مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی
دوره چهارم، شماره سیزدهم، زمستان ۱۳۹۲

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

جداسازی و شناسایی باکتری هایی با قابلیت پاکسازی زیستی املاح سلنیتی از منابع محیطی

مهسا اهرابی[۱]، فرزانه حسینی*[۱]، عباس اخوان سپهی[۱]

۱ دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، گروه میکروبیولوژی، تهران، ایران

چکیده

مقدمه: سلنیوم دارای چرخه کامل زیستی است و در تراکم ناچیز نانوگرم در میلی لیتر بر زندگی موجودات زنده اثر گذار است. اغلب موجودات زنده به ویژه میکروارگانیسم ها به شکلی در دگرگونی های بیوژئوشیمیایی این عنصر دخالت دارند. **مواد و روش ها:** در این تحقیق سویه هایی از باسیل های گرم مثبت و گرم منفی با قابلیت تجزیه بیولوژیکی و احیای سلنیت از کارخانه شیشه و بلور و لجن فعال پساب قیطریه جدا گردید. با استفاده از روش های رنگ سنجی و تکنیک طیف سنجی جذب اتمی میزان مقاومت نسبت به سلنیت سدیم و احیای آن مشخص گردید. از طریق توالی یابی ۱۶SrRNA سویه های مقاوم جدا شده تعیین هویت گردیدند. **نتایج :** نتایج حاصل از تعیین MIC نشان داد که سویه *Bacillus licheniformis* جدا شده از کارخانه شیشه و بلور مقاومت بالاتری نسبت به *Pesudomonas aeruginosa* جدا شده از پساب قیطریه دارد و همچنین توانایی احیای کامل سلنیت به سلنیوم عنصری را دارد. خصوصیات ویژه ی این باکتری های مقاوم در پاکسازی بیولوژیکی سلنیت نوید دهنده کاربرد آن در بهسازی آلودگی های محیطی به به این اکسی آنیون می باشد. میزان احیای سلنیت سدیم با استفاده از روش های رنگ سنجی و تکنیک طیف سنجی جذب اتمی مشخص گردید. **بحث:** خصوصیات ویژه ی این باکتری های مقاوم در پاکسازی بیولوژیکی سلنیت نوید دهنده کاربرد آن در بهسازی آلودگی های محیطی به این اکسی آنیون می باشد.

کلمات کلیدی : سلنیوم , *Bacillus licheniformis* , *Pesudomonas aeruginosa*, تجزیه بیولوژیکی

مقدمه

به هنگام استخراج فلزهای مختلف پساب های آلوده موجبات آلودگی زیست محیطی را فراهم می سازند. انباشت این عناصر و نفوذ آنها به منابع آبهای زیر زمینی می تواند بسیار خطرناک باشد و لزوم حذف این سموم از محیط زیست ثابت شده است (۱۰). نقش موثر میکروارگانیسم ها با سازو کارهای مختلف و متنوع در پاک سازی زیستی (Bioremediation) این ترکیبات نشان داده شده است (۳۲). توانایی جذب فلزات سنگین و سمی توسط میکروارگانیسم ها منجر به توجه خاص پژوهشگران به مطالعه انواع قارچ ها، مخمر ها ، جلبک ها و باکتری های مختلف در جهت حذف آنها شده است (۲۰). اکسی آنیون سمی سلنیت از عناصر سمی است که به طرق مختلف وارد محیط زیست شده و انباشت آن در محیط می تواند خطرناک باشد (۸). سلنیوم در ترکیب لاستیک، رنگ سلاح، کاتالیتهای شیمیایی، شامپو های ضد شوره و ترکیب کود های کشاورزی در خاک های نواحی فقیر از سلنیوم به مصرف می رسد. در افرادی که روزانه مقدار نزدیک به ۵ میلی گرم سلنیوم مصرف می کنند مسمومیت سلنیومی مزمن بروز می کند. مصرف بالای سلنیوم در زنجیره ی غذایی موجب اختلالات گوارشی و زردی پوست ناشی از بد کاری کبد می گردد (۲۳). اکسایش میکربی سلنیوم عنصری به سلنیت توسط یک گروه از باکتری‌های اتوتروف ناشناخته نخستین بار توسط لیپمن و واکسمن گزارش شده است (۱۸). تورما در سال ۱۹۷۲اکسایش سلنید مس *II* به سلنیوم عنصری را توسط *Thiobacillus feroxidans* شرح داد که انرژی حاصل از آن معادل تنها ۲۵ درصد از انرژی بود که

آدرس نویسنده مسئول : دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، گروه میکروبیولوژی
Email :hosseinimicrobiology@gmail.com
تاریخ دریافت مقاله: ۹۱/۱۱/۱
تاریخ پذیرش: ۹۲/۶/۱۳

Archive of SID
www.SID.ir

طی اکسایش ترکیب گوگردی مشابه حاصل می‌شد (۳۱). به طور کلی متیل دار شدن سلنیوم مشتمل بر مرحله احیای اکسی آنیون و افزوده شدن متیل در مرحله بعد است، ولی ترتیب دقیق انجام این واکنش ها مورد تردید است. میکروارگانیسم ها تقریبا" به همان طریق که گوگرد را به ترکیبات مختلف تبدیل می نمایند، قادر به تبدیل و تغییر سلنیوم می باشند. پردازش میکروبی سلنیوم از طریق واکنش های احیا، اکسایش، متیل دار کردن و متیل زدایی انجام می گیرد. واکنش احیای اکسی آنیون سلنیوم بر حسب وجود اکسیژن و محصول نهایی واکنش انجام گرفته توسط میکروارگانیسم به دو دسته احیای جذبی و غیر جذبی تقسیم می گردد (۶و۲). در مطالعات انجام یافته از خاک های رسی غنی از سلنیوم سویه‌ای از جنس سودوموناس ها با توانایی مصرف *TMSe* (تری متیل سلنید)، دو سویه با توانایی متیل زدایی از *DMSe* (دمتیلاسیون سلنید)،و سویه‌هایی از جنس های کورینه باکتریوم و زانتوموناس با توانایی رشد در محیط واجد *DMDSe* به عنوان تنها منبع کربن جدا شده است (۲۵). در بررسی دیگری مشخص شده که یک متیلوتروف اجباری *Methylococcoide methylutens* تحت شرایط بی هوازی در رسوبات فاقد اکسیژن قادر به متیل زدایی از *DMSe* می باشد (۲۴). مشخص شده است که تشکیل *DMSe* در قارچ ها حاصل متیل دار شدن و احیای پیاپی آن ها است. دی متیل سلنید و آنالوگ گوگردی آن (دی متیل سولفید) در محیطهای آبی و خاکی تحت واکنشهای زیستی متیل زدایی قرار می‌گیرند(۳). احیای سلنیت به سلنیوم عنصری تحت شرایط هوازی توسط سویه های *E.faecalis*, *E.faciu*m ، *Salmonella heidelber*g ، *Colstridium pasteuciaum* و *Thouera slenatis* را در شرایط بی هوازی مورد بررسی قرار دادند (۱۳و۲۷) . گستردگی واکنشهای متیل زدایی در محیطهای غنی از سلنیوم هنوز نامعلوم است و باید فوق العاده مورد توجه قرار گیرد؛ زیرا در صورتی که در یک ناحیه، فرارسازی سلنیوم به عنوان فن آوری اصلی سلنیوم زدایی بکار گرفته شود متیل زدایی اثرات احیاکنندگی زیان آوری بر جای خواهد گذاشت و مهار آن ضروری خواهد بود (۹). بنابراین نیاز به گسترش واکنش های احیا کنندگی در محیط های آلوده توسط میکروارگانیسم های مقاوم به ترکیبات آلوده کننده مانند سلنیت ها ضروری بنظر می رسد. در این بررسی از منابع مختلف محیطی باکتری هایی با قابلیت احیا ترکیبات سلنیوم جداسازی شدند و بعد از تعیین قابلیت تجزیه بیولوژیکی، این باکتری ها از طریق روش های مولکولی تعیین هویت شدند.

مواد و روش ها

جدا سازی و کشت: نمونه برداری از لجن فعال پساب (آب و فاضلاب منطقه قیطریه) و کارخانه شیشه و بلور واقع در قزوین با استفاده از ظروف مخصوص نمونه برداری ۲۵۰ میلی لیتری استریل صورت گرفت و دقت شد که حدود چند سانتی متر از بالای بطری خالی بماند تا هم زدن به آسانی انجام گیرد و نمونه یکنواخت شود. در هر نمونه تاریخ برداشت، دمای محل ،pH محل نمونه برداری و نوع نمونه روی برچسب ثبت گردید و در اسرع وقت به آزمایشگاه منتقل شد. برای جدا سازی میکروارگانیسم ها از روش پورپلیت با ۱۰۱ لوله حاوی۱۰ ml آب مقطر استریل ستفاده گردید (۲۴). سپس از هر رقت نمونه در محیط BHI آگار تلقیح شدند و در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد به مدت ۷۲ ساعت گرماگذاری شدند. برای شناسایی اولیه سویه های جدا شده طبق روش های باکتریولوژیک سیستماتیک Bergeys آزمون های حرکت، کاتالاز، اوره آز ، اکسیداز، احیای نیترات ، متیل رد و وژر پرسکوئر انجام گرفت (۵).

بررسی مقاومت به اکسی آنیون سلنیت :

برای سنجش پایین ترین تراکم از اکسی آنیون سلنیت MIC (**Minimum Inhibitory Concentration Test**) که مانع رشد سویه های جدا شده می گردد غلظت های ۰/۱ تا ۶۰۰میلی مولارسلنیت سدیم با روش تهیه رقت در آگار (Agar Dilution method) در محیط نوترینت آگار۷ pH تهیه گردید .

رسم منحنی رشد باکتری

بدین منظور ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری مورد نظر معادل با کدورت نیم مک فارلند ($1x10^8$ CFU/ml) به محیط کشت نوترینت براث حاوی۲۰میلی لیتر سلنیت سدیم و فاقد آن افزوده و جذب نوری(۶۰۰nm) در زمان های مختلف

Archive of SID

www.SID.ir

قرائت گردیده و منحنی رشد باکتری ترسیم شد. همچنین اشکال باکتری در زمانهای مختلف در حضور سلنیت در زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت. تعیین هویت سویه های باکتریایی مقاوم جدا شده از طریق توالی یابی ۱۶srRNA انجام پذیرفت () ۱۷. بعد از تخلیص ژنوم و انجام PCR با پرایمر های یونیورسال محصول جهت توالی یابی به جهاد دانشگاهی شهید بهشتی ارسال گردید.

PA: 5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
PH: 5'AAGGAGGTGATCCAGCCGCA

برای ارزیابی میزان احیا سلنیت سدیم به سلنیوم با روش۳و۳ دی آمینو بنزیدین (DAB) (۱۸) ۲۰ میلی لیتر از محیط کشت نوترینت براث حاوی ۱میلی لیتر سوسپانسیون سویه باکتری جدا شده (معادل نیم مک فارلند) و۴۸ میکروگرم سلنیت سدیم ، در زمان های ۲۴و ۴۸ ساعت به طور استریل، برداشته و توده سلولی آن از طریق سانتریفوژ نمودن (دور rpm ۱۵۰۰۰به مدت ۱۵ دقیقه) جدا گردید. سپس به مایع رویی جدا شده ml ۷اسید کلریدریک غلیظ M۶ و محلول ۳و۳ دی آمینو بنزیدین ۰/۵٪ اضافه گردید. محلول حاصل را به قیف جدا کننده حاوی تولوئن منتقل نموده و میزان جذب آن در طول موج nm ۴۲۰ قرائت گردید. سنجش احیای سلنیت سدیم با استفاده از تکنیک جذب اتمی Atomic Absorption Spectroscopy (AAS) : بعد از تنظیم pH در حدود ۷ محیط کشت نوترینت براث حاوی ۱میلی مولار سلنیت سدیم ، توده سلولی را از طریق سانتریفوژکردن (دورrpm ۱۴۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه) جدا نموده و محلول رویی حاوی سلنیوم به روش Hydride Generation Atomic AbsorptionSector (Photometry) طیف سنجی جذب اتمی در مرکز پژوهش های کاربردی سازمان زمین شناسی اندازه گیری گردید . به رسوبات حاصل از سانتریفوژ $ml۵HNO_۳$ غلیظ اضافه شد و نمونه به مدت ۵ دقیقه جوشانده شد. مقدار کل سلنیوم موجود در محلول حاصل از هضم اسیدی توسط دستگاه HG ASS مورد سنجش قرار گرفت .

نتایج:

از بین تعداد ۲۰ سویه باکتریایی مقاوم جدا شده از لجن فعال و کارخانه شیشه و بلور تنها دو سویه با ایجاد رنگ قرمز در محیط کشت اکسی آنیون سلنیت سدیم مقاومت قابل توجهی را نشان دادند و رشد نمودند. نتایج حاصل از بررسی های فنوتیپی، بیوشیمیایی و توالی یابی۱۶srRNA نشان دادکه سویه های جدا شده از محوطه ای درکارخانه شیشه و بلور و لجن فعال بترتیب ۹۹٪ همخوانی با *Bacillus lichenifomis* و *Pseudomonas aeruginosa* داشته است. نتایج حاصل از ارزیابی MIC سویه های جدا شده دررقت های مختلف سلنیت در جدول شماره ۱ نشان داده شده است . همانطور که مشاهده می شود بالاترین میزان مقاومت مربوط به باسیل گرم مثبت *Bacillus licheniformis* بوده است.

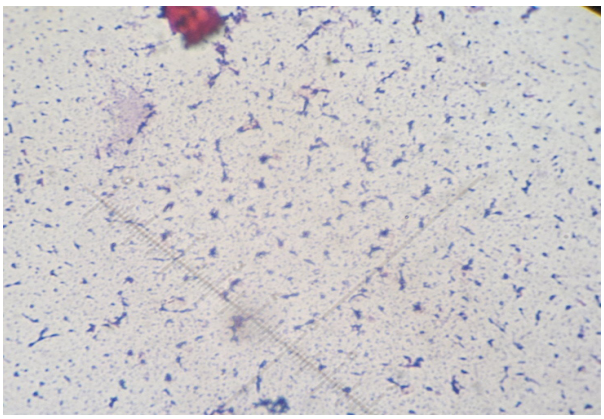
جدول ۱. نتایج حاصل از MIC رقت های مختلف سلنیت (میلی مولار)در باکتری های جدا شده از منابع طبیعی

Bacillus licheniformis	*Pseudomonas aeruginosa*	Bacteria / selenite
+	+	10
+	+	25
+	-	200
+	-	300
+	-	400
+	-	450

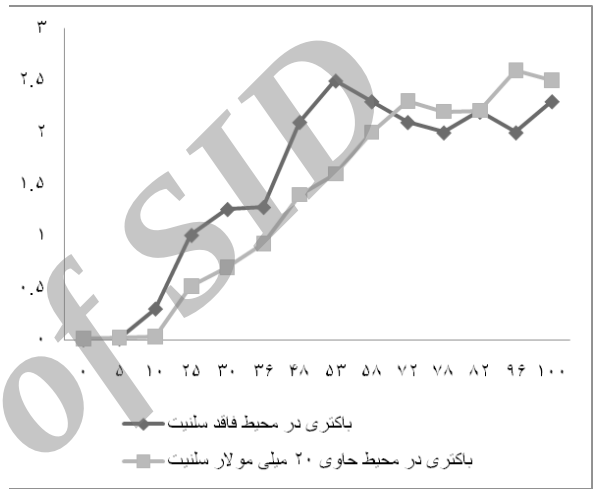
در جدول۱ نشان داده شده است که باکتری سودوموناس آیروژینوزا توانایی رشد در غلظت های بالای ۲۵ میلی مولار سلنیت را ندارد ولی باکتری باسیلوس لیکنی فورمیس می تواند غلظت ۴۵۰ میلی مولار سلنیت سدیم را تحمل نماید و غلظت های بالاتر از ۴۵۰ میلی مولار سلنیت مانع رشد این باکتری می گردد. بررسی تغیرات شکلی و منحنی رشد باکتری ..*B licheniformis* در مجاورت با سلنیت نشان داد که سلول ها در ساعات اولیه یعنی قبل از شروع فاز سکون در مجاورت با سلنیت تولید گرانول هایی بر سطح خود می نمایند و در انتهای فاز سکون محتوای درون سلولی از یک انتها بیرون می اید و یک ساختمان شبیه به پروتوپلاست را تشکیل می دهند (شکل ۱).

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱: تغییرات شکلی ایجاد شده در باسیلوس های جدا شده از کارخانه شیشه و بلور در مرحله فاز سکون درمجاورت با سلنیت



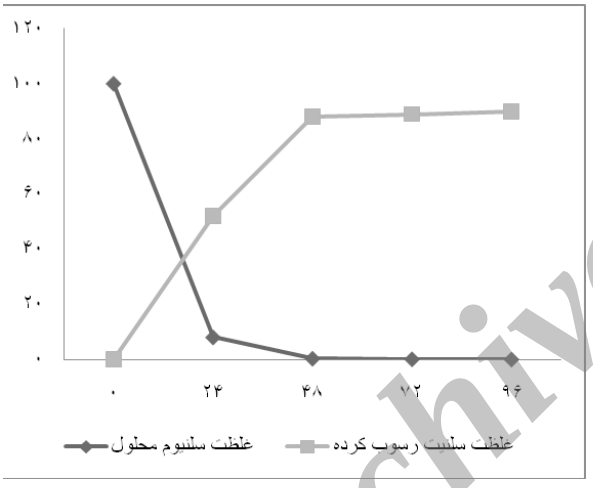
شکل۲. مقایسه منحنی رشد باکتری *Bacillus licheniformis* در محیط کشت حاوی و فاقد سلنیت

همانطور که در شکل شماره ۲ نشان داده شده است در حضور سلنیت مدت زمان فازتاخیری(Lag) افزایش یافته و در غلظت های بالای سلنیت این زمان به چند روز می رسد اما بعد از شروع فاز لگاریتمی سرعت رشد باکتری ها در حضور و فقدان سلنیت تا حدودی یکسان است. بطور کلی همزمان با آغاز رشد لگاریتمی باکتری ها فرآیند احیای سلنیت نیز افزایش می یابد. مقایسه نمودار منحنی استاندارد با میزان جذب نوری محیط کشت باکتریایی *Bacillus licheniformis* حاوی ۴۸ میکروگرم سلنیت نشان داد که بعد از ۴۸ ساعت تنها ۷ میکروگرم سلنیت باقی مانده است. سویه ها ی *Pseudomonas aeruginosa* در همین مدت ۳۲ میکروگرم سلنیت سدیم را از محیط حاوی اکسی آنیون سلنیت حذف نمودند (جدول۲).

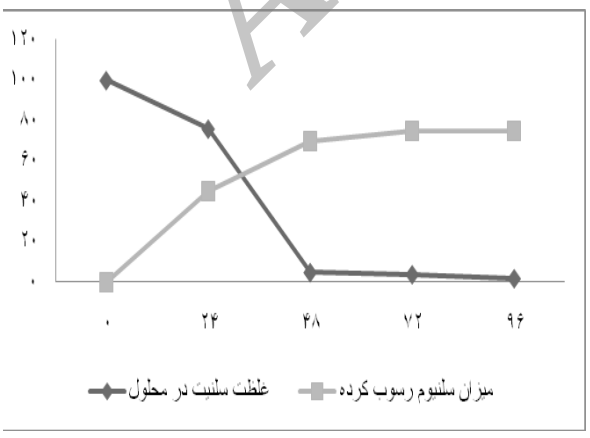
جدول ۲. جذب نوری قرائت شده محیط کشت حاوی ۴۸ میکروگرم سلنیت (۴۲۰ نانومتر)

سویه باکتریایی	جذب نوری محلول پس از ۲۴ ساعت	جذب نوری محلول پس از ۴۸ ساعت
Bacillus licheniformis	0/1	0/01
Pseudomonas aeruginosa	0/15	0/08

بررسی های دقیق تر با استفاده از تکنیک جذب اتمی نشان داد که باکتری باسیلوس لیکنی فورمیس درمدت زمان ۲۴ ساعت بیش از ۵۰٪ سلنیت را در محیط احیا کرده است اما باکتری سودوموناس در طی ۴۸ ساعت توانست به این نتیجه برسد. (اشکال ۳و۴).



شکل ۳.نمودار احیای ۱ میلی مولار سلنیت توسط باکتری باسیلوس لیکنی فورمیس



شکل۴.نمودار احیای ۱ میلی مولار سلنیت توسط باکتری سودوموناس آیروژینوزا

Archive of SID

www.SID.ir

بحث:

در این بررسی برای جداسازی سویه های باکتریایی مقاوم به سلنیت از منابع محیطی استفاده گردید و از طریق توالی یابی srRNA ۱۶تعیین هویت شدند. سویه های *Bacillus licheniformis* و *Pseudomonas aeruginosa* جدا شده مقاومت بالایی را نسبت به سلنیت سدیم در بین مجموع باکتری های گرم منفی و مثبت جدا شده از خود نشان دادند. در مطالعات قبلی از سویه های مقاوم جدا شده از خاک مناطق شور، مجتمع مس سرچشمه و باکتر های هالوفیل استفاده شده بود (۲۲و۲۱). سویه های باسیلوس جدا شده در این بررسی MIC ۴۵۰ میلی مولاری نسبت به اکسی آنیون سلنیت نشان دادند که ۴ برابر میزان MIC گزارش شده توسط کینکل و همکارانش در مورد *Rhizobium meliloti* و *Rhizobium fredii* بوده (۱۵) و MIC ۲۵ میلی مولاری سودوموناس آیروژینوزا جدا شده از لجن فعال ۵ برابر میزان MIC گزارش شده توسط و همکارانش در مورد *Pseudomonas stutzeri* می باشد (۱). در تحقیقاتی که بر روی باکتری های گرم مثبت و گرم منفی جدا شده از مناطق آلوده به سلنیت انجام گرفته MIC سویه های *Bacillus pasteurii* ۴۰۰میلی مولار، *Psedomonas saccarophila* ۱۰۰ میلی مولار و *Staphylococcus epidemidis* ۲۰۰ میلی مولار نسبت به اکسی آنیون سلنیت تعیین گردیده است (۲۸). مشاهدات نشان داده است که سویه های باسیلوس مقاوم به سلنیت توانایی احیای نیترات را نیز دارند و ممکن است دارای آنزیم های ردوکتازی اختصاصی جهت احیای سلنیت باشند. در این سویه ها به دلیل شباهت ساختاری سلنواکسی آنیون ها با نیترات، نیترات ردوکتاز موجود در آنها قادر به احیای این اکسی آنیون است (۲۹). Enterobactor cloacae سلنات را تنها در حضور نیترات به سلنیوم عنصری تبدیل می کند زیرادر این باکتری القای آنزیم سلنات ردوکتازنیازمند نیترات است (۱۹). اورملند و همکارانش در سال ۱۹۸۹نظریه‌ای ارائه داده‌اند مبنی بر اینکه باکتریهای متیلوتروف نقش متیل زدایی از مشتقات متیل دار سلنیوم را بر عهده دارند و در این حال؛ برخی باکتریهای متانوژن ممکن است در متیل دار کردن احیایی عناصر نقش داشته باشند (۷). سپس در مشاهده ای دیگر سویه ی ویبریو متحرک بی هوازی اجباری را موسوم به سویه SE S_۳ جدا کردند که می توانست با استفاده از لاکتان به عنوان دهنده الکترون، از سلنات به عنوان پذیرنده نهایی الکترون استفاده نماید(۲۶). گاربیسو و همکارانش در سال ۱۹۹۵ نشان دادند که از فراوانترین باکتری‌های خاک سویه‌های *Pseudamonas fluorescens* و*Bacillus subtilis* می‌توانند از طریق یک ساز و کار مستقل از سم زدایی نیتریت و سولفیت، اکسی آنیون سلنیت را به سلنیوم عنصری احیا کنند (۱۲). در این بررسی میزان حذف اکسی انیون سمی سلنیت در محیط کشت باکتریایی *Bacillus licheniformis* با استفاده از روش (DAB) ۳و۳ دی آمینو بنزیدین مورد ارزیابی قرار گرفت که در مقایسه با سایر روش ها مقرون بصرفه بوده است (۴) و مشخص نمود که سویه های جدا شده بیش از ۵۰٪ سلنیت موجود در محیط را طی ۴۸ ساعت از محیط حذف نمودند. نتایج حاصل از این روش در مقایسه با روش اسپکتروسکپی جذب اتمی (AAS) برای ارزیابی دقیق تر میزان پاکسازی زیستی سویه های نشان داد اختلاف کمی را نشان داد. سمیت بالای سلنیت مسئول کاهش میزان احیای سلنیت در غلظت های بالای آن است. در حالیکه سویه های سودوموناس جدا شده در مدت مشابه توانستند تنها ۳۰٪سلنیت مشابه موجود در محیط کشت را احیا نمایند. Jiang و همکارانش برای بررسی میزان حذف سلنیت در محیط کشت سویه های *Pseudomonas fluorescens K*۲۷ از روشDAB استفاده نمود. میزان احیای سلنیت توسط این سویه ها را در غلظت۱۰ میلی مولار بعد از ۲۴۰ ساعت ۵/۹٪ گزارش نمود (۱۴). صعودی و همکارانش از روش Hydride generation atomic absorption spectroscopyبرای ارزیابی میزان احیای سلنیت سدیم به سلنیوم عنصری توسط سویه های ۸۳- *Bacillus* sp. STG استفاده نمود. این سویه ها توانایی تحمل ۶۴۰ میلی مولار سلنیت سدیم را داشتند و ۸۰ میلی گرم بر لیتر سلنیت را طی۹۶ ساعت به سلنیوم عنصری تبدیل نمایند(۳۱). در مطالعه دیگری ارزیابی میزان احیا سلنیت و سلنات به سلنیوم عنصری توسط باکتری *Pseudomonas stutzeri* سویه NT-۱ جدا شده از پساب صنعتی از روش جذب اتمی استفاده شد و مشخص گردید که این باکتری توانایی احیای ۹ میلی مولار سلنیت را دارد و طی ۲۰ ساعت ۹۵٪

Archive of SID

www.SID.ir

از ۰/۹ میلی مولار سلنیت موجود در محیط کشت خود را به سلنیوم عنصری تبدیل نماید (۱۶). تحقیق انجام شده بر روی سویه های *Bacillus sp. STG* -۸۳ نشان داد که این باکتری طی ۳۲ ساعت توانایی احیای کامل سلنیت سدیم در غلظت ۱ میلی مولار را داشته است. در این تحقیق از مقدار سلنیوم عنصری موجود در رسوبات حاصل از احیای سلنیت سدیم به روش آنالیز پرتو X توسط دستگاه Proton Induced X-ray Emission مورد سنجش قرار گرفت با بدام اندازی گاز اتمسفری کشت ها و بررسی آن در دستگاه Hydride Generation Atomic Absorption Spectrophotometery نشان داده شد که این سویه قادر به تولید ترکیبات فرار سلنیوم است (۳۱). تغییرات مرفولوژیکی سلولی (Roud bodies) مشاهده شده سویه ها ی باکتریایی جدا شده در این بررسی در حین رشد مشابه نتایج به دست آمده توسط گاربیسو و همکارانش بوده است (۱۱). این تغییرات ساختمانی القا شده توسط سلنیت به دلیل افزایش در مقدار تیوردوکسین و آنزیم سم زدای موجود در سیستم دی تیول می باشد و احیای سلنیت ارتباط نزدیکی با کینتیک رشد دارد و احیا زمانی اتفاق می افتد که سلول بین فاز رشد و رکود باشد. با توجه به مقاومت بالا همراه با احیای اکسی آنیون سلنیت می توان اذعان نمود که سویه *Bacillus licheniformis* جدا شده در این پژوهش انتخاب مناسبی جهت پاک سازی زیستی پساب های صنعتی از اکسی آنیون سلنیت می باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

1. Anna M, Zawadzka, Ronald L. Crawford, Andrzej J. Paszczynski. Pyridine-2,6-Bis(Thiocarboxylic Acid) Produced by Pseudomonas stutzeri KC Reduces and Precipitates Selenium and Tellurium Oxyanions. Environ Microbiol,May2006 ; 72(5): 3119–312
2 .Bautista E M ,Alexander M . (1972) Reduction of inorganic compound by soil microorganisms . soil Sci Soc Am j. 1972; 36:918_920.
3. Challenger F. Biological methylation. Chem Rev, 1945; 36:315–361.
4. Cheng K L . Determination of traces of selenium 3_3 diamino_benzidine as selenium organic reagent . Anal hem . 1956; 28:1738_1742.
5. DAVID H, BERGEY E G D, MURRAY, ROBERT S, BREED A, PARKER HITCHENS. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. The Williams & Wilkins Company, Baltimore, Md, 1939; (5th Edition).
6. Doran J W, Alexander M. Microbial transformation of selenium . Environ Microbial,1977 ; 33:70_73.
7. Dowdle PR ,Oremland R S. Microbial oxidation of elemental selenium in soil slurries and bacterial cultures . Environ Sci Tchnol, 1998;32:3749–3755.
8. Frankenberger W T, Benson S. Selenium in the Environment . Marcel Dekker ,1994; ISBN:0_824_8993_8.
9. Frankenberger W T, Dungan R S. Microbial Transformation of selenium and the Bioremediation of seleniferous Environments. Bioremed j, 1999; 3, 171–188.
10. Gadd GM, Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. Microbiol, 2010; 156 (3), 609 – 643.
11. Garbisu C, Carlson D ,Adamkiewicz M ,Yee B C ,Wong J H ,Resto E, Buchana B B. Morphological and biochemical responses of Bacillus subtilis to selenite stress . Biofactors ,1999; 10:311_319.
12. Garbisu C, Ishii T, Leighton T, Buchanan BB. Bacterial reduction of selenite to elemental selenium. Chem Geol 1996;132:199–204.
13. Hughes M N, poole RK. Metal and microorganisms . Chapman and Hall,1998; ISBN:0_412_24400_4.
14. Jiang W. Delineating the Distribution of Selenium in Bacterial Cultures That Reduce and Methylate Oxyanions of This Toxic Metalloid. Master of Science (Chemistry), December, 1993, Sam Houston State University, Huntsville, Texas.
15. K inkle B K,Sadowsky M J ,Johnsone K, Koshinen W C.Tellurium and selenium Resistance in Rhizobia abd its Potential use for Direct isolation of Rhizobium meliloti from Soil . Environ Microbiol ,1994; 60:1674-1677.
16. Kuroda M, Notaguchi E, Sato A, Yoshioka M, Hasegawa A, Kagami T, NaritaT,Yamashita M, Sei K,Soda S, Ike M. Characterization of Pseudomonas stutzeri NT-I capable of removing soluble selenium from the aqueous phase under aerobic conditions. Journal of Bioscience and Bioengineering vol. 112 issue, 3 September, 2011; 259-264.
17. Lane D J, Pace B, Olsen G J, Stahl D A, Sogin M L, Pace N R. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. Proceeding of the national academy of the sciences of United States of America 1985; 82:6955–6959.
18. Lipman J G ,Waxman S A. The oxidation of selenium by a new group of autotrophic microorganisms .1923; Science 57:60_61.
19. Losi M E, Frankenberger W T .Reduction of selenium Oxyanions by Enterobacter cloacae SLD 1A-1 :Isolation and growth of bacterium and Its Expulsion of Selenium Particles. APPL Environ Microbiol , 1997; 63:3079_3084.
20. McCready R G L, Campbell J N, PayneJ I. Selenite reduction by Salmonella heidelberg. Canad J Microbiol , 1996; 12, 703–714.
21. Marandi R. Bacterial Leaching of Anodic Slime Based on Bioextraction of Selenium – A Case Study
9th Congress of IMWA- Oviedo Spain ,2005.
22. Motesharrei Z S. 1386. Effect of different oxyanions on tellurite resistance in halophilic and non-alophilic bacteria. Tehran university.
23. Nelson A A , Fitzhugh O G, Calvery H O. Liver Tumors Following Cirrhosis Caused by Selenium in Rats. Cancer Res, 1943; 3, 230–236.
24. Oremland R S ,Blum J S ,Bindi A B ,Dowdele P R ,Herbel M , Stolz J F.simultaneous reduction of nitrate and selenate by cell suspension of selenium_respiring bacteria . Environ Microbiol, 1999; 65:4385_4392.
25. Oremland R S, Hollibaugh JT , Maest A S , Presser T S, Miller L G ,Culbertson C W. Selenate reduction to elemental selenium by anaerobic bacteria in sediments and culture: biogeochemical significance of a novel sulfate-independent respiration. Appl Environ Microbiol, 1989 ; 55, 2333–2343.
26. Oremland R S, Switzer J B , Culbertson C W , Visscher P T, Laurence G, Miller L G, Dowdle P, Frances E. Isolation, Growth, and Metabolism of an Obligately Anaerobic, Selenate-Respiring Bacterium, Strain SES-3. Strohmaier Appl Environ Microbiol, August 1994;; 60(8): 3011–3019.
27. Rech S A, Macy j M. The terminal reductases for selenate and Nitrate R espiration in Thauera selenatis Are Two Distinct Enzymes . J Bacteriol, 1992; 174:7316_7320.
28. Riadi L,Barford J P . Biological transformations of selenium by microorganisms. As. Pac. J. Mol. Biol. & Biotech, Dec 1999; 7(1) : 1-12
29. Sabaty M ,Avazeri C ,Pignol D, Vermeglio A. Characterization of the Reuduction of Selenate and Tellurite by Nitrate Reductases . Appl Environ Microbial , 2001; 67:5122_5126.
30.Soudi M R , Tajer Mohammad Ghazvini P , Khajeh KH , Gharavi S . Bioprocessing of seleno-oxyanions and tellurite in a novelBacillus sp. strain STG-83: A solution to removal of toxic oxyanions in presence of nitrate. Journal of Hazardus Materials volum 165, Issues 1-3 , 15 june 2009; Pages 71-77.
31. Torma A E, Walden C C, Duncan D W , Branion R M R. Biotechnol Bioeng, 1972;14: 777.
32. White C , Sharman AK, Gadd G M. An integrated microbial process for the bioremediation of soil contaminated with toxic metals. Nat Biotechnol, 1998; 16, 572–575.

Archive of SID

www.SID.ir