

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 آشگرف\* : استادیار میکروبیولوژی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران، m.ashengroph@uok.ac.ir  
داود صاعدی: دانشجوی کارشناسی ارشد زیست‌شناسی 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 زیست‌کاتالیزگر 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. جدایه باکتری کارآمد براساس تست‌های بیوشیمیایی و فیلوژنتیکی شناسایی شد. برای سنجش حذف سلنیت از رنگ‌سنجی و معرف ۳ و ۳- دی‌آمینو بنزیدین استفاده شد.

**نتایج:** نتایج نشان داد لاکتوکوکوس رافینولاکتیس جدایه seD2b بالاترین مقادیر MIC (۱۱۰ میلی‌مولار) و MBC (۱۴۰ میلی‌مولار) و کمترین میزان مهارکنندگی با میانگین مهارتی 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 ۹۰/۲ درصد تخمین زده شد.

**بحث و نتیجه‌گیری:** با توجه به توانمندی باکتری لاکتوکوکوس رافینولاکتیس در حذف و احیای سلنیت، غربالگری باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک به‌عنوان زیست‌کاتالیزگر 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

## مقدمه

دفع بی‌رویه فلزات و اکسی‌آنیون‌های سمی در خاک و آب، به دلیل 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 کلمه یونانی *seleno* به معنای ماه گرفته شده که از نظر فراوانی در میان عناصر طبیعی پوسته زمین در رده شصت و ششمین عنصر قرار دارد (۲ و ۳). سلنیوم به عنوان ترکیب اصلی ساختاری سلنو پروتئین‌ها، یک ماده مغذی ضروری برای رشد انسان و حیوانات به خصوص جوجه‌های گوشتی، ماهی‌ها و پرندگان محسوب می‌شود. توصیه شده است که متوسط مصرف روزانه سلنیوم ۶۰ میکروگرم برای مردان و ۵۳ میکروگرم برای زنان باشد. دوز مجاز رژیم توصیه شده 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، مسدود کردن رگ‌زایی تومورها و سم‌زدایی آفت‌کش‌های شیمیایی کمک کند (۴ و ۵). با وجود این، مواجهه با غلظت‌های بالای ترکیبات سلنیومی می‌تواند به بروز انواع مسمومیت‌های حاد و مزمن منجر شود. براساس گزارش‌ها غلظت سلنیوم سرم در محدوده بین ۱۴۰۰ تا ۳۰۰۰۰ میکروگرم در لیتر می‌تواند مسمومیت حاد ایجاد کند که ممکن است با خوردن اتفاقی ترکیبات غیرآلی سلنیوم مثل سلنوآسید و سدیم سلنیت ایجاد شود و محدوده

۵۰۰ تا ۱۴۰۰ 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 اکسی‌آنیون سلنیوم محسوب می‌شود و تقلیل یا حذف آن به فرم‌های کمتر سمی به ویژه سلنیوم عنصری که غیر محلول 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، غیرفعال کردن پروتئین از طریق جایگزینی گوگرد و جلوگیری از تعمیر DNA تداخل داشته باشد (۸ و ۹)؛ بنابراین، مواجهه درازمدت با غلظت‌های بالای سلنیت می‌تواند به بروز ناراحتی‌های پوستی، تغییر شکل ناخن‌ها، ریزش مو، نکروز سلول‌های کبدی، اختلالات تنفسی و در نهایت 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 در نتیجه کاربرد گسترده 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

*Thauera* و *Agrobacterium* گزارش شده است که پیشنهاد می‌کند این قابلیت به‌عنوان یک استراتژی اصلاحی جهت کاهش یا حذف اکسی‌آنیون‌های سمی سلنیوم از آب‌های سطحی و پساب‌های صنعتی به کار گرفته شود (۱۵ و ۱۶). باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک با توجه به پوشش دادن استانداردهای GRAS<sup>۱</sup> به‌عنوان استراتژ در صنعت مواد غذایی و نوشیدنی شناخته می‌شوند (۱۷). این ارگانیزم دارای نقش اساسی در غذاهای تخمیری از جمله خواص ضد میکروبی، فعالیت ضد تومور، کاهش کلسترول سرم، کاهش عدم تحمل لاکتوز، تحریک سیستم ایمنی بدن و تثبیت فلور روده هستند (۱۸). علاوه بر نقش‌های پروبیوتیکی باکتری‌های اسیدلاکتیک، گزارش‌هایی از پتانسیل باکتری‌های ذکر شده در حذف میکروبی فلزهای سنگین و اکسی‌آنیون‌های سمی سلنیوم از آب‌های آشامیدنی و مواد غذایی در سطح دنیا ارائه شده است (۱۸ - ۲۰). در این پژوهش، جمع‌آوری فرآورده‌های لبنی سنتی به‌عنوان بستری مناسب جهت غربالگری باکتری‌های اسیدلاکتیک بومی مقاوم به سلنیت و بررسی امکان به‌کارگیری آن‌ها به‌عنوان زیست‌کاتالیزگر مؤثر و ایمن، برای زیست‌پالایی اکسی‌آنیون سمی سلنیت از محیط‌های آلوده در شرایط آزمایشگاه ارزیابی شد.

### مواد و روش‌ها

۵۶ نمونه ماست که به‌صورت خانگی تهیه شده بودند، از روستاهای حومه شهرستان کامیاران، پاوه، اسلام آباد غرب، دیواندره، مریوان، بیجار و سنندج، با رعایت شرایط استریل جمع‌آوری شد و نمونه‌ها تا زمان کشت در محیط‌های مناسب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری شدند. در ادامه،

خطر آلودگی منابع آبی و خاک (۱۱ و ۱۲). گزارش‌های بسیاری از میزان وجود سلنیوم در پساب‌های مرتبط با فعالیت‌های صنعتی و کشاورزی وجود دارد که از آن جمله می‌توان به پساب حاصل از کشاورزی به‌میزان ۱۴۰ تا ۱۴۰۰ میکروگرم بر لیتر، پساب و ضایعات حاصل از معادن اورانیوم معادل ۱۶۰۰ میکروگرم بر لیتر، پساب حاصل از معدن کاری معادن طلا به میزان ۰/۲ تا ۳۳ میلی‌گرم بر لیتر و پساب حاصل از صنایع پتروشیمی به‌میزان ۷/۵ تا ۵۵/۹ میکروگرم بر لیتر اشاره کرد (۱۳). با وجود تکنیک‌های متفاوت از جمله رسوب شیمیایی، اکسیداسیون و یا احیاء، فیلترینگ، تبادل یونی، اسمز معکوس، تکنولوژی غشایی، تبخیر و تیمار الکتروشیمیایی برای حذف فرم‌های سمی سلنیوم، بسیاری از این تکنیک‌ها از نظر مصرف مواد شیمیایی سمی، حجم بالای پسماند، مصرف انرژی بالا، آلودگی زیست‌محیطی و ناکارآمدی در کاهش یا حذف سلنیت در غلظت‌های پایین غیراقتصادی هستند. در محیط‌های طبیعی، سلول‌های زنده مانند باکتری‌ها، قارچ‌ها، مخمرها و گیاهان شناخته شده هستند که قادر به حذف و احیای سلنیت به فرم کمتر سمی سلنیوم هستند. در این میان، باکتری‌ها به‌دلیل زمان تقسیم کوتاه، سهولت کشت، سهولت پردازش فرایندهای پایین‌دستی و دستکاری برتری دارند (۱۴). در سال‌های اخیر حذف باکتریایی سلنیت به اشکال با حلالیت و سمیت کمتر عمدتاً به فرم عنصری سلنیوم، در سویه‌های باکتری متعلق به جنس‌های *Bacillus*، *Pseudomonas*، *Rhizobium*، *Clostridium*، *Methylococcus*، *Stenotrophomonas*، *Halomonas*، *Aeromonas*، *Comamonas*، *Tetrathioabacter*

ساعت‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت بررسی شد.

#### ارزیابی اثر مهارکنندگی سلنیت بر جدایه‌های

#### باکتری با روش انتشار در چاهک<sup>۵</sup>: در این روش از

سوسپانسیون باکتری تهیه شده ( $10^8 \times 1/5$  CFU/ml) بر روی محیط کشت M17 آگار به وسیله سواب استریل کشت چمنی داده شد. پس از تعبیه چاهک‌های استریل (به قطر پنج میلی‌متر) به کمک پی پت پاستور، ۲۵ میکرولیتر از غلظت ۵۰ میلی‌مولار سلنیت استریل، پس از استریل کردن به وسیله فیلترهای سرسرنگی ۰/۲۲ میکرونی، در چاهک‌ها ریخته شد. محیط‌های کشت به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. سپس قطر هاله عدم رشد ایجاد شده توسط یون سمی سلنیت علیه جدایه‌های باکتری، توسط خطکش اندازه‌گیری شد. به منظور کاهش خطا، هر آزمون سه بار تکرار شد.

#### ترسیم منحنی رشد جدایه‌های باکتری مقاوم به

سلنیت: به منظور 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 برات 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 تهیه شده به محیط‌های مربوطه جهت بررسی سنتتیک رشد اضافه شد. محیط‌های تلقیح شده در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد با دور شیکر ۱۸۰ rpm در شرایط تاریکی گرمخانه‌گذاری شد. میزان دانسیته سلولی در غلظت ذکر شده به مدت ۴۸ ساعت با فواصل زمانی ۴ ساعت و با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت شد. هر آزمایش سه بار تکرار شد

به منظور 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 کلرید سدیم با غلظت ۲/۲۵ گرم در لیتر، نمک کلرید پتاسیم با غلظت ۰/۱۰۵ گرم در لیتر، نمک کلرید کلسیم با غلظت ۰/۱۲ گرم در لیتر و نمک بیکربنات سدیم با غلظت ۰/۰۵ گرم در لیتر) تهیه شد. پس از تهیه سری رقت ( $10^{-2}$  تا  $10^{-5}$ )، یک میلی‌لیتر از رقت‌های تهیه شده به محیط کشت M17 آگار حاوی ۱۰ میلی‌مولار محلول سلنیت سدیم 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 به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه شدند. پس از تهیه تک‌کلنی‌های خالص، جدایه‌های باکتری در محلول ۱۵ درصد گلیسرول و ۰/۶ درصد پپتون در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد جهت استفاده‌های بعدی نگهداری شد.

#### تعیین حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی از رشد<sup>۲</sup> و

#### حداقل غلظت کشندگی<sup>۳</sup> جدایه‌های باکتری نسبت به

سلنیت: مقادیر MIC و MBC برای جدایه‌های مقاوم به سلنیت با استفاده از روش استاندارد رقت در آگار<sup>۴</sup> انجام شد (۲۱). برای این منظور، از جدایه‌های باکتری کشت داده شده به مدت ۲۴ ساعت در محیط کشت M17 برات، سوسپانسیون با کدورت معادل استاندارد نیم مک فارلند ( $10^8 \times 1/5$  CFU/ml) تهیه شد و سپس ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون مورد نظر 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

۱۲/۵ میکرولیتر Master mix (حاوی بافر PCR، dNTPs، MgCl<sub>2</sub> و آنزیم Taq-polymerase)، یک میکرولیتر پرایمرهای بالادست و پایین دست (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.

برنامه تکثیری با واسرشت اولیه<sup>۷</sup> در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، سپس ۳۰ چرخه به صورت واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمر به DNA ژنومی<sup>۸</sup> در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و بسط DNA<sup>۹</sup> در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه انجام شد. بسط نهایی<sup>۱۰</sup> در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز یک درصد، در شرایط بافری TAE و با ولتاژ ۷۰ به مدت یک ساعت انجام شد. پس از اطمینان از صحت انجام PCR، محصول تخلیص شده برای توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کره جنوبی (توسط شرکت تکاپو زیست) ارسال شد. توالی‌های به دست آمده در پایگاه ژنی NCBI مقایسه شد. سپس با استفاده از برنامه Clustal W هم‌ردیفی چندتایی انجام شد. در نهایت درخت فیلوژنتیکی به کمک نرم‌افزار MEGA.6 رسم شد (۲۶).

**سنجش میزان حذف سلنیت تحت شرایط سلول‌های در حال استراحت جدایی 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 و ۳-دی آمینو بنزیدین ۰/۵ درصد (وزنی/حجمی) در محلول اسیدی (HCl پنج مولار) واکنش داده و زرد رنگ می‌شود که پس از استخراج در حلال تولوئن جذب

و پراکنندگی مربوط به داده‌ها با روش‌های آماری بررسی شد. در ادامه به منظور تعیین زمان دوبرابر شدن جمعیت سلول باکتری<sup>۶</sup> در منطقه خطی منحنی رشد (فاز لگاریتمی رشد)، شیب منحنی محاسبه شد. سپس از روی شیب معادله خط و با استفاده از فرمول زیر، زمان دوبرابر شدن سلول باکتری در حضور یون سمی سلنیت محاسبه شد (۲۲).

$$\text{doubling time} = \frac{\text{Ln } 2 = 0.694}{\mu_{\text{max}} = \text{slope}}$$

### تعیین هویت جدایی باکتری کارآمد seD2b:

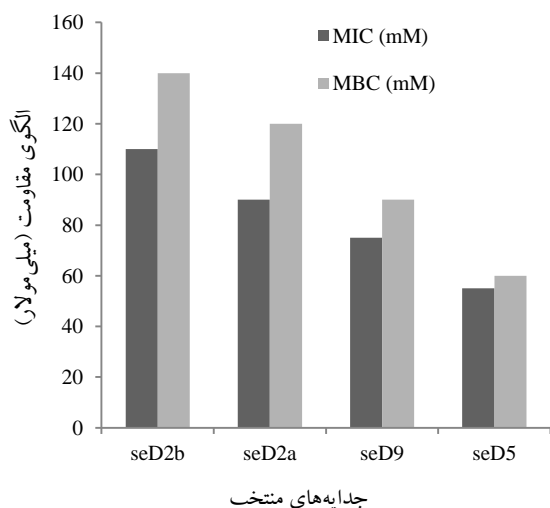
شناسایی مورفولوژیک و بیوشیمیایی جدایی خالص seD2b براساس صفات شکلی، رنگ آمیزی گرم، تست کاتالاز، تولید CO<sub>2</sub> از سیترات، تولید NH<sub>3</sub> از آرژنین، رشد در دماهای مختلف، رشد در درصدهای مختلف نمک سدیم کلراید و همچنین تخمیر قندهای مختلف از جمله گلوکز، سوکروز، مالتوز، آرابینوز، ریوز و تری هالوز انجام گرفت (۲۳ و ۲۴). شناسایی ملکولی جدایی seD2b براساس توالی نوکلئوتیدی ژن *16SrDNA* انجام گرفت. برای استخراج DNA ژنومی از کیت استخراج DNA مخصوص باکتری‌های گرم مثبت، 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 پایین دست rp2 (ACGGCTACCTTGTTACGACTT) استفاده شد (۲۵). مخلوط واکنش PCR (۲۵ میکرولیتر) شامل

بار تکرار شد.

### نتایج

#### جداسازی و غربالگری باکتری‌های مولد

اسیدلاکتیک مقاوم به سلنیت: از بین ۲۴ باکتری مقاوم جداسازی شده، 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 قابل مشاهده 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 جدا شده از محصولات لبنی سنتی

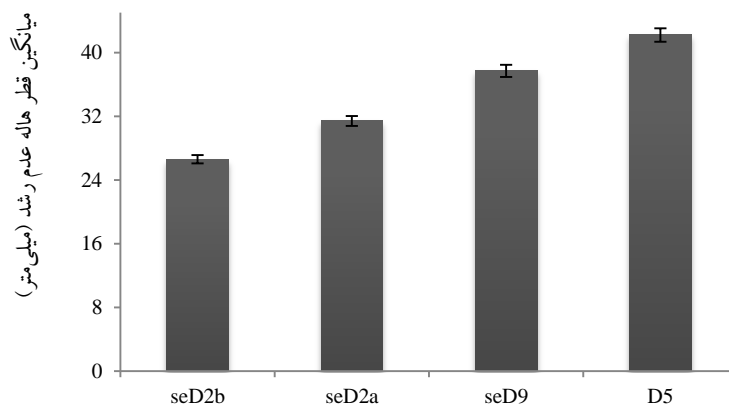
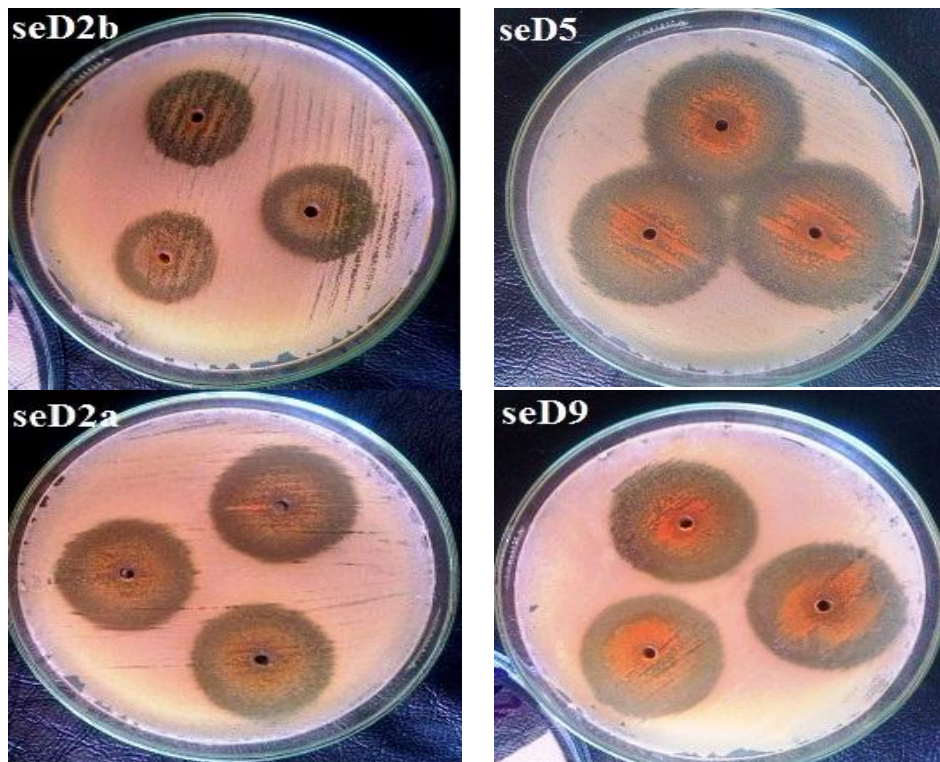
محلول در طول موج ۴۲۰ نانومتر قابل اندازه‌گیری است (۲۷). پس از رسم منحنی کالیبراسیون، درصد حذف سلنیت تحت شرایط سلول‌های در حال استراحت سوئی باکتری seD2b، طبق فرمول زیر به دست آمد که در آن، C0: غلظت اولیه سلنیت و C: غلظت سلنیت باقیمانده است.

$$Selenite\ removal\ (\%) = \frac{(C_0 - C)}{C_0} \times 100$$

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

تا ۹۰ میلی‌مولار و MBC در محدوده ۶۰ تا ۱۲۰ میلی‌مولار مشاهده شد. در ادامه جهت تأیید نتایج به‌دست آمده از روش رقت‌سازی در آگار، روش انتشار در چاهک استفاده شد (شکل ۲).

طبق شکل ۱، جدایه seD2b (جدایه از یک نمونه ماست سنتی جمع‌آوری شده از روستاهای توابع شهرستان کامیاران) بالاترین مقادیر MIC (۱۱۰ میلی‌مولار) و MBC (۱۴۰ میلی‌مولار) را به خود اختصاص داد. سایر باکتری‌های جدایه‌شده مقادیر MIC در محدوده ۵۵



جدایه‌های باکتریایی

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

تقریباً رشد قابل‌توجهی در این فاصله زمانی صورت نگرفته است.

در ادامه به منظور 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 به دست آمده، زمان تقسیم جدایه‌های ذکر شده تخمین زده شد (جدول ۱).

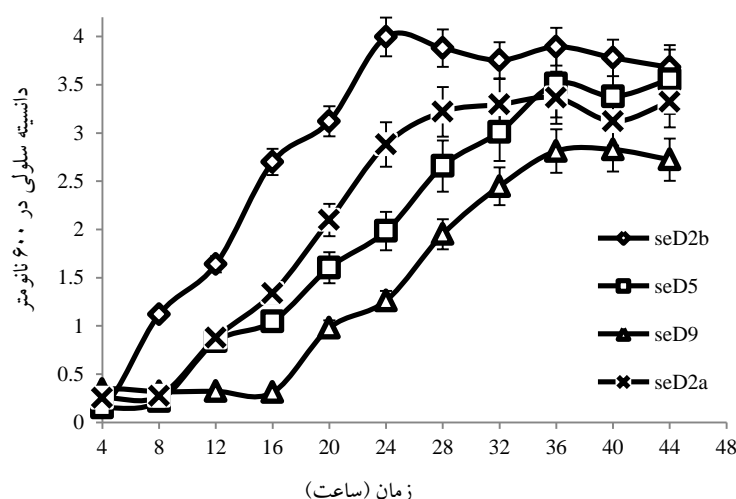
جدول ۱- نتایج مربوط به معادلات رگرسیونی خطی و زمان تقسیم به دست آمده از ترسیم منحنی‌های رشد جدایه‌های مقاوم در مجاورت ۲۵ میلی‌مولار یون سلنیت

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

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

### سننتیک رشد سلولی جدایه‌های باکتری مقاوم به

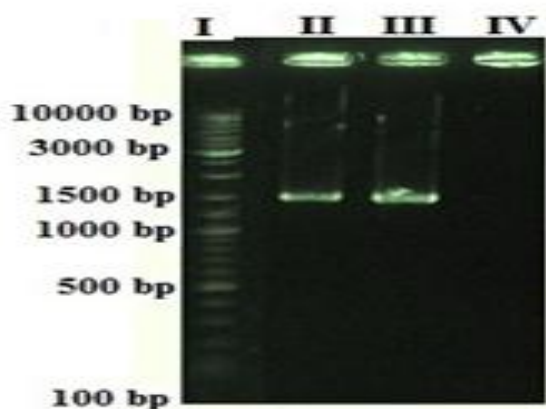
اکسی‌آنیون سمی سلنیت: با هدف تعیین جدایه باکتری کارآمد جهت آزمایش‌های حذف زیستی سلنیت، چهار جدایه seD5، seD9، seD2a، seD2b در حضور ۲۵ میلی‌مولار سلنیت رشد داده شدند (شکل ۳). براساس نتایج به دست آمده، جدایه seD2b بالاترین دانسیته نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر با ارزش ۳/۹ را بعد از ۲۴ ساعت از شروع کشت نشان داد. جدایه seD9 کمترین دانسیته نوری معادل ۲/۹ را بعد از ۳۶ ساعت از شروع گرمخانه‌گذاری داشت. سوئیۀ اخیر تا ۱۶ ساعت از شروع گرمخانه‌گذاری در فاز تأخیری قرار داشت و



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



بیوشیمیایی و طبق کتاب‌های مرجع، سویه باکتری seD2b به‌طور موقت تحت نام لاکتوکوکوس رافینولاکتیس تعیین هویت شد. در ادامه جهت شناسایی دقیق سویه 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.



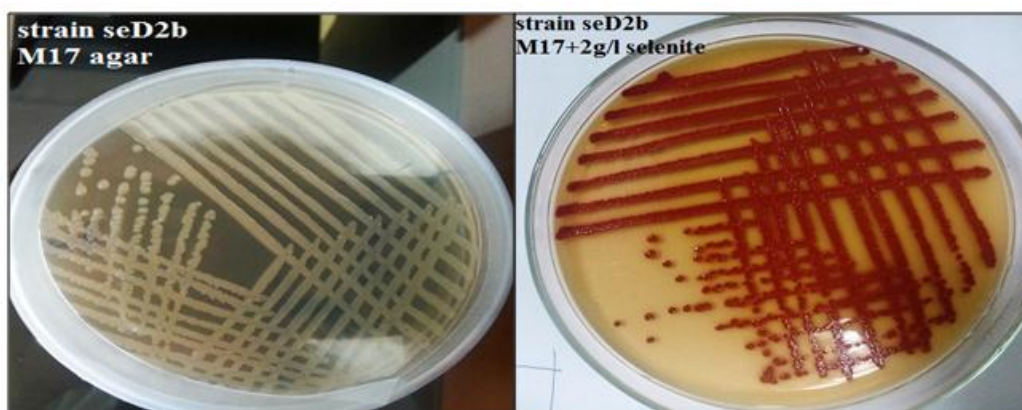
شکل ۵- تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR سویه باکتری seD2b. (I): DNA نشانگر، (II) و (III): سویه باکتری seD2b و (IV): کنترل منفی.

براساس نتایج به‌دست آمده کمترین زمان دوبرابر شدن معادل ۵۵ دقیقه مربوط به جدایه seD2b و بیشترین زمان معادل ۸۲ دقیقه مربوط به seD9 گزارش شد. در نهایت جدایه باکتری seD2b به‌عنوان سویه کارآمد جهت آزمایش‌های سلنیت‌زدایی شناسایی شد.

#### نتایج آزمون‌های تشخیصی بیوشیمیایی و ملکولی:

شناسایی اولیه جدایه مقاوم seD2b، با قابلیت احیای یون سلنیت به سلنیوم عنصری که با ایجاد کلنی قرمز رنگ در محیط کشت قابل شناسایی است (شکل ۴)، براساس آزمون‌های فیزیولوژیک و تست‌های بیوشیمیایی انجام گرفت.

جدایه ذکر شده از نظر شکل ظاهری و واکنش گرم، کوکسی گرم مثبت بود. از نظر تست‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی کلیدی از جمله تست کاتالاز، هیدرولیز آرژنین، تولید دی‌اکسید کربن از سترات و همچنین رشد در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و نمک سدیم کلراید با غلظت ۶/۵ درصد (وزنی/حجمی) منفی بود. نتایج تست‌های تخمیر کربوهیدرات سویه seD2b بیانگر توانایی سویه ذکر شده در مصرف گلوکز، مالتوز، آرابینوز، سوکروز، ریبوز، تری‌هالوز و گلیسرول بود. براساس نتایج به‌دست آمده از آزمون‌های فنوتیپی و



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

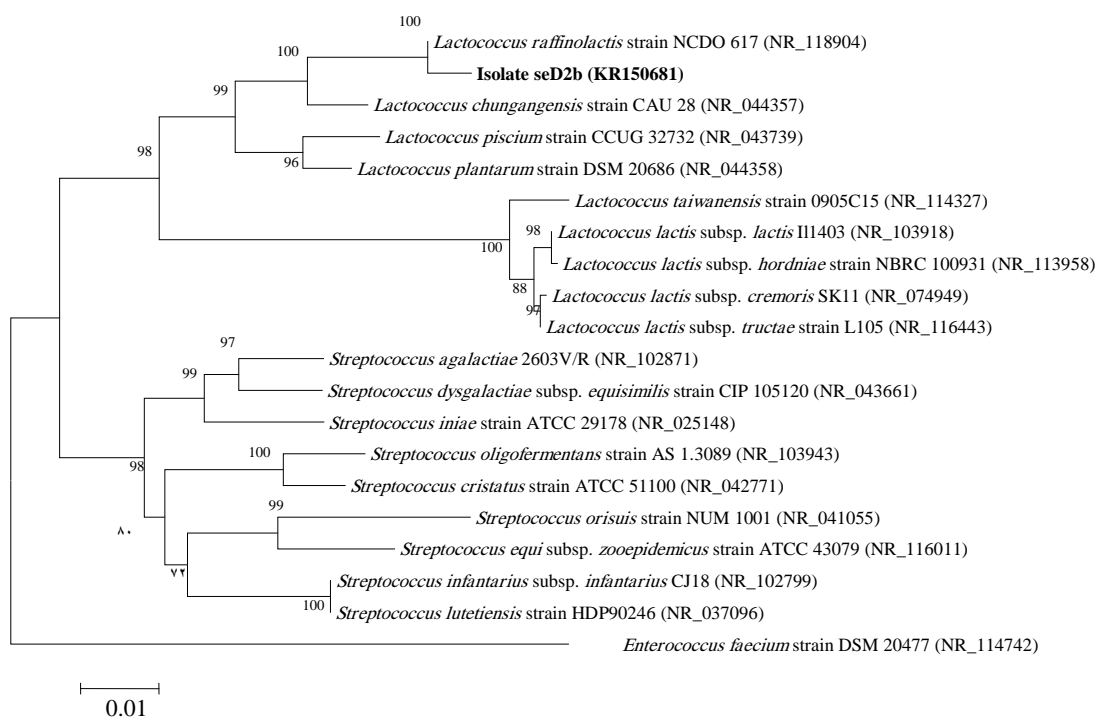
می‌توان از نظر تاکسونومی به‌عنوان سویه‌ای از لاکتوکوکوس رافینولاکتیس طبقه‌بندی کرد (شکل ۶).

#### بررسی پتانسیل حذف میکروبی سلنیت توسط

#### سلول‌های در حال استراحت *Lactococcus raffinolactis*

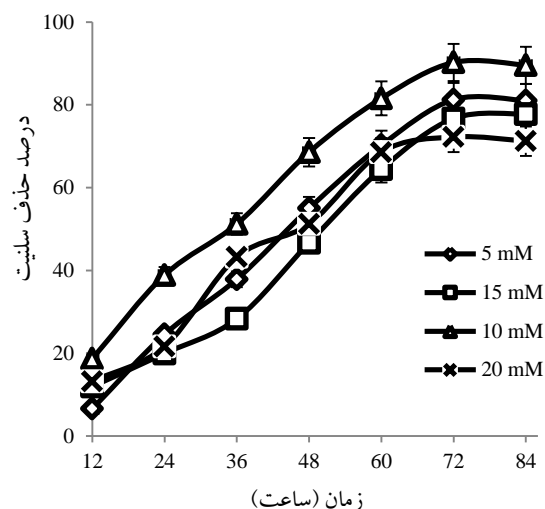
seD2b: برای سنجش کمی روند حذف میکروبی سلنیت، سلول‌های در حال استراحت سویه باکتری لاکتوکوکوس رافینولاکتیس seD2b به‌عنوان زیست کاتالیزگر در محیط بافری فسفات حاوی غلظت‌های مختلف سلنیت به کار گرفته شد (شکل ۷).

پس از مشخص شدن توالی ژن *16SrDNA* سویه باکتری ذکر شده، ارتباط فیلوژنتیکی سویه seD2b با سویه‌های باکتری موجود در پایگاه اطلاعات ژنی NCBI بررسی شد. براساس اطلاعات به‌دست آمده نزدیک‌ترین گونه باکتری به سویه ذکر شده با شباهت ۹۹ درصدی 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 سویه seD2b را



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

سبز نوآورانه و امیدبخش در دسترس، جهت پالایش میکروبی فلزات سنگین از آب و زمین‌های آلوده است. میکروارگانیسم‌ها نقش قابل توجهی 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، آلکیل‌کردن، کمپلکس کردن، 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 چرخه ژئو-شیمیایی این شبه فلز دارند و بیشترین میزان کاهش یا حذف 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 جدایه 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، جدایه باکتری seD2b با پتانسیل مقاومت همراه با احیای اکسی‌آنیون سلنیت (بالاتر از ۱۱۰ میلی‌مولار) به‌عنوان سویه کارآمد جهت انجام آزمایش‌های سلنیت‌زدایی انتخاب و شناسایی فنوتیپی و ملکولی شد. براساس نتایج آزمون‌های شناسایی، سویه باکتری seD2b دارای بالاترین شباهت (بیش از ۹۹ درصدی) با لاکتوکوکوس رافینولاکتیس بود. توالی باکتری



شکل ۷- نمودار حذف میکروبی سلنیت توسط باکتری لاکتوکوکوس رافینولاکتیس سویه seD2b تحت شرایط سلول‌های در حال استراحت. نتایج ارائه شده 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 اولیه یون سلنیت در محیط زیست تبدیلی ارتباط دارد. پس از ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری، سلول‌های در حالت استراحت سویه باکتری ذکر شده توانست به میزان ۹۰/۲ درصد 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

آزمایشگاهی ارزیابی شد. براساس نتایج، پس از ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری، سلول‌های در حالت استراحت سویه باکتری ذکر شده توانست به میزان ۹۰/۲ درصد 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 سویه *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 احیای می‌کند (۳۱). در مطالعه‌ای که کورادو<sup>۱۲</sup> و همکاران در سال ۲۰۱۱ بر سویه *Pseudomonas stutzeri* NT-I انجام دادند مشخص شد که این سویه توانایی حذف و احیای سلنیت را دارد و می‌تواند در مدت زمان ۱۸ ساعت ۹۵ درصد 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 جدا شده سنجش شد و در این بین بالاترین میزان حذف و احیا توسط سویه *Bacillus pumilus* به میزان ۹۷ درصد با غلظت اولیه ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر سلنیت سدیم در مدت ۱۴۴ ساعت گزارش شد (۱۰). در مطالعه‌ای مشابه که pienez بر جنس متفاوتی از باکتری اسیدلاکتیک انجام داد، میزان توانایی حذف سلنیت توسط سویه *Enterococcus* (LAB 18) *faecium* به میزان ۸ میلی‌گرم در لیتر (۸۰ درصد) در مدت ۲۴ ساعت گزارش شد. در این بررسی حذف بهینه سلنیت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و pH برابر ۷ ثبت شد. بر این اساس، در غلظت‌های اولیه ۱۰ و ۶۰ میلی‌گرم

ذکر شده با شماره دسترسی KR150681 در بانک جهانی اطلاعات ژنی NCBI قابل دسترسی است. در ارتباط با الگوی تحمل پذیری ذاتی نسبت به اکسی‌آنیون سمی سلنیت، در بسیاری از سلول‌های باکتریایی غربالگری شده، میزان مقاومت بین ۲ تا ۵۰ میلی‌مولار گزارش شده است. برای مثال رشد گونه‌های باکتری *Ralstonia metallidurans*، *Bacillus subtilis*، *Rhodobacter* و *Rhodospirillum rubrum* *spheroids* توسط ۲ تا ۶ میلی‌مولار سلنیت مهار شد. همچنین رشد *Rhizobium* sp. از ۸ تا ۱۸ میلی‌مولار سلنیت مهار گردید. سطوح مقاومت بالاتری درباره *Azospira oryzae*، *Aeromonas salmonicida* و *Stenotrophomonas maltophilia* به میزان ۱۶ تا ۵۰ 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 مطالعه صورت گرفته در ارتباط با حذف و احیای سلنیت سدیم، خلیلیان<sup>۱۱</sup> و همکاران در سال ۲۰۱۵ یک سویه باکتری تحت نام *Bacillus* sp. QW90 را با قابلیت تحمل‌پذیری بالا (۵۵۰ میلی‌مولار) از پساب‌های آلوده به سلنیت را جداسازی کردند (۱۶). با مقایسه یافته‌های به دست آمده در این پژوهش با گزارش‌های مشابه صورت گرفته در سویه‌های باکتری می‌توان نتیجه گرفت که جدایه 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 جدایه بومی لاکتوکوکوس رافینولاکتیس به‌عنوان زیست‌کاتالیزگر در مقیاس

- (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.

در لیتر سلنیت، به ترتیب ۹/۱۹ میلی گرم در لیتر و ۵۹/۷ میلی گرم در لیتر یون سمی سلنیت توسط گونه 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 می کند (۱۸). در مطالعه‌ای که Wang و همکاران انجام دادند میزان حذف و احیای ۰/۲ میلی مولار سلنیت گزارش شد و سویه *Escherichia coli* توانست میزان ۹۹/۱ درصد سلنیت را در مدت زمان ۸ ساعت حذف کند (۳۳).

**پیشنهادها:** در این پژوهش برای نخستین بار حذف زیستی سلنیت در گونه لاکتوکوکوس رافینولاکتیس گزارش شد. باکتری بومی ذکر شده دارای توانمندی احیای سلنیت به سلنیوم است؛ بنابراین پس از تعیین دقیق کمی میزان سلنیوم و تعیین دقیق جایگاه سلنیوم در سلول میکروبی به کمک روش‌های اتمیک و میکروسکوپی، غنی سازی غذاهای تخمیری با سلنیوم ایجاد شده توسط باکتری ذکر شده، به عنوان یک مکمل غذایی ارزشمند و ایمن در تغذیه حیوانات و یا انسان بسیار امیدوار کننده 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*. 2nd ed. Burlington Massachusetts: Butterworth-Heinemann; 1997.

- (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 *Rhodospseudomonas 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. New York: 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, Burkepille 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.

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.

---

<sup>1</sup> - Generally regard as safe

<sup>2</sup> - Minimum Inhibitory Concentration

<sup>3</sup> - Minimum Bactericidal Concentration

<sup>4</sup> - Agar Dilution Method

<sup>5</sup> - Well Diffusion Method

<sup>6</sup> - Doubling time

<sup>7</sup> - Denaturation

<sup>8</sup> - Annealing

<sup>9</sup> - Extension

<sup>10</sup> - Final extension

<sup>11</sup> - Khalilian

<sup>12</sup> - Kuroda





## 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, Sanandaj, Iran, davoudsaedi@gmail.com

### Abstract

**Introduction:** The accumulation of selenium oxyanions in the form of selenite ( $\text{SeO}_3^{-2}$ ) 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