحت، ابتدا سویهٔ باکتری seD2b در محیط M17 براث تا رسیدن به انتهای فاز رشد لگاریتمی رشد داده شد. سپس سلول‌های باکتری با استفاده از سانتریفیوژ برداشت و پس از شستشو تودهٔ سلولی در بافر فسفات (بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار با pH برابر ۷/۲)، از این سلول‌های برداشت‌شده به‌عنوان زیست کاتالیزگر برای مطالعات حذف زیستی سلنیت استفاده شد (۲۸). آزمایش‌ها در ارلن‌های ۲۵۰میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر بافر فسفات، ۲۰ گرم در لیتر تودهٔ سلولی (وزن تر تودهٔ سلولی) و تحت شرایط دمایی ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دور شیکر ۱۸۰ rpm انجام شد. به محیط زیست تبدیلی ذکرشده، سلنیت در غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میلی‌مولار افزوده شد. در فواصل زمانی مختلف، از طریق سانتریفیوژ با دور ۴۵۰۰ rpm به‌مدت ۱۰ دقیقه، توده باکتری جمع‌آوری شد. سپس به مایع رویی جداشده، پس از اسیدی‌شدن توسط اسیدکلریدریک، محلول ۳ و ۳- دی آمینو بنزیدین در غلظت نهایی ۰/۵درصد (وزنی/حجمی) اضافه شد. محلول حاصل را به قیف جداکنندهٔ حاوی ۱۰ میلی‌لیتر تولوئن منتقل و میزان جذب سلنیت باقیمانده در محیط در طول موج ۴۲۰ نانومتر قرائت شد. همهٔ آزمایش‌ها سه بار تکرار شد.

نتایج

جداسازی و غربالگری باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک مقاوم به سلنیت: از بین ۲۴ باکتری مقاوم جداسازی‌شده، تنها چهار جدایه بالاترین مقاومت همراه با احیای یون سلنیت به سلنیوم عنصری (بالاتر از ۵۰ میلی‌مولار)، که با ایجاد رنگ قرمز در محیط کشت حاوی سلنیت سدیم قابلِ‌مشاهده است، نشان دادند. در شکل ۱ الگوی مقاومت براساس MIC (پایین‌ترین غلظتی از اکسی‌آنیون که از رشد باکتری در محیط کشت حاوی سلنیت جلوگیری می‌کند) و MBC (کمترین تراکم اکسی‌آنیون که به‌طور کامل باعث مرگ باکتری شده و هیچ رشدی مشاهده نمی‌شود) نشان داده شده است.

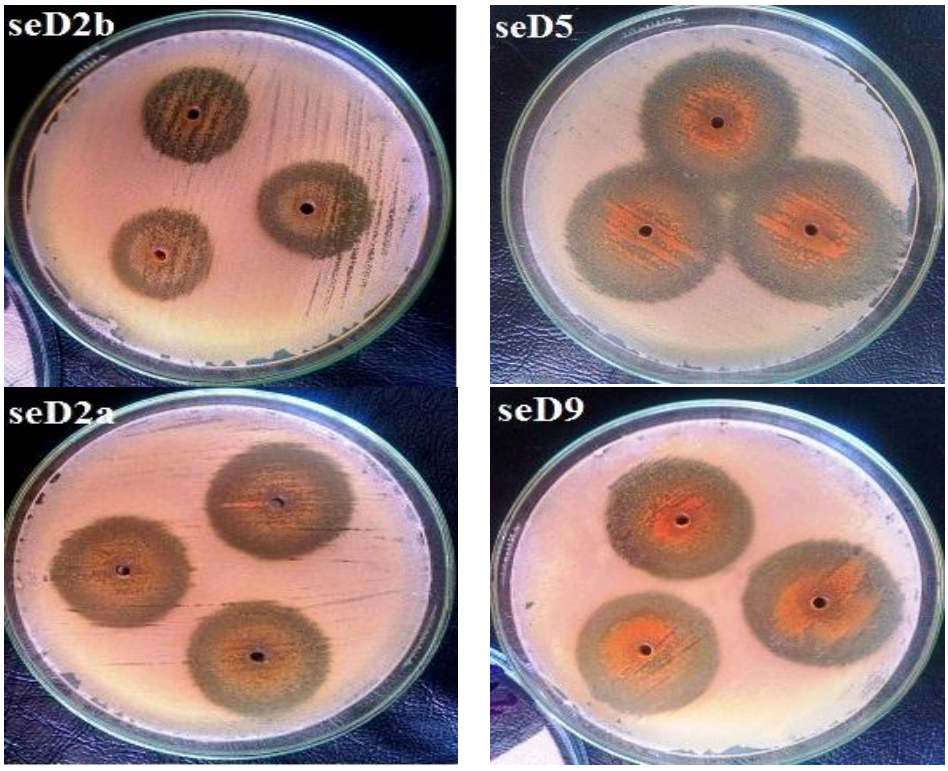


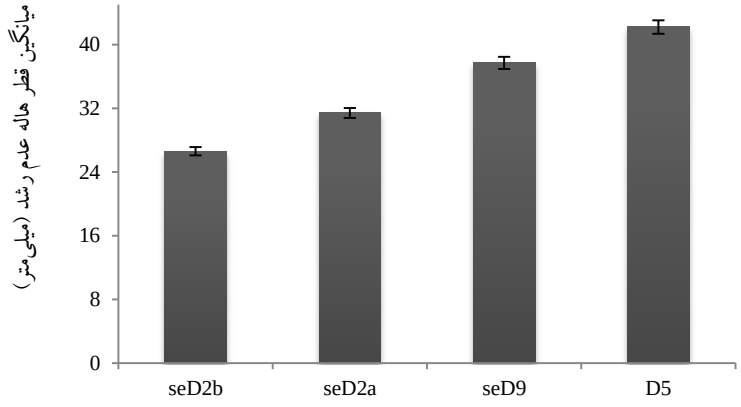
شکل ۱- نتایج MIC و MBC رقت‌های مختلف سلنیت (بر حسب میلی‌مولار) در باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک جداشده از محصولات لبنی سنتی

www.SID.ir

Archive of SID

طبق شکل ۱، جدایهٔ seD2b (جداشده از یک نمونه ماست سنتی جمع‌آوری‌شده از روستاهای توابع شهرستان کامیاران) بالاترین مقادیر MIC (۱۱۰ میلی‌مولار) و MBC (۱۴۰ میلی‌مولار) را به خود اختصاص داد. در سایر باکتری‌های جداشده مقادیر MIC در محدودهٔ ۵۵ تا ۹۰ میلی‌مولار و MBC در محدودهٔ ۶۰ تا ۱۲۰ میلی‌مولار مشاهده شد. در ادامه جهت تأیید نتایج به‌دست‌آمده از روش رقت‌سازی در آگار، روش انتشار در چاهک استفاده شد (شکل ۲).





شکل ۲- نتایج اثر مهارکنندگی یون سلنیت علیه جدایه‌های باکتری جداشده با استفاده از روش چاهک (غلظت سلنیت استفاده‌شده ۵۰ میلی‌مولار است)

www.SID.ir

Archive of SID

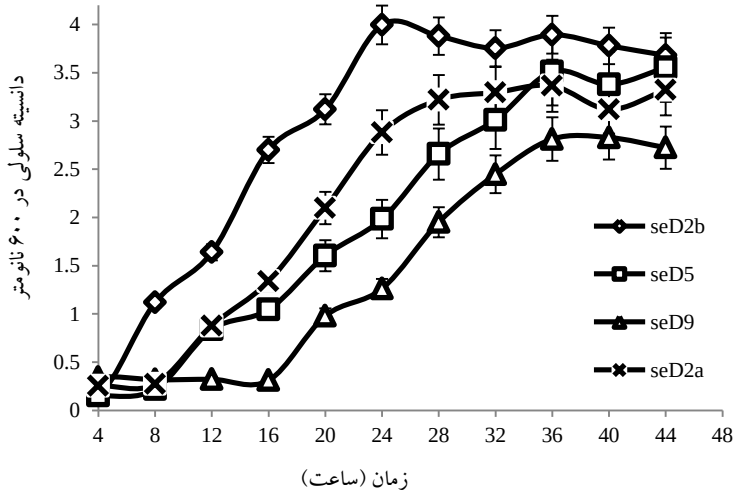
طی این روش، بیشترین اثر مهاری را اکسی‌آنیون سمی سلنیت بر علیه جدایهٔ seD5 با میانگین قطر مهاری ۴۲/۲ میلی‌متر از خود نشان داد. کمترین میزان مهارکنندگی متعلق به جدایهٔ seD2b با میانگین مهاری ۲۶/۶ میلی‌متر بود. نتایج به‌دست‌آمده در این روش هم‌خوانی مناسبی با نتایج حاصل از روش رقت در آگار دارد.

سنتتیک رشد سلولی جدایه‌های باکتری مقاوم به اکسی‌آنیون سمی سلنیت: با هدف تعیین جدایهٔ باکتری کارآمد جهت آزمایش‌های حذف زیستی سلنیت، چهار جدایهٔ seD2b، seD2a، seD9 و seD5 در حضور ۲۵ میلی‌مولار سلنیت رشد داده شدند (شکل ۳). براساس نتایج به‌دست‌آمده، جدایهٔ seD2b بالاترین دانسیته نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر با ارزش ۳/۹ را بعد از ۲۴ ساعت از شروع کشت نشان داد. جدایهٔ seD9 کمترین دانسیته نوری معادل ۲/۹ را بعد از ۳۶ ساعت از شروع گرمخانه‌گذاری داشت. سویهٔ اخیر تا ۱۶ ساعت از شروع گرمخانه‌گذاری در فاز تأخیری قرار داشت و تقریباً رشد قابلِ‌توجهی در این فاصلهٔ زمانی صورت نگرفته است.

در ادامه به‌منظور تعیین زمان تقسیم جدایه‌های مقاوم در مجاورت یون سمی سلنیت در منطقه خطی منحنی‌های رشد (فاز لگاریتمی رشد)، شیب منحنی‌ها محاسبه شد. سپس از روی شیب به‌دست‌آمده، زمان تقسیم جدایه‌های ذکرشده تخمین زده شد (جدول ۱).

جدول ۱- نتایج مربوط به معادلات رگرسیونی خطی و زمان تقسیم به‌دست‌آمده از ترسیم منحنی‌های رشد جدایه‌های مقاوم در مجاورت ۲۵ میلی‌مولار یون سلنیت

جدایهٔ باکتری	معادله خط منحنی رشد و ضریب رگرسیون	زمان تقسیم (دقیقه)
seD2b	Y=0.7508x-0.5067 R^2= 0.9907	۵۵
seD2a	Y=0.6146x-0.3702 R^2=0.9909	۶۷
seD5	Y=0.4659x-0.2374 R^2=0.9938	۸۹
seD9	Y=0.5028x-0.1324 R^2=0.9905	۸۲



شکل ۳- منحنی رشد جدایه‌های مقاوم در محیط‌های M17 براث حاوی ۲۵ میلی‌مولار یون سلنیت و تحت شرایط دمایی ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دور شیکر rpm ۱۸۰. آزمایش‌ها سه بار تکرار شد.

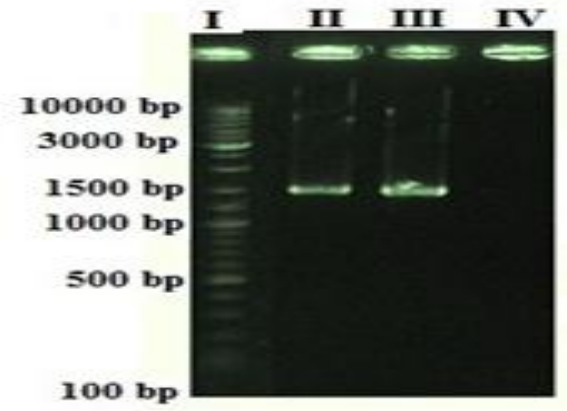
www.SID.ir

Archive of SID

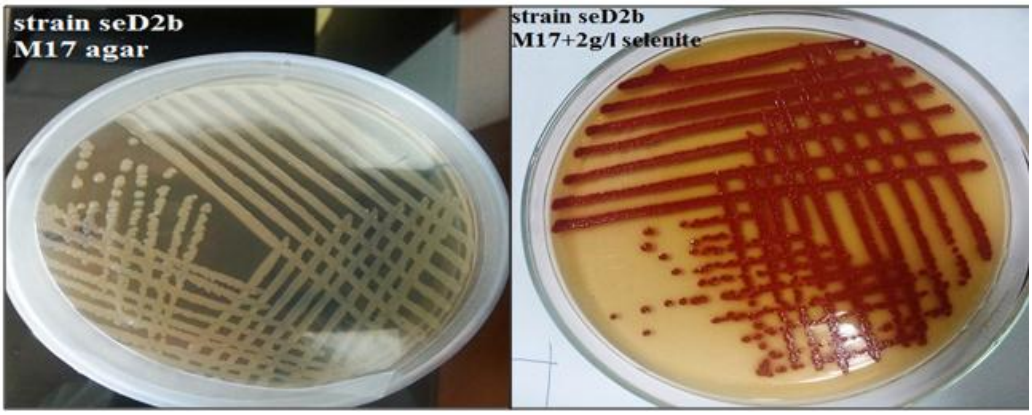
براساس نتایج به‌دست‌آمده کمترین زمان دوبرابرشدن معادل ۵۵ دقیقه مربوط به جدایهٔ seD2b و بیشترین زمان معادل ۸۲ دقیقه مربوط به seD9 گزارش شد. درنهایت جدایهٔ باکتری seD2b به‌عنوان سویهٔ کارآمد جهت آزمایش‌های سلنیت‌زدایی شناسایی شد.

نتایج آزمون‌های تشخیصی بیوشیمیایی و ملکولی: شناسایی اولیهٔ جدایهٔ مقاوم seD2b، با قابلیت احیای یون سلنیت به سلنیوم عنصری که با ایجاد کلنی قرمزرنگ در محیط کشت قابلِ‌شناسایی است (شکل ۴)، براساس آزمون‌های فیزیولوژیک و تست‌های بیوشیمیایی انجام گرفت.

جدایهٔ ذکرشده از نظر شکل ظاهری و واکنش گرم، کوکسی گرم‌مثبت بود. از نظر تست‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی کلیدی از جمله تست کاتالاز، هیدرولیز آرژنین، تولید دی‌اکسیدکربن از سیترات و همچنین رشد در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و نمک سدیم‌کلراید با غلظت ۶/۵درصد (وزنی/حجمی) منفی بود. نتایج تست‌های تخمیر کربوهیدرات سویهٔ seD2b بیانگر توانایی سویهٔ ذکرشده در مصرف گلوکز، مالتوز، آرابینوز، سوکروز، ریبوز، تری هالوز و گلیسرول بود. براساس نتایج به‌دست‌آمده از آزمون‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی و طبق کتاب‌های مرجع، سویهٔ باکتری seD2b به‌طور موقت تحت نام *لاکتوکوکوس رافینولاکتیس* تعیین هویت شد. در ادامه جهت شناسایی دقیق سویهٔ باکتری seD2b تکثیر کامل توالی نوکلئوتیدی ژن *16SrDNA* صورت گرفت. نتایج الکتروفورز محصول PCR حاصل از تکثیر با استفاده از پرایمرهای اختصاصی fd1 و rp2 در شکل ۵ نشان داده شده است.



شکل ۵- تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR سویهٔ باکتری seD2b. (I): DNA نشانگر، (II) و (III): سویهٔ باکتری seD2b و (IV): کنترل منفی.



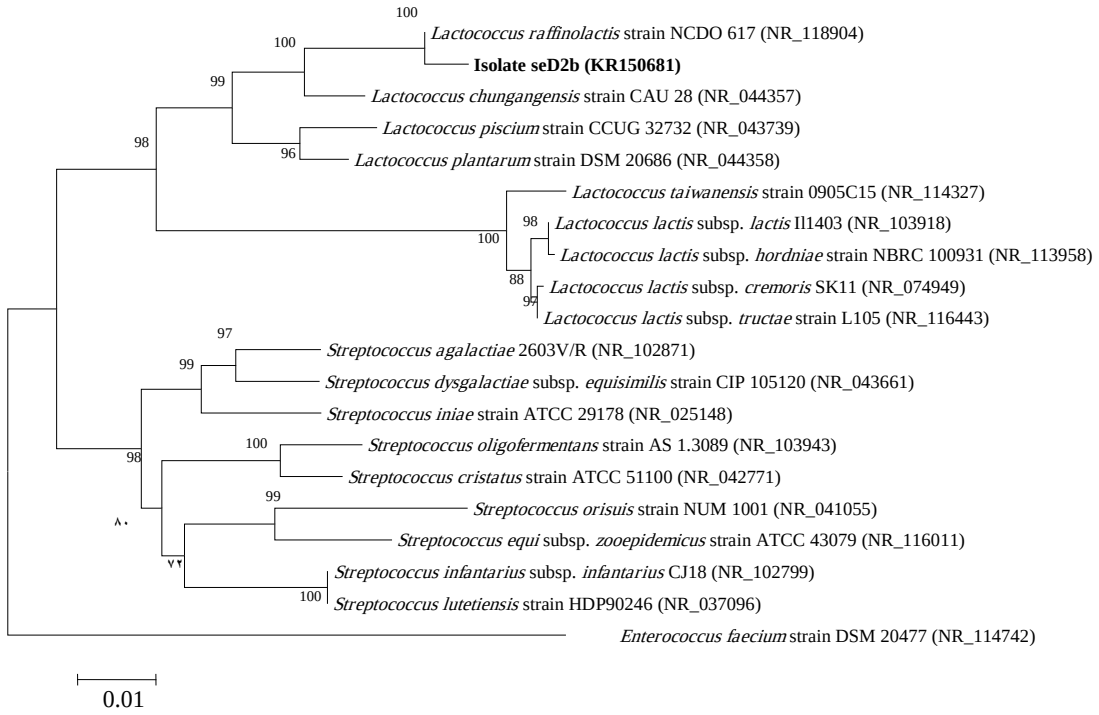
شکل ۴- بررسی رنگ کلنی جدایهٔ seD2b در محیط کشت M17 آگاربدون اکسی‌آنیون سلنیت و محیط کشت M17 آگار حاوی سلنیت.

www.SID.ir

Archive of SID

پس از مشخص‌شدن توالی ژن *16SrDNA* سویهٔ باکتری ذکرشده، ارتباط فیلوژنتیکی سویهٔ seD2b با سویه‌های باکتری موجود در پایگاه اطلاعات ژنی NCBI بررسی شد. براساس اطلاعات به‌دست‌آمده نزدیک‌ترین گونهٔ باکتری به سویهٔ ذکرشده با شباهت ۹۹درصدی *لاکتوکوکوس رافینولاکتیس* بود. بنابراین، توالی ژن *16SrDNA* باکتری *لاکتوکوکوس رافینولاکتیس* seD2b در بانک اطلاعات ژنی NCBI با شماره KR150681 ثبت شد. در ادامه نتایج ترسیم درخت فیلوژنتیکی تأیید کرد که سویهٔ seD2b را می‌توان از نظر تاکسونومی به‌عنوان سویه‌ای از *لاکتوکوکوس رافینولاکتیس* طبقه‌بندی کرد (شکل ۶).

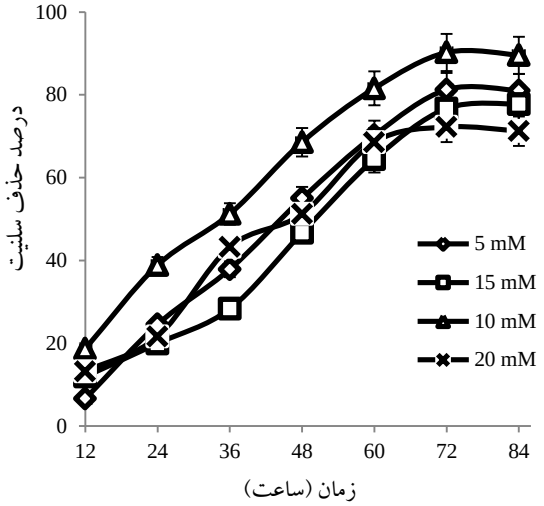
بررسی پتانسیل حذف میکروبی سلنیت توسط سلول‌های در حال استراحت *Lactococcus raffinolactis* seD2b: برای سنجش کمی روند حذف میکروبی سلنیت، سلول‌های در حال استراحت سویهٔ باکتری *لاکتوکوکوس رافینولاکتیس* seD2b به‌عنوان زیست کاتالیزگر در محیط بافری فسفات حاوی غلظت‌های مختلف سلنیت به کار گرفته شد (شکل ۷).



شکل ۶- درخت فیلوژنیک براساس توالی نوکلئوتیدی ژن *16SrRNA* سویهٔ باکتری seD2b و توالی‌های به‌دست آمده از بانک ژنی (درخت ذکرشده براساس الگوریتم neighbor-joining و به کمک نرم‌افزار MEGA. 6 با شرایط cut off=50 و Bootstrap=1000 ترسیم شد. برای ریشه‌دارکردن درخت از *Enterococcus faecium* به‌عنوان Outgroup استفاده شد. اعداد داخل پرانتز نشان‌دهندهٔ شماره دسترسی سویه‌های باکتری ثبت‌شده در پایگاه بانک اطلاعات ژنی است).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۷- نمودار حذف میکروبی سلنیت توسط باکتری *لاکتوکوکوس رافینولاکتیس* سویهٔ seD2b تحت شرایط سلول های در حال استراحت. نتایج ارائه‌شده میانگین سه بار آزمایش است.

همان‌گونه که در شکل ۷ مشاهده می‌شود افزایش غلظت یون سلنیت از ۵ میلی‌مولار به ۱۰ میلی‌مولار موجب افزایش راندمان حذف زیستی سلنیت شد. افزایش غلظت از ۱۰ میلی‌مولار به بالا کاهش درصد حذف سلنیت را به دنبال داشت. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که میزان حذف به غلظت اولیهٔ یون سلنیت در محیط زیست تبدیلی ارتباط دارد. پس از ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری، سلول‌های در حالت استراحت سویهٔ باکتری ذکرشده توانست به‌میزان ۹۰/۲درصد از سلنیت موجود در محیط زیست تبدیلی را حذف کند و غلظت آن را از ۱۰ میلی‌مولار به کمتر از یک میلی‌مولار برساند.

بحث و نتیجه‌گیری

زیست‌پالایی میکروبی یا به عبارت دیگر استفاده از قابلیت‌های فیزیولوژیک و ژنتیکی میکروارگانیسم‌ها در کنترل و جذب آلاینده‌های زیست‌محیطی یک فناوری سبز نوآورانه و امیدبخش در دسترس، جهت پالایش میکروبی فلزات سنگین از آب و زمین‌های آلوده است. میکروارگانیسم‌ها نقش قابلِ‌توجهی در زیست‌پالایی محیط‌های آلوده به اکسی‌آنیون‌های معدنی سلنیوم دارند. بسیاری از میکروارگانیسم‌ها از جمله باکتری‌ها، قارچ‌های رشته‌ای و مخمرهای تک‌سلولی دارای مکانیسم‌های مختلف مقاومت شامل احیا، آلکیله‌کردن، کمپلکس‌کردن، فراریت، تجمع و ته‌نشینی در برابر اکسی‌آنیون سمی سلنیت هستند (۲۹). در این بین، باکتری‌هایی که توانایی تبدیل و اصلاح زیستی ترکیبات سلنیومی را دارند، نقش ویژه‌ای در چرخهٔ ژئو- شیمیایی این شبه فلز دارند و بیشترین میزان کاهش یا حذف این آلاینده در خاک توسط باکتری‌ها انجام شده است (۳۰). با توجه به اینکه گام نخست در پالایش زیستی محیط‌های آلوده به فلزات و اکسی‌آنیون‌های سمی معدنی، انتخاب میکروارگانیسم‌های مقاوم است، بنابراین در بخش اول این مطالعه، پس از جمع‌آوری نمونه‌های ماست سنتی از مناطق غرب کشور و انجام تکنیک غنی‌سازی، در مجموع ۲۴ جدایهٔ باکتری مولد اسیدلاکتیک مقاوم به سلنیت غربالگری شد. سپس با استفاده از ترکیبی از روش‌های غربالگری از جمله روش‌های رقت در آگار، روش انتشار در چاهک و بررسی منحنی‌های رشد جدایه‌های مقاوم در حضور سلنیت، جدایهٔ باکتری seD2b با پتانسیل مقاومت همراه با احیای اکسی‌آنیون سلنیت (بالاتر از ۱۱۰ میلی‌مولار) به‌عنوان سویهٔ کارآمد جهت انجام آزمایش‌های سلنیت‌زدایی انتخاب و شناسایی فنوتیپی و ملکولی شد. براساس نتایج آزمون‌های شناسایی، سویهٔ باکتری seD2b دارای بالاترین شباهت (بیش از ۹۹درصدی) با *لاکتوکوکوس رافینولاکتیس* بود. توالی باکتری

www.SID.ir

Archive of SID

ذکرشده با شماره دسترسی KR150681 در بانک جهانی اطلاعات ژنی NCBI قابلِ‌دسترسی است. در ارتباط با الگوی تحمل‌پذیری ذاتی نسبت به اکسی‌آنیون سمی سلنیت، در بسیاری از سلول‌های باکتریایی غربالگری‌شده، میزان مقاومت بین ۲ تا ۵۰ میلی‌مولار گزارش شده است. برای مثال رشد گونه‌های باکتری *Bacillus subtilis*، *Ralstonia metallidurans*، *Rhodospirillum rubrum* و *Rhodobacter spheroids* توسط ۲ تا ۶ میلی‌مولار سلنیت مهار شد. همچنین رشد *Rhizobium* sp. از ۸تا۱۸ میلی‌مولار سلنیت مهار گردید. سطوح مقاومت بالاتری دربارهٔ *Aeromonas salmonicida*، *Azospira oryzae* و *Stenotrophomonas maltophilia* به‌میزان ۱۶تا۵۰ میلی‌مولار سلنیت گزارش شده است. با این حال، مقاومت‌های بسیار بالاتری نیز در سوش‌های متعلق به جنس *Pseudomonas* (۱۵۰ میلی‌مولار) و گونه باکتری *Comamonas testosteroni S44* (۱۰۰ میلی‌مولار) گزارش شده است (۱۵). در جدیدترین مطالعهٔ صورت‌گرفته در ارتباط با حذف و احیای سلنیت سدیم، خلیلیان[11] و همکاران در سال ۲۰۱۵ یک سویهٔ باکتری تحت نام *Bacillus* sp. QW90 را با قابلیت تحمل‌پذیری بالا (۵۵۰ میلی‌مولار) از پساب‌های آلوده به سلنیت را جداسازی کردند (۱۶). با مقایسهٔ یافته‌های به‌دست‌آمده در این پژوهش با گزارش‌های مشابه صورت‌گرفته در سویه‌های باکتری می‌توان نتیجه گرفت که جدایهٔ seD2b از توانمندی تحمل‌پذیری و مقاومت نسبتاً مناسبی برخوردار است. در بخش دوم این کار پژوهشی، پتانسیل حذف میکروبی سلنیت توسط سلول‌های در حال استراحت جدایهٔ بومی *لاکتوکوکوس رافینولاکتیس* به‌عنوان زیست‌کاتالیزگر در مقیاس آزمایشگاهی ارزیابی شد. براساس نتایج، پس از ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری، سلول‌های در حالت استراحت سویهٔ باکتری ذکرشده توانست به‌میزان ۹۰/۲درصد از سلنیت موجود در محیط زیست تبدیلی را حذف کند و غلظت آن را از ۱۰ میلی‌مولار به کمتر از یک میلی‌مولار برساند. در مطالعه‌ای که Di و همکاران در ارتباط با سویهٔ *Stenotrophomonas* sp. SeITE02 انجام دادند مشخص شد که این سویه دارای مقاومت تا ۵۰ میلی‌مولار به سلنیت است. این سویه غلظت ۰/۵ میلی‌مولار سلنیت را به‌طور کامل در کشت مایع در طی مدت ۵۲ ساعت حذف و احیا می‌کند (۳۱). در مطالعه‌ای که کورادو[12] و همکاران در سال ۲۰۱۱ بر سویهٔ *Pseudomonas stutzeri* NT-I انجام دادند مشخص شد که این سویه توانایی حذف و احیای سلنیت را دارد و می‌تواند در مدت‌زمان ۱۸ ساعت ۹۵درصد از سلنیت را از محیط حذف کند (۳۲). همچنین در گزارشی که Ikram ارائه کرد چندین گونه از جنس باسیلوس مقاوم به سلنیت (حداکثر مقاومت ۲۰ گرم در لیتر) جداسازی شد و توانایی حذف و احیای سلنیت در سویه‌های جداشده سنجش شد و در این بین بالاترین میزان حذف و احیا توسط سویهٔ *Bacillus pumilus* به‌میزان ۹۷درصد با غلظت اولیهٔ ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر سلنیت سدیم در مدت ۱۴۴ ساعت گزارش شد (۱۰). در مطالعه‌ای مشابه که pieniz بر جنس متفاوتی از باکتری اسیدلاکتیک انجام داد، میزان توانایی حذف سلنیت توسط سویهٔ (LAB 18) *Enterococcus faecium* به‌میزان ۸ میلی‌گرم در لیتر (۸۰درصد) در مدت ۲۴ ساعت گزارش شد. در این بررسی حذف بهینهٔ سلنیت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و pH برابر ۷ ثبت شد. براین‌اساس، در غلظت‌های اولیه ۱۰ و ۶۰ میلی‌گرم

www.SID.ir

Archive of SID

در لیتر سلنیت، به‌ترتیب ۹/۱۹ میلی‌گرم در لیتر و ۵۹/۷ میلی‌گرم در لیتر یون سمی سلنیت توسط گونهٔ باکتری *Enterococcus faecium* در مدت زمان ۲۴ ساعت حذف شد. همچنین در این مطالعه مشاهده شد که با افزایش غلظت سلنیت از ۱۰ تا ۶۰ میکروگرم در لیتر میزان حذف افزایش پیدا می‌کند (۱۸). در مطالعه‌ای که Wang و همکاران انجام دادند میزان حذف و احیای ۰/۲ میلی‌مولار سلنیت گزارش شد و سویهٔ *Escherichia coli* توانست میزان ۹۹/۱درصد سلنیت را در مدت‌زمان ۸ ساعت حذف کند (۳۳).

پیشنهادها: در این پژوهش برای نخستین بار حذف زیستی سلنیت در گونهٔ *لاکتوکوکوس رافینولاکتیس* گزارش شد. باکتری بومی ذکرشده دارای توانمندی احیای سلنیت به سلنیوم است؛ بنابراین پس از تعیین دقیق کمی میزان سلنیوم و تعیین دقیق جایگاه سلنیوم در سلول میکروبی به‌کمک روش‌های اتمیک و میکروسکوپی، غنی‌سازی غذاهای تخمیری با سلنیوم ایجادشده توسط باکتری ذکرشده، به‌عنوان یک مکمل غذایی ارزشمند و ایمن در تغذیهٔ حیوانات و یا انسان بسیار امیدوارکننده است.

References

(1) Ahluwalia SS, Goyal D. Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. *Bioresource Technology* 2007; 98 (12): 2243-57.

(2) Rosenfeld I, Beath OA. *Selenium*. Academic Press; New York: 1964: 279-332.

(3) Earnshaw A, Greenwood N. *Chemistry of the elements*. 2rd ed. Burlington Massachusetts: Butterworth-Heinemann; 1997.

(4) Yadav SK, Singh I, Singh D, Han S-D. Selenium status in soils of northern districts of India. *Journal* of *Environmental Management* 2005; 75(2): 129–32.

(5) Rayman MP. The importance of selenium to human health. *Lancet* 2000; 356(9225): 233–41.

(6) Han B, Ren Y, Guan L, Wei W, Hua F, Yang Y, et al. Sodium selenite induces apoptosis in acute promyelocytic leukemia-derived NB4 cells through mitochondria-dependent pathway. *Oncology Research* 2009; 17(8): 373–81.

(7) Whanger, P. D. Selenium and its relationship to cancer: an update. *British Journal* of *Nutrition* 2004; 91(01): 11-28.

(8) Dong Y, Zhang H, Hawthorn L, Ganther HE, Ip C. Delineation of the molecular basis for selenium-induced growth arrest in human prostate cancer cells by oligonucleotide array. *Cancer Research* 2003; 63(1): 52–9.

(9) Eustice DC, Kull FJ, Shrift A. Selenium toxicity. aminoacylation and peptide bond formation with selenomethionine. Plant Physiol. *American Society of Plant Biologists* 1981; 67(5): 1054–8.

(10) Ikram M, Faisal M. Comparative assessment of selenite (SeIV) detoxification to elemental selenium (Se0) by Bacillus sp. *Biotechnology Letters* 2010; 32(9): 1255–9.

(11) Siddique T, Zhang Y, Okeke BC, Frankenberger WT. Characterization of sediment bacteria involved in selenium reduction. *Bioresource Technology* 2006; 97(8): 1041–9.

(12) Kashiwa M, Nishimoto S, Takahashi K, Ike M, Fujita M. Factors affecting soluble selenium removal by a selenate-reducing bacterium *Bacillus* sp. SF-1. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2000; 89(6): 528–33.

www.SID.ir

Archive of SID

(13) Santos S, Ungureanu G, Boaventura R, Botelho C. Selenium contaminated waters: An overview of analytical methods, treatment options and recent advances in sorption methods. *Science of the Total Environment* 2015; 521: 246-60.

(14) Li B, Liu N, Li Y, Jing W, Fan J, Li D,et al. Reduction of selenite to red elemental selenium by *Rhodopseudomonas palustris* strain N. *PLoS One* 2014; 9(4).

(15) 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 Microbiology* 2014; 14(1): 204.

(16) 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. *Report of Health Care* 2015; 1(1): 6-10.

(17) Kaur S, Das M. Functional foods: an overview. *Food Science and Biotechnology* 2011; 20(4): 861–75.

(18) Pieniz S, Okeke BC, Andreazza R, Brandelli A. Evaluation of selenite bioremoval from liquid culture by Enterococcus species. *Microbiology Research* 2011; 166(3); 176–85.

(19) Pophaly SD, Singh P, Kumar H, Tomar SK, Singh R. Selenium enrichment of lactic acid bacteria and bifidobacteria: a functional food perspective. *Trends in Food Science and Technology* 2014; 39(2): 135–45.

(20) Halttunen T, Removal of cadmium, lead and arsenic from water by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 2007; 114: 30.

(21) Tilton RC, Howard BJ. Antimicrobial susceptibility testing. Clin Pathog Microbiol CV, st Louis, Washington, Toronto, Mosby Co. 1987; 121–6.

(22) Madigan MT, Martinko JM, Parker J. *Brock biology of microorganisms*. 9rd ed. New Jersey: Upper Saddle River: Prentice-Hall; 2000.

(23) Axelsson L. Lactic acid Bacteria: Classification and Physiology. In: Salminen S., von Wright A., Marcel Dekker INC., editor. *Lactic acid Bacteria, Microbiology and Functional Aspects*. 2th ed. New York; 1998: 1-73.

(24) Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K, Stackebrandt E, Editors. *The Prokaryotes*. 3rd ed. NewYork: Springer; 2006.

(25) Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 1991; 173(2): 697–703.

(26) Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 2013; 30(12): 2725–9.

(27) Hurlbut JA, Burkepile RG, Geisler CA, Kijak PJ, Rummel NG. Colorimetric determination of selenium in mineral premixes. *Journal of AOAC International* 1996; 80(4): 709–16.

(28) Ashengroph M, Nahvi I, Zarkesh-Esfahani H, Momenbeik F. Novel strain of *Bacillus licheniformis* SHL1 with potential converting ferulic acid into vanillic acid. *Annals of Microbiology* 2012; 62(2): 553–8.

(29) Cheung KH, Gu J-D. Mechanism of hexavalent chromium detoxification by microorganisms and bioremediation application potential: a review. *International* Biodeterioration and *Biodegradation* 2007; 59(1): 8–15.

(30) Rathgeber C, Yurkova N, Stackebrandt E, Beatty JT, Yurkov V. Isolation of tellurite-and selenite-resistant bacteria from hydrothermal vents of the Juan de Fuca Ridge in the Pacific Ocean. *Applied and Environmental Microbiology* 2002; 68(9): 4613–22.

(31) Di Gregorio S, Lampis S, Vallini G.

www.SID.ir

Archive of SID

Selenite precipitation by a rhizospheric strain of *Stenotrophomonas* sp. isolated from the root system of *Astragalus bisulcatus*: a biotechnological perspective. *Environment International* 2005; 31(2): 233–41.

(32) Kuroda M, Notaguchi E, Sato A, Yoshioka M, Hasegawa A, Kagami T, et al. Characterization of *Pseudomonas stutzeri* NT-I capable of removing soluble selenium from the aqueous phase under aerobic conditions. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2011; 112(3): 259–64.

(33) Wang X, Liu G, Zhou J, Wang J, Jin R, Lv H. Quinone-mediated reduction of selenite and tellurite by *Escherichia coli*. *Bioresource Technology* 2011; 102(3): 3268–71.

[1]- Generally regard as safe
[2]- Minimum Inhibitory Concentration
[3]- Minimum Bactericidal Concentration
[4]- Agar Dilution Method
[5]- Well Diffusion Method
[6]- Doubling time
[7]- Denaturation
[8]- Annealing
[9]- Extension
[10]- Final extension
[11]- Khalilian
[12]- Kuroda

www.SID.ir

Archive of SID

Bioremediation of selenite by selenite-resistant *Lactococcus raffinolactis* seD2b under laboratory scale

Morahem Ashengroph*
Assistant Professor of Microbiology, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran, m.ashengroph@uok.ac.ir.
Davoud Saedi
M.Sc. Student of Molecular Cell Biology, University of Kurdistan, Sananadaj, Iran, davoudsaedi@gmail.com

Abstract

Introduction: The accumulation of selenium oxyanions in the form of selenite (SeO_3^{-2}) in soil and water resources created increasingly worrying on human health and environment. The current project directed toward screening of selenite-resistant lactic acid bacteria for their potential use as safe biocatalysts in the selenite bio-remediation.

Materials and methods: Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) values of selenite against isolated strains were evaluated using agar dilution method. Inhibitory effects of selenite against isolated strains were calculated employing well diffusion agar method. Turbidity testing was used to investigate bacterial growth. Identification of the potent bacterium strain was carried out based on bio-chemical tests and phylogenetic analysis. A colorimetric method using 3, 3-Diaminobenzidine hydrochloride has been developed for the microbial selenite removal.

Results: Results indicated that *Lactococcus raffinolactis* strain seD2b exhibited the highest MIC (110 mM) and MBC (140 mM) values and also the lowest inhibitory effect with the average diameter of the inhibition zone (26.6 mm) in the presence of selenite. After 72 h incubation of the reaction medium containing 10mM of initial selenite concentration with resting cells of *Lactococcus raffinolactis* seD2b, the concentration of toxic selenite in the reaction medium decreased by 90.2% .

Discussion and conclusion: Given the ability of *Lactococcus raffinolactis* strain seD2b in the remove and reduce selenite, screening of lactic acid bacteria as green bio-catalysts for their application in the bio-remediation of selenite and their economic importance on synthesis of selenium has been proposed.

Key words: Selenite, Bio-remediation, Screening, *Lactococcus raffinolactis*, Cell growth

* Corresponding author
Received: July 28, 2015 / **Accepted:** December 30, 2015

www.SID.ir