



<https://bjm.ui.ac.ir/?lang=en>

Journal of Microbial Biology

E-ISSN: 3060-7647

13rd Year, Vol. 13, No. 49, 2024 pp. 53-75

Received: 18/07/2023 Accepted: 24/10/2023

(Research Paper)

Screening of Effective Bacteria in the Biological Removal of Selenium from Sarcheshme Copper Tailing Dam Effluent*

Seyed Mansour Meybodi* 

Assistant Professor of Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran
s.m.meybodi@gmail.com

Amir Sarabandi Haqiqhi

Master of Science in Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Science, Islamic Azad University, Sirjan, Iran
amirsinasarabandi@yahoo.com

Abstract

One of the concerns of today's world is environmental pollution caused by heavy metals, and in this regard, the element selenium is very important due to its low amount in the environment. Bioremoval of metals is one of the cleanest and cheapest methods of biological absorption. The purpose of this research is to isolate and evaluate selenium-resistant strains for the bioremoval of this metal from aquatic environments. By isolating selenium-resistant strains, the bioabsorption rate of the selected types was investigated in different conditions of acidity, temperature, and biomass amount at different times. In between, two isolates were resistant to the concentration of 400 mM sodium selenite, which were identified after performing biochemical and genetic tests. The highest absorption rate in terms of inoculated biomass was related to *Thalassospira permensis* and *Bacillus thuringiensis* at 4% in 20 and 60 minutes, respectively. The highest amount of absorption was obtained by *Bacillus* at an acidity of 5 during 40 minutes and by *Thalassospira* at an acidity of 7 and a time of 60 minutes. The optimal temperature for the two strains was 25 °C and it was found that *Thalassospira permensis* had the best effect in 20 minutes and *Bacillus thuringiensis* had the best effect in 40 minutes. In addition, *Thalassospira permensis* was the best choice for selenium bioabsorption by absorbing 95.1% of total selenium with 4% of the biological mass in a period of 20 minutes, at acidity equal to 6 and 25 °C. *Thalassospira permensis* absorbed 95.1 mgL⁻¹ of 100 mgL⁻¹ of sodium selenite in the culture medium within 20 minutes by biomass 4%. Thus, it had a high bioabsorption rate and became a suitable candidate for further studies to remove selenium from the relevant wastewater.

Keywords: Bacterial Screening, Biological Absorption, Selenium, Tailing Dam Effluent.

* Corresponding Author

3060-7647/ © 2024 The Authors

This is an open access article under the CC-BY-NC-ND 4.0 License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)



Meybodi, S. M., & Sarabandi Haghghi, A. Screening of effective bacteria in the biological removal of selenium from Sarcheshme copper tailing dam effluent. *Journal of Microbial Biology*, 2024; 13 (49): 53-75.

<http://dx.doi.org/10.22108/BJM.2023.138438.1553>

Introduction

When wastewater contaminated with heavy metals enters the environment, even within permissible limits, it becomes concentrated and pollutes surface and groundwater, leading to irreversible effects on the environment. The accumulation of Selenium in the environment leads to a range of health problems in humans (1). Selenium is present in nature in four forms of oxyanions: selenate, selenite, selenide, and elemental selenium. Selenate and selenite have the highest bioavailability and, consequently, pose the highest toxicity to biological systems (5). Microorganisms aid in the dissolution of metals in the surrounding waters by secreting substances that convert metals into soluble salts, thereby making them extractable from the environment. Furthermore, these organisms have the ability to separate metals by absorbing metal particles onto their cell walls. In terms of biological absorption, the cell walls of microorganisms contain substantial quantities of polysaccharides and proteins, which possess active sites for metal absorption (6, 8). The waste produced by copper mines serves as a source of contamination that pollutes water and disrupts the integrity of natural ecosystems (9). In order to prevent selenium issues in the tailings and enhance the selenium content utilized in the factory, cost-effective strategies can be implemented, such as the utilization of indigenous microorganisms that have the ability to absorb selenium present in wastewater and tailings. The objective of the present study is to isolate and screen selenium-resistant bacteria from the tailings of the Sarcheshme copper mine and evaluate their capacity to eliminate selenium from the company's wastewater utilizing these resistant strains.

Materials and Methods

Sampling was conducted from the waste dam of the copper mine and the samples were promptly transported to the laboratory in a box with dry ice (10). A volume of 1 mL/g of the samples was utilized to prepare successive dilutions. From the dilutions of 0.1 and 0.01, a volume of 0.1 mL was extracted using a glass pipette and added to a Luria-Bertani agar medium containing 10 mg/L sodium selenite for surface cultivation. Subsequently, pure cultures were prepared from the resulting colonies using the same medium. Next, the minimum inhibitory concentration test was conducted (1), and a biomass of bacteria with the highest resistance to selenium was prepared in a Luria-Bertani broth medium using the freeze-drying method for preservation (11). To investigate the uptake of selenium by the biomass, the metal uptake in a 100 mg/L selenium solution was examined under different temperatures, acidity, and initial biomass conditions using atomic absorption spectrophotometry at specific time intervals (11, 12). Catalase, urease, oxidase, motility, indole production, hydrogen sulfide production, carbohydrate fermentation, gram staining, salt tolerance, and thermal tolerance tests were conducted to initially identify strains with the highest uptake (13, 14). To ensure precise identification of the chosen strains, we conducted genetic testing through polymerase chain reaction and 16S rRNA gene amplification. After electrophoresis, the PCR product was sent to Bioneer, a company located in South Korea, for purification and sequence determination. It was further examined in the gene bank using the blast method (15-18).

Research Findings

Out of the 14 strains that were isolated from wastewater, strains number 4 and 13 exhibited strong resistance to high selenium concentrations that were added to the culture medium (400 mM). The highest level of absorption for strain number 4 was observed when the biomass level reached 4% within

a 60-minute timeframe, while for strain number 13, it was observed at a biomass level of 4% within 20 minutes. Furthermore, the highest level of absorption for strain number 4 was observed at a pH of 5 within 40 minutes, whereas for strain number 13 it was observed at a pH of 7 within 60 minutes. In terms of the temperature effect, strain number 4 exhibited the highest absorption level at 25 °C after 40 minutes, while strain number 13 displayed the same observation at the same temperature but within 20 minutes. The genetic identification results of the selected strains revealed that strain number 4 is similar to *Bacillus thuringiensis* strain B4 (1), and strain number 13 is similar to *Thalassospira permensis* strain I-A-E-11. Finally, *Thalassospira permensis* demonstrated the highest potential for selenium bioabsorption. It exhibited an absorption rate of 95% for total selenium within a span of 20 minutes while maintaining a biomass level of 4%. These results were achieved at a pH of 6 and a temperature of 25 °C.

Discussion of Results and Conclusions

The identification of various types of microorganisms resistant to heavy metals is crucial in order to utilize them for decontaminating the environment. Researchers are particularly interested in studying different fungi, algae, and bacteria due to their ability to absorb toxic metals. This research focuses on their potential application in removing these metals from the environment, particularly in industrial wastewater, rivers, and polluted sewage. It has been determined that selenium can be present in industrial and mining wastewater up to 2000 µg/L and in copper minerals from 20 to 82 µg/g (11, 19). This study aimed to isolate and identify bacteria that can tolerate high selenium concentrations in order to utilize them for the biological absorption of selenium. In this study, two superior strains, *Bacillus thuringiensis* and *Thalassospira permensis*, were identified using polymerase chain reaction. The second bacterium absorbed 1.95 mg/L of sodium selenite in the environment within 20 minutes, demonstrating a high biological absorption capacity of 4% biomass. Furthermore, the results showed that the highest bioabsorption of selenium occurred in *Thalassospira permensis* when the biomass increased at a temperature of 25 °C (ambient temperature) and a pH of 7. The same increase in biomass to 4% at a similar temperature and a pH of 5 was observed in *Bacillus thuringiensis*. Overall, the results obtained suggest that *Thalassospira permensis* is a recommended option for field studies and effective removal of selenium from the environment.

غربالگری باکتری‌های مؤثر در حذف زیستی سلنیوم از پساب سد باطله مس سرچشمه

سید منصور میبدی* ID: استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران s.m.meybodi@gmail.com

امیر سرابندی حقیقی: کارشناس ارشد گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، سیرجان، ایران amirsinasarabandi@yahoo.com

چکیده:

یکی از نگرانی‌های دنیای امروز آلودگی‌های زیست‌محیطی ناشی از فلزات سنگین است و در این خصوص، عنصر سلنیوم به دلیل مقدار کم در محیط، از اهمیت به‌سزایی برخوردار است. حذف زیستی فلزات یکی از پاک‌ترین و ارزان‌ترین روش‌های جذب زیستی است. هدف از انجام این پژوهش، جداسازی و ارزیابی سویه‌های مقاوم به سلنیوم برای حذف زیستی این فلز از محیط‌های آبی است.

با جداسازی سویه‌های مقاوم به سلنیوم، میزان جذب زیستی انواع منتخب در شرایط مختلف اسیدیته، دما و مقدار توده زیستی در زمان‌های مختلف بررسی شدند. در این بین، دو جدایه به غلظت ۴۰۰ میلی‌مولار سدیم سلنیت مقاوم بودند که پس از انجام آزمون‌های بیوشیمیایی و ژنتیکی شناسایی شدند.

بالاترین میزان جذب از نظر میزان توده زیستی تلقیحی مربوط به *تالازوسپیرا پرمنیسیس* و *باسیلوس تورنجینسیس* در میزان توده ۴ درصد به ترتیب طی ۲۰ و ۶۰ دقیقه بود. بیشترین میزان میانگین جذب توسط *باسیلوس* در اسیدیته ۵ طی ۴۰ دقیقه و برای *تالازوسپیرا* در اسیدیته ۷ و زمان ۶۰ دقیقه صورت گرفت. دمای بهینه برای دو سویه، ۲۵ درجه سانتی‌گراد به دست آمد و مشخص شد در این دما *تالازوسپیرا پرمنیسیس* طی ۲۰ دقیقه و *باسیلوس تورنجینسیس* طی ۴۰ دقیقه بهترین اثر را داشتند. همچنین مشخص شد *تالازوسپیرا پرمنیسیس* با جذب ۹۵/۱ درصد سلنیوم کل با مقدار ۴ درصد توده زیستی در مدت زمان ۲۰ دقیقه، در اسیدیته برابر با ۶ و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بهترین گزینه برای جذب زیستی سلنیوم بود.

تالازوسپیرا پرمنیسیس با جذب ۹۵/۱ میلی‌گرم بر لیتر از مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سدیم سلنیت موجود در محیط طی ۲۰ دقیقه و با بیومس ۴ درصد، از میزان جذب زیستی بالایی برخوردار بود و توانست کاندیدای مناسبی برای مطالعات بعدی حذف سلنیوم از پساب مربوطه باشد.

واژه‌های کلیدی: غربالگری باکتری، جذب زیستی، سلنیوم، پساب سد باطله

* نویسنده مسئول مکاتبات

میبدی، سید منصور، سرابندی حقیقی، امیر. غربالگری باکتری‌های مؤثر در حذف زیستی سلنیوم از پساب سد باطله مس سرچشمه. *زیست‌شناسی میکروبی*.

<http://dx.doi.org/10.22108/BJM.2023.138438.1553>. ۷۵-۵۳:(۴۹) ۱۳، ۱۴۰۳

مقدمه

پیشرفت روزافزون صنایع در دهه‌های اخیر، مهم‌ترین عامل آلودگی محیط زیست محسوب می‌شود. زمانی که پساب‌های آلوده به فلزات سنگین حتی در حد مجاز وارد محیط زیست شوند، با تأثیر از عوامل مختلف فیزیکوشیمیایی و میکروبی متراکم می‌شوند و آب‌های سطحی و زیرزمینی را آلوده و اثرات جبران‌ناپذیری بر محیط زیست وارد می‌کنند. یکی از این فلزات، سلیوم است که تجمع آن در محیط سبب بیماری‌های پوستی، ریزش مو، تغییر شکل ناخن، پوسیدگی دندان‌ها، اختلالات روانی، نکروز کبد و کلیه و مرگ سلولی در انسان می‌شود. همچنین، این عنصر کاربردهای زیادی در زمینه‌های مختلف نظیر الکترونیک، متالورژی^۱، تولید رنگ و شیشه‌سازی دارد. سلیوم عنصر کمیاب اصلی و مورد نیاز است که برای بیشتر ارگانسیم‌ها اهمیت دارد (۱). نقش مکمل سلیوم به‌عنوان مکمل غذایی^۲ یا به‌عنوان مونوترایی در پیشگیری یا درمان بیماری کروناویروس^۳ -۱۹ هدف تحقیقات آزمایش‌های بالینی بوده است. عملکرد ضد کووید-۱۹ سلیوم از توانایی آن در کاهش استرس اکسیداتیو و کاهش بیان گیرنده آنزیم تبدیل‌کننده آنژیوتانسین-۲ ناشی می‌شود (۲).

مشکل وجود سلیوم در پساب سدهای باطله^۵ یکی از عوامل آلودگی محیط زیست توسط فلزات سنگین است که باعث تغییر و تخریب اکوسیستم محیط و هرزرفتن منابع مورد نیاز کمیاب می‌شود. علاوه بر این، مقادیر بیش از حد طبیعی این عنصر، باعث ایجاد ضررهای جبران‌ناپذیر زیستی در موجودات مختلف می‌شود. فلزات سنگین به دلیل پایداری زیاد محیطی و حضور مقادیر بالا در پساب کارخانه‌ها، از مهم‌ترین آلاینده‌های زیستی به شمار می‌روند (۳). فاضلاب‌ها دارای ۶ نوع ماده آلاینده اصلی شامل مواد معلق، مواد

آلی، مواد معدنی، نمک‌های محلول فلزی، باکتری‌ها و ویروس‌ها هستند که اکثر آنها، مانند مواد آلی، تجزیه پذیرند و تنها برخی مانند مواد آلی مصنوعی و فلزات سنگین پایدار هستند و تجزیه آنها بسیار طولانی است. فلزات به سه دسته فلزات سبک، واسطه و شبه‌فلزات تقسیم می‌شوند و سلیوم جزء شبه‌فلزات قرار می‌گیرد (۴). سلیوم به چهار شکل اکسی‌آنیون سلنات، سلنیت، سلنید و عنصر سلنیوم در طبیعت یافت می‌شود که سلنات و سلنیت به‌علت حلالیت بالا در آب، بیشترین دسترسی زیستی و بنابراین بیشترین سمیت را برای سیستم‌های زیستی دارند (۵). به‌طور کلی میکروارگانسیم‌ها به سه روش می‌توانند در تصفیه سنگ معدنی فلزات و استخراج فلزات^۶ از فاضلاب‌ها نقش داشته باشند. آنها با ترشح موادی که موجب انحلال فلزات در آب‌های اطراف می‌شوند، با تبدیل فلز به نمک‌های محلول، فلز را قابل استخراج از محیط می‌کنند. همچنین، این موجودات با جذب سطحی^۷ ذرات فلزی به دیواره خود، فلز را می‌توانند جدا کنند. جذب ذرات فلزی به داخل میکروارگانسیم‌ها و انباشت داخل سلولی آنها، راه سوم حذف این مواد از محیط است. در این روش نیز با ته‌نشین کردن سلول‌ها، فلز را از محلول حاوی آن جدا می‌کنند (۶). نکات مهم در استفاده از میکروارگانسیم‌ها توجه به نیاز آنها است. دمیدن اکسیژن، گاز کربن دی‌اکساید، درجه حرارت مطلوب، افزودن فسفر و نیتروژن به‌صورت آمونیاک و تنظیم اسیدیته مناسب، معمولاً سبب تسریع رشد آنها می‌شود (۴).

روش‌های مختلفی برای حذف فلزات سنگین از فاضلاب‌های آلوده وجود دارد که شامل رسوب شیمیایی، تبخیر، انعقاد / لخته‌سازی، انجماد / تثبیت، استخراج با حلال، استخراج با عوامل شلاتین^۸، تبادل یونی، عملیات غشایی، عملیات الکتروشیمیایی، سیمانی کردن، شیشه‌ای شدن و جذب زیستی هستند (۷).

مواد و روش‌ها:

نمونه‌گیری

نمونه‌گیری طی ماه‌های بهمن و اسفند ۱۳۹۳ و اردیبهشت و خرداد ۱۳۹۴ از ۴ منطقه مختلف سد (در موقعیت ۱۷ کیلومتری شمال‌شرق مجتمع مس سرچشمه)، شامل پساب ورودی سد باطله، آب و رسوبات ته‌نشین‌شده پشت سد، رسوبات خشک و مرطوب قسمت‌های میانی در خلیج‌های عاری از آب و خروجی سد انجام گرفت و در ظروف پلاستیکی تمیز ریخته شدند. نمونه‌ها به اندازه‌ای داخل ظرف ریخته شدند که بخشی از ظرف به‌منظور تسهیل در هم‌زدن نمونه خالی بماند. سپس ظروف نمونه‌ها، نشانه‌گذاری و تاریخ زده شدند و در جعبه حاوی یخ سریعاً به آزمایشگاه منتقل شدند (۱۰).

تهیه رقت از نمونه‌ها و خالص‌سازی کشت

ابتدا نمونه‌های مایع، هم زده و به‌منظور ته‌نشینی رسوبات، در جای ساکن قرار داده شدند. پس از ته‌نشینی، ۱ میلی‌لیتر از نمونه‌های مایع (۱ گرم از نمونه‌های جامد) در لوله آزمایش حاوی ۹ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل برای تهیه رقت‌های متوالی افزوده شد و از رقت‌های ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱، مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر، برداشت و با استفاده از میله شیشه‌ای در محیط کشت لوریا برتانی آگار^۹ حاوی ۱۰ میلی‌گرم برلیتر سدیم سلنیت کشت سطحی شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در ادامه، از پرکنه‌های حاصل در محیط مذکور کشت خالص تهیه شد (۱).

در جذب زیستی، دیواره سلولی میکروارگانیسم‌ها حاوی مقادیر زیادی پلی‌ساکراید و پروتئین است و محل‌های فعال برای جذب فلزات دارد. ساختار دیواره سلولی میکروارگانیسم‌ها متفاوت است و بدین ترتیب، پتانسیل‌های متفاوتی در جذب فلزات سنگین دارند (۸). وجود آبراه‌ها و نفوذ آنها به آب‌های زیرزمینی و بافت خاک باعث آسیب‌رساندن به اکوسیستم و هدررفت سرمایه ملی می‌شود. سد باطله مس سرچشمه به‌منظور ذخیره باطله واحد تغلیظ و استفاده مجدد از آب آن احداث شده است. از جمله ورودی‌های این دریاچه، رودخانه شور است که سرچشمه آن زهاب اسیدی معدن است و در بین راه، یک‌سری فاضلاب‌های مجتمع و آب تعدادی چشمه نیز به آن اضافه می‌شود. رسوبات، ترکیبات گوناگونی از انواع کانی‌ها و ذرات آلی هستند که سهم مهمی در تشخیص الگوهای آلودگی سامانه‌های آبی دارند. این مواد، هم حمل‌کننده و هم مخزنی برای آلاینده‌ها محسوب می‌شوند. فلزات سنگین تخلیه‌شده به داخل سدهای باطله ناشی از تأثیر فرایندهای طبیعی و کارخانه‌های تغلیظ است. پساب‌های کارخانه فناوری، عناصر سمی زیادی را با خود به داخل سد باطله حمل می‌کنند و در صورتی که سدهای باطله پایداری لازم را در طراحی نداشته باشند، باعث نفوذ عناصر سمی به داخل آب‌های زیرزمینی می‌شوند (۹). برای جلوگیری از مشکلات سلینیوم در سد باطله و کمک به افزایش میزان سلینیوم استفاده‌شده در کارخانه، از روش‌های کم‌هزینه مانند استفاده از میکروارگانیسم‌های بومی جاذب سلینیوم موجود در پساب و سد باطله می‌توان استفاده کرد. هدف از انجام این مطالعه، جداسازی و غربالگری باکتری‌های مقاوم به سلینیوم از پساب سد باطله مس سرچشمه و ارزیابی حذف آن از پساب مجتمع مس سرچشمه با سویه‌های مقاوم و شناسایی ژنتیکی سویه برتر در حذف این شبه‌فلز بود.

حداقل غلظت ممانعت‌کننده^{۱۰} از رشد باکتری

برای سلنیوم

سویه‌های خالص در محیط کشت لوریا برتانی آگار حاوی ۱۰۰ تا ۵۰۰ میلی‌مولار سدیم سلنیت برای تعیین میزان مقاومت سویه‌ها، استفاده و پس از کشت، به مدت ۲۴ ساعت در ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند (۱).

تولید توده زیستی^{۱۱}

نمونه‌هایی که بیشترین مقاومت را در آزمون حداقل غلظت ممانعت‌کننده (MIC) از رشد داشتند، برای تولید توده زیستی جداسازی شدند و در ۵ میلی‌لیتر محیط کشت لوریا برتانی برآث، کشت و ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از این مدت، در صورت مشاهده کدورت، ۵ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی باکتری به ۴۵ میلی‌لیتر محیط کشت ذکر شده، اضافه و به مدت ۵ الی ۶ روز در گرمخانه هم‌زن‌دار با دور ۱۲۰ دور بر دقیقه قرار داده شد. پس از این مدت برای تولید توده زیستی بیشتر، ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی باکتری به ۴۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت لوریا برتانی برآث افزوده شد (۱۱).

خشک‌کردن در انجماد

به‌منظور نگهداری توده زیستی و برای خشک‌کردن آن برای ماندگاری بیشتر، از روش انجماد در خلأ استفاده شد. ابتدا برای جداسازی محیط کشت از توده زیستی، نمونه‌های غنی‌شده به مدت ۲۰ دقیقه با ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس مایع رویی، جدا و رسوب باکتریایی استفاده شد. به‌منظور خلوص رسوب باکتریایی، بخش ته‌نشین شده به همراه سرم فیزیولوژی استریل به مدت ۵ دقیقه با ۵۰۰۰ دور بر دقیقه، سانتریفیوژ و محلول رویی دور ریخته شد. سپس توده

زیستی جدا شده برای خشک‌شدن نمونه باکتریایی، به مدت ۱۰ الی ۲۴ ساعت در دستگاه خشک‌کن انجمادی^{۱۲} قرار گرفت (۱۱).

جذب توسط توده زیستی و اثر عوامل میزان توده تلقیحی، اسیدیته و دما بر آن

برای مشاهده میزان جذب سلنیوم توسط توده زیستی تولیدشده، آزمایشی طراحی شد و میزان جذب آن در محلول ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سلنیوم در شرایط مختلف دمایی، اسیدیته و مقدار توده تلقیحی، در مدت زمان‌های مشخص بررسی شد. برای بررسی اثر میزان توده تلقیحی بر جذب سلنیوم، به لوله‌های محتوی محلول حاوی فلز، با استفاده از ترازوی دیجیتال مقدار ۱، ۲ و ۴ درصد از توده زیستی، اضافه و به مدت ۲۰، ۴۰ و ۶۰ دقیقه نگهداری شدند. سپس محلول‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور بر دقیقه، سانتریفیوژ و محلول رویی برای بررسی میزان سلنیوم باقی‌مانده، به لوله‌های تمیز منتقل شدند. درب لوله‌ها توسط پارافیل، بسته و سپس در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد یخچال‌گذاری شد (۱۱). برای بررسی اثر اسیدیته بر میزان جذب توده زیستی، این عامل در ۳، ۵، ۶ و ۷ ارزیابی شد. تنظیم اسیدیته محلول بعد از افزودن به نسبت مساوی از توده زیستی، انجام و در مدت زمان‌های ۲۰، ۴۰ و ۶۰ دقیقه نگهداری شد و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور بر دقیقه، سانتریفیوژ و فاز مایع برای مرحله بعد همانند آزمون قبلی نگهداری شد (۱۱). برای بررسی اثر دما، لوله‌های حاوی محلول سدیم سلنیت درون بن‌ماری ۲۵، ۳۰ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و بعد از یکسان‌شدن دمای محلول با دمای بن‌ماری، میزان مساوی از توده زیستی به درون لوله‌ها اضافه شد و در مدت ۲۰، ۴۰ و ۶۰ دقیقه

باقی ماند. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور بر دقیقه، سانتریفیوژ و برای استفاده بعدی درون لوله‌های تمیز و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۲).

بررسی میزان سلیوم حذف‌شده

برای بررسی میزان سلیوم حذف‌شده توسط توده زیستی، از دستگاه اسپکتروسکوپی جذب اتمی^{۱۳} به روش شعله استفاده شد. این روش میزان سلیوم کل باقی‌مانده در محلول را اندازه‌گیری می‌کند. برای انجام این عملیات، ابتدا محلول‌ها توسط صافی سر سرنگی ۰/۲ میکرومتر صاف شدند و سپس از مایع حاصل شده جذب اتمی در طول موج ۲۲۰ نانومتر به دست آمد (۱۲).

آزمون‌های بیوشیمیایی

آزمون‌های بیوشیمیایی (کاتالاز، اوره‌از، اکسیداز، حرکت، اندول‌زایی، تولید هیدروژن سولفور و تخمیر قندها)، رنگ‌آمیزی گرم (برای مشاهده نوع باکتری و شکل و وجود اسپور)، تحمل بیشترین غلظت نمک و تحمل دمایی برای شناسایی اولیه سویه‌هایی انجام شدند که بیشترین جذب را داشتند (۱۳، ۱۴).

آزمون شناسایی ژنتیکی

برای شناسایی دقیق جنس و گونه سویه‌های منتخب، آزمون ژنتیکی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز با تکثیر ژن *I6S rRNA* انجام شد. بدین منظور برای استخراج DNA، باکتری‌ها در ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت CG^{۱۴}، تلقیح و به مدت ۵ تا ۷ روز در شیکر انکوباتور (دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد ۱۲۰ دور بر دقیقه) نگهداری شدند. بعد از رشد باکتری و اطمینان از آلوده‌نبودن آن، پرگنه‌های باکتری در میکروتیوب‌های ۲ میلی‌لیتری در

۶۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۲ دقیقه رسوب داده شد. ۵۰۰ میکرولیتر از بافر تریس اتیلن دی‌آمین تتراستیک اسید^{۱۵} به علاوه ۱۵ میکرولیتر آنزیم لیزوزیم به رسوب، اضافه و پس از ورتکس شدید به مدت ۲ تا ۳ دقیقه به مدت یک ساعت در ۵۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. ۵۰ میکرولیتر سدیم دودسیل سولفات^{۱۶} (۱۰ درصد) و ۱۰ میکرولیتر پروتیناز K (کراتین) (۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به رسوب اضافه شدند و برای ۱۰ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. ۲۰۰ میکرولیتر سدیم کلراید ۵ مولار به لوله، افزوده و پس از ورتکس به مدت ۳۰ ثانیه، مقدار ۱۵۰ میکرولیتر بافر ستیل تری‌متیل آمونیوم بروماید / سدیم کلراید^{۱۷} اضافه شد و به آرامی و با سر و ته کردن تیوب، مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از سرد شدن محلول تا دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای جداسازی مولکول‌های پروتئینی از عصاره، هم حجم محلول فوق، کلروفرم / ایزوآمیل الکل (۲۴ به ۱) اضافه شد و ۱۰ تا ۱۵ دقیقه با سر و ته کردن تیوب، مخلوط و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد (این مرحله برای فاز رویی حاصل، برای خروج کامل آلودگی‌های پروتئینی تکرار شد). فاز رویی به یک تیوب جدید منتقل شد و ۰/۸ حجم آن، ایزوپروپانول سرد (۲۰- درجه سانتی‌گراد)، افزوده و با سر و ته کردن تیوب کلایف سفید رنگ DNA تشکیل شد. لوله‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس در صورت غلیظ‌بودن نمونه، DNA کلایف تشکیل شده توسط لوله دهان‌گشاد استریل به لوله جدید حاوی اتانول ۷۰ درصد، منتقل و پس از شستشو به مدت ۱۰۱ دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور بر دقیقه و در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد و در نهایت، DNA خالص به

دست آمد. با محاسبه نسبت میزان جذب نمونه در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر که حد مطلوب آن ۱/۸ است، براساس میزان جذب نمونه در طول موج ۲۶۰ و مشخصات آنها در [جدول ۱](#) ارائه شده‌اند.

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای به کاررفته در پژوهش

Table 1- Specifications of the primers utilized in the study

نام پرایمر	توالی پرایمر	اندازه قطعه	منبع
27F	AGAGTTTGGATCMTGGCTCAG	۱۵۰۰ جفت باز	(۱۶)
1492R	GGTACCTTGTTACGACTT	۱۵۰۰ جفت باز	(۱۶)

ژن *16S rRNA* باکتری جداشده با استفاده از برنامه دمایی ارائه شده در [جدول ۲](#) تکثیر شد (۱۵).

جدول ۲- برنامه دمایی تکثیر

Table 2- Temperature program of reproduction

مرحله	زمان (ثانیه)	دما (درجه سانتی‌گراد)	دوره
تقلیب ابتدایی	۱۸۰	۹۴	-
تقلیب	۶۰	۹۴	۲۵ چرخه
جفت شدن	۴۵	۵۵	-
بسط	۹۰	۷۲	-
بسط نهایی	۳۰۰	۷۲	-

این واکنش در میکروتیوب‌های ۰/۲ میلی‌لیتری و با استفاده از مقادیر مندرج در [جدول ۳](#) انجام شد. کنترل منفی نیز مطابق همین دستورالعمل تهیه شد؛ با این تفاوت

جدول ۳- مقادیر معرف‌های به کاررفته در PCR

Table 3- Values of reagents used in PCR

غلظت نهایی	حجم (میکرولیتر)	اجزا
1X	۵	بافر (10X) PCR
۲۰۰ میکرومول	۱	دزوکسی ریبونوکلوئید تری فسفات (۱۰ میلی‌مول)
۱ میکرومول	۵	پرایمر فوروارد (۱۰ میکرومول)
۱ میکرومول	۵	پرایمر ریورس (۱۰ میکرومول)
۵ واحد بر ۱۰۰ میکرولیتر	۰/۵	آنزیم تک پلیمراز (۵ واحد بر میکرولیتر)
۱/۵ میلی‌مولار	۱/۵	محلول ۵۰ میلی‌مولار منیزیم کلراید
-	۲۲	آب مقطر سترون
-	۱۰	DNA الگو
-	۵۰	کل

پس از پایان واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، محصول آن

الکتروفورز و بررسی محصولات

گرفت و ضمن مشاهده باندها در مقایسه با لدر، با دوربین مخصوص عکس گرفته و ذخیره‌سازی انجام شد (۱۷).

تعیین توالی نوکلئوتیدی^{۲۲} و بیوانفورماتیک

بعد از انجام الکتروفورز و مشاهده نوار مربوط به قطعه تکثیرشده، محصول PCR برای تخلیص و تعیین توالی به همراه پرایمرهای پیشرو به شرکت بیونیر^{۲۳} کره جنوبی با واسطه شرکت تکاپو زیست (تهران، ایران) ارسال شد تا توالی‌های محصولات مشخص و تأیید شوند. معمولاً تعیین توالی به شیوه یک طرفه و با استفاده از یکی از پرایمرهای پیشرو یا برگشتی انجام می‌شود. در تحقیق حاضر از نرم‌افزار کروماس^{۲۴} نسخه ۳-۲-۴ استفاده شد. در نهایت، توالی به دست آمده در مقابل داده‌های توالی نوکلئوتیدهای موجود در بانک ژن به شیوه بلاست بررسی شد (۱۸).

نتایج:

پس از بررسی ماکروسکوپی کلنی‌ها از لحاظ رنگ، شکل، قوام و اندازه، سویه‌های مدنظر، جدا و برای تعیین مقاومت آنها نسبت به غلظت‌های بالای سلنیوم بررسی شدند. از ۱۴ سویه جدا شده از پساب‌ها ۲ سویه شماره ۴ و ۱۳ مقاومت خوبی نسبت به غلظت بالای سلنیوم اضافه شده به محیط کشت (۴۰۰ میلی مولار) نشان دادند. این دو نمونه برای تولید توده زیستی برای استفاده در آزمون جذب زیستی سلنیوم انتخاب و استفاده شدند. نتایج مربوط به حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد در جدول ۴ آورده شده‌اند.

توسط ژل آگارز ۱ درصد با استفاده از محلول بافری IX TAE Buffer (Tris-acetate-EDTA) در دمای اتاق الکتروفورز شد. برای تهیه ژل و انجام الکتروفورز، ۱ گرم پودر آگارز، توزین و با ۱۰۰ میلی لیتر بافر مخلوط شد. مخلوط حاصل به صورتی حرارت داده شد که از جوشیدن آن جلوگیری شود و همه کریستال‌های آگارز کاملاً حل شوند. با رسیدن محلول به دمای حدود ۵۰ درجه سانتی‌گراد، به آن ۲/۵ میکرولیتر اتیدیدوم بروماید^{۱۸}، افزوده و به آرامی مخلوط شد. محلول فوق درحالی که هنوز منجمد نشده است، داخل قالب الکتروفورز با شانه مناسب منتقل شد. بعد از انعقاد ژل، شانه به آرامی، خارج و سپس روی آن بافر TAE (IX) اضافه شد؛ به طوری که کمی روی سطح ژل پوشیده شد. سپس محصول PCR به نسبت ۶ به ۱ با لودینگ بافر^{۱۹} مخلوط شد. پس از قرار دادن نمونه‌ها و شاهد در داخل چاهک‌ها، مقدار ۴ میکرولیتر نشان‌گر به داخل چاهک اول منتقل شد. مارکر استفاده شده در این تحقیق نردبان^{۲۰} DNA ساخت شرکت سیناکلون با فاصله ۱۰۰ جفت‌باز از وزن ۱۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت‌باز بود. سپس ظرف محتوی ژل به صورتی درون تانک الکتروفورز قرار داده شد که چاهک‌ها در طرف قطب منفی تانک قرار گیرند. تانک به جریان الکتریسیته، متصل و ولتاژ روی ۱۰۰ تا ۱۱۰ تنظیم شد. پس از ۴۰ دقیقه، ژل، بررسی و از میزان رنگی که در ژل پیشروی کرده است، زمان پایان الکتروفورز تخمین زده شد. پس از پایان الکتروفورز، ژل از بافر خارج شد و در دستگاه مستندسازی ژل^{۲۱} قرار

جدول ۴- آزمون حداقل غلظت ممانعت‌کننده رشد باکتری‌ها در رقت‌های ۱۰۰ تا ۵۰۰ میلی‌مولار سدیم‌سلینیت
 Table 4- Test of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of bacterial growth in sodium selenite dilutions ranging from 100 to 500 mM

غلظت سلینیوم (میلی‌مولار)					شماره سویه
۵۰۰	۴۰۰	۳۰۰	۲۰۰	۱۰۰	
-	-	-	-	+	۱
-	-	-	-	+	۲
-	-	-	-	+	۳
-	+	+	+	+	۴
-	-	-	-	+	۵
-	-	-	-	+	۶
-	-	-	-	+	۷
-	-	-	-	+	۸
-	-	-	-	+	۹
-	-	-	-	-	۱۰
-	-	+	+	+	۱۱
-	-	+	+	+	۱۲
-	+	+	+	+	۱۳
-	-	+	+	+	۱۴

محلول حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سدیم‌سلینیت) نشان داد که در [جدول ۵](#) ارائه شده‌اند.

نتایج حاصل از آزمون‌های جذب فلز با آنالیز جذب اتمی، تغییر میزان جذب سلینیوم را (با به کارگیری مقادیر مختلف توده زیستی تلقیحی سویه‌های منتخب در

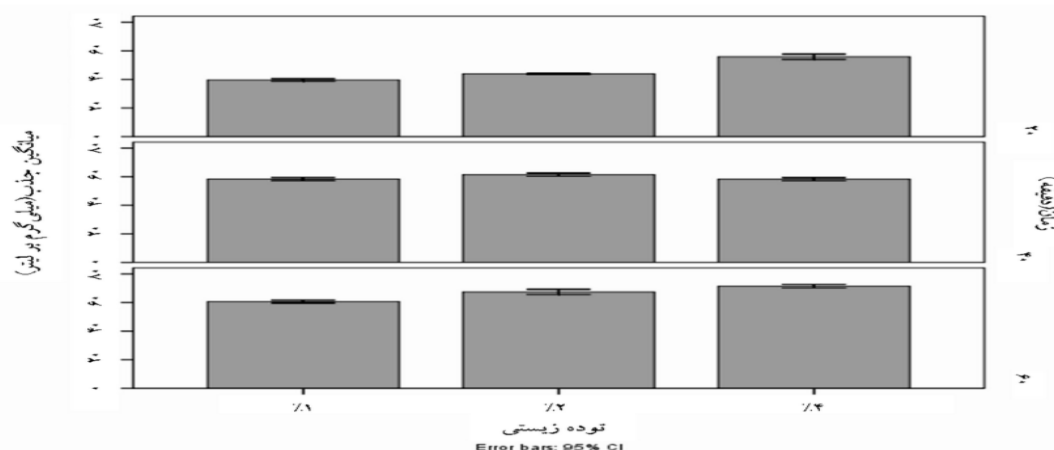
جدول ۵- تغییرات حاصل از اضافه کردن مقادیر ۱، ۲ و ۴ درصد بیوماس باکتری به محلول حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سدیم‌سلینیت

Table 5- Changes resulting from adding 1, 2 and 4% of bacterial biomass to a solution containing 100 mg/L of sodium selenite

میزان جذب سلینیوم جدایه شماره ۱۳ (میلی‌گرم بر لیتر)	میزان جذب سلینیوم جدایه شماره ۴ (میلی‌گرم بر لیتر)	زمان (دقیقه)	میزان توده زیستی تلقیحی (%)
۷۵/۳	۳۹/۶	۲۰	۱
۷۲/۹	۵۸/۸	۴۰	۱
۶۵/۷	۶۰/۹	۶۰	۱
۷۶/۸	۴۳/۹	۲۰	۲
۶۱/۵	۶۱/۵	۴۰	۲
۷۵/۶	۶۷/۸	۶۰	۲
۹۵/۱	۵۶/۱	۲۰	۴
۵۱/۹	۵۸/۲	۴۰	۴
۷۵	۷۱/۴	۶۰	۴

آزمون تحلیل تک متغیره واریانس^{۲۵} انجام شد و نشان داد عوامل توده زیستی، زمان و اثر متقابل آنها در $P < 0.05$ اثر معنی‌داری بر جذب سلنیوم از محیط مایع توسط سویه شماره ۴ دارد (شکل ۱).

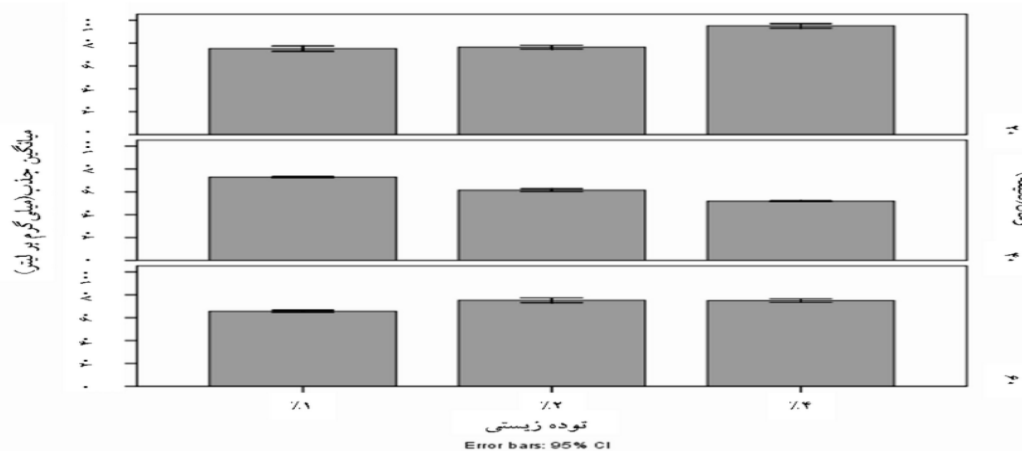
همان‌طور که مشاهده می‌شود بالاترین میزان جذب برای سویه شماره ۴ در میزان توده زیستی ۴ درصد در مدت ۶۰ دقیقه و برای سویه شماره ۱۳ در میزان توده زیستی ۴ درصد در مدت ۲۰ دقیقه مشاهده شد. برای بررسی معنی‌داری اثر بیومس و زمان در جدایه ۴ یک



شکل ۱- میانگین میزان جذب سلنیوم توسط سویه شماره ۴ در سه سطح توده زیستی و سه سطح زمان ۲۰، ۴۰ و ۶۰ دقیقه
 Fig 1- The average amount of selenium absorption by strain number 4 at three biomass levels and three time levels of 20, 40, and 60 minutes

معنی‌داری اثر بیومس و زمان در جدایه ۱۳ یک آزمون تحلیل تک متغیره واریانس انجام شد و نشان داد عوامل توده زیستی، زمان و اثر متقابل آنها در $P < 0.05$ اثر معنی‌داری بر جذب سلنیوم از محیط مایع توسط سویه شماره ۱۳ داشت (شکل ۲).

برای بررسی بهترین حالت اثر عوامل توده زیستی و زمان در جذب سلنیوم توسط سویه شماره ۴، یک آزمون دانکن^{۲۶} انجام شد و نتایج نشان دادند در میزان توده سلولی ۴ درصد و زمان ۶۰ دقیقه بیشترین میزان میانگین جذب در آزمون‌ها وجود داشت. برای بررسی



شکل ۲- میانگین میزان جذب سلنیوم توسط سویه شماره ۱۳ در سه سطح توده زیستی و سه سطح زمان ۲۰، ۴۰ و ۶۰ دقیقه
 Fig 2- The average amount of selenium absorption by strain number 13 at three biomass levels and three time levels of 20, 40, and 60 minutes

میانگین جذب در آزمون‌ها وجود داشت. تغییر در میزان جذب سلنیوم در مقادیر مختلف اسیدیته برای دو سویه منتخب در محلول حاوی ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر سدیم سلنیت در جدول ۶ ارائه شده است.

برای بررسی بهترین حالت اثر عوامل توده زیستی و زمان در جذب سلنیوم توسط سویه شماره ۱۳، یک آزمون دانکن انجام شد و نتایج نشان دادند در میزان توده سلولی ۴ درصد و زمان ۲۰ دقیقه بیشترین میزان

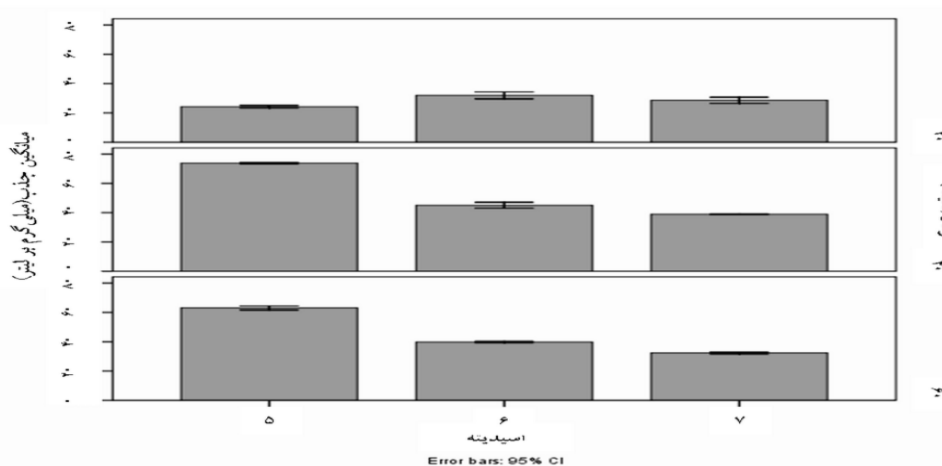
جدول ۶- نتایج حاصل از جذب زیستی بیوماس در pH برابر با ۵، ۶ و ۷، محلول حاوی ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر سدیم سلنیت

Table 6- The results of biosorption of biomass at pH levels of 5, 6, and 7 in a solution containing 100 mg/L of sodium selenite

میزان جذب سلنیوم جدایه شماره ۱۳ (میلی گرم بر لیتر)	میزان جذب سلنیوم جدایه شماره ۴ (میلی گرم بر لیتر)	زمان (دقیقه)	اسیدیته
۵/۴	۲۴/۳	۲۰	۵
۷/۸	۷۳/۸	۴۰	۵
۶/۳	۶۳	۶۰	۵
۲۵	۳۲	۲۰	۶
۳۴/۶	۴۵	۴۰	۶
۴۶/۸	۳۹/۸	۶۰	۶
۳۴	۲۸/۴	۲۰	۷
۴۰/۴	۳۸/۸	۴۰	۷
۴۸/۴	۳۲	۶۰	۷

در جدایه ۴ یک آزمون تحلیل تک متغیره واریانس انجام شد و نشان داد عوامل اسیدیته، زمان و اثر متقابل آنها در $P < 0.05$ اثر معنی داری بر جذب سلنیوم از محیط مایع توسط سویه شماره ۴ داشت (شکل ۳).

همان طور که مشاهده می شود بالاترین میزان جذب برای سویه شماره ۴ در اسیدیته ۵ در مدت ۴۰ دقیقه و برای سویه شماره ۱۳ در اسیدیته ۷ در مدت ۶۰ دقیقه مشاهده شد. برای بررسی معنی داری اثر اسیدیته و زمان

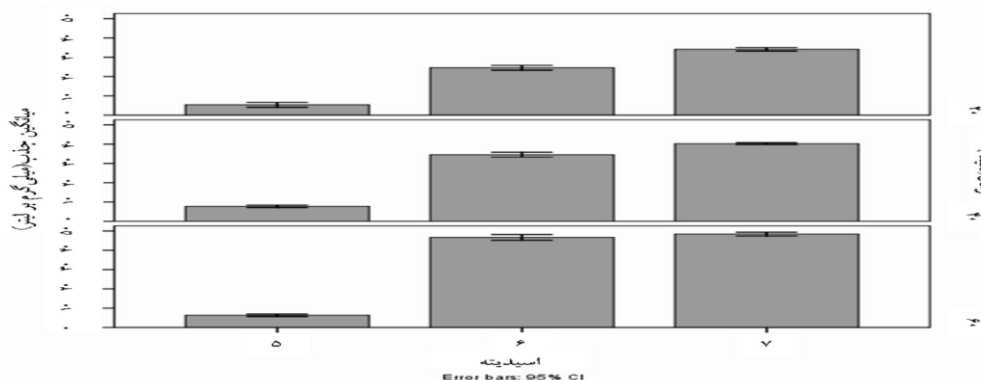


شکل ۳- میانگین میزان جذب سلنیوم توسط سویه شماره ۴ در سه سطح اسیدیته و سه سطح زمان ۲۰، ۴۰ و ۶۰ دقیقه

Fig 3- The average amount of selenium absorption by strain number 4 at three levels of acidity and three different time intervals of 20, 40, and 60 minutes

در جدایه ۱۳ یک آزمون تحلیل تک متغیره واریانس انجام شد و نشان داد عوامل اسیدیته، زمان و اثر متقابل آنها در $P < 0.05$ اثر معنی‌داری بر جذب سلنیوم از محیط مایع توسط سویه شماره ۱۳ داشت (شکل ۴).

برای بررسی بهترین حالت اثر عوامل اسیدیته و زمان در جذب سلنیوم توسط سویه شماره ۴، یک آزمون دانکن انجام شد و نتایج نشان دادند در اسیدیته ۵ و زمان ۴۰ دقیقه بیشترین میزان میانگین جذب در آزمون‌ها وجود داشت. برای بررسی معنی‌داری اثر اسیدیته و زمان



شکل ۴- میانگین میزان جذب سلنیوم توسط سویه شماره ۱۳ در سه سطح اسیدیته و سه سطح زمان ۲۰، ۴۰ و ۶۰ دقیقه

Fig 4- The average amount of selenium absorption by strain number 13 at three levels of acidity and three different time intervals of 20, 40, and 60 minutes

تغییر در میزان جذب سلنیوم در مقادیر مختلف دما برای دو سویه منتخب در محلول حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سدیم سلنیت در جدول ۷ ارائه شده است.

برای بررسی بهترین حالت اثر عوامل اسیدیته و زمان در جذب سلنیوم توسط سویه شماره ۱۳، یک آزمون دانکن انجام شد و نتایج نشان دادند در اسیدیته ۷ و زمان ۶۰ دقیقه بیشترین میزان میانگین جذب در آزمون‌ها وجود داشت.

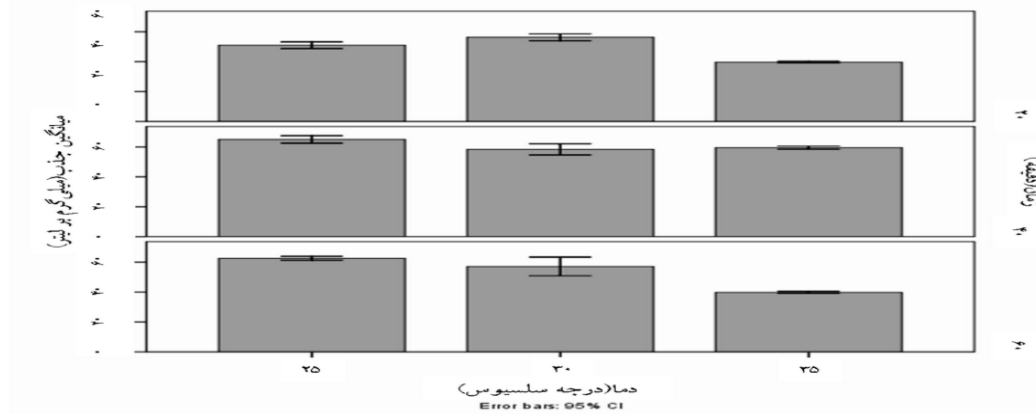
جدول ۷- نتایج جذب زیستی سلنیوم در دمای ۲۵، ۳۰ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد در محلول ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سدیم سلنیت از دو جدایه مدنظر

Table 7- Selenium biosorption results at 25, 30, and 35 °C in a 100 mg/L sodium selenite solution from the two isolates under consideration

میزان جذب سلنیوم جدایه شماره ۱۳ (میلی‌گرم بر لیتر)	میزان جذب سلنیوم جدایه شماره ۴ (میلی‌گرم بر لیتر)	زمان (دقیقه)	دما (سانتی‌گراد)
۸۵/۸	۵۱/۱	۲۰	۲۵
۶۴/۸	۶۶	۴۰	۲۵
۵۱/۹	۶۲/۷	۶۰	۲۵
۴۵	۵۶/۷	۲۰	۳۰
۴۵/۹	۵۸/۲	۴۰	۳۰
۱۵/۶	۵۵/۸	۶۰	۳۰
۶۲/۱	۳۹/۶	۲۰	۳۵
۳۲/۷	۵۹/۴	۴۰	۳۵
۸/۱	۳۹/۹	۶۰	۳۵

متغیره واریانس انجام شد و نتایج نشان دادند عوامل دما، زمان و اثر متقابل آنها در $P < 0.05$ اثر معنی‌داری بر جذب سلینیوم از محیط مایع توسط سویه شماره 4 داشت (شکل 5).

همان‌طور که مشاهده می‌شود بالاترین میزان جذب برای سویه شماره 4 در دمای 25 درجه سانتی‌گراد در مدت 40 دقیقه و برای سویه شماره 13 نیز در همین دما در مدت 20 دقیقه مشاهده شد. برای بررسی معنی‌داری اثر دما و زمان در جدایه 4 یک آزمون تحلیل تک

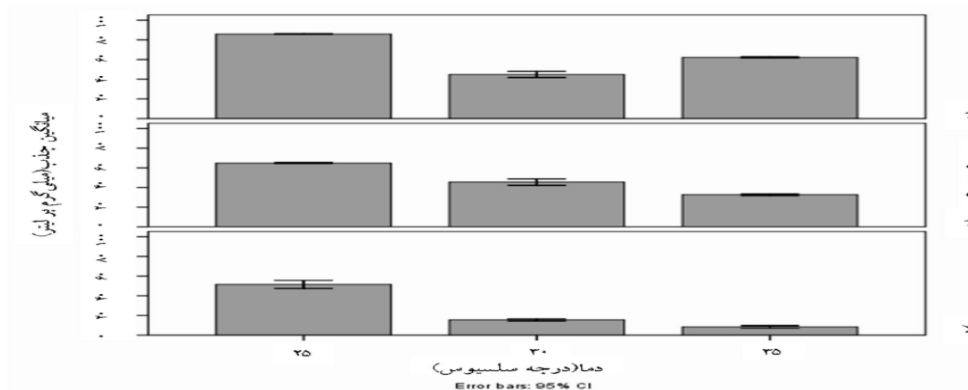


شکل 5- میانگین میزان جذب سلینیوم توسط سویه شماره 4 در سه سطح دما و سه سطح زمان 20، 40 و 60 دقیقه

Fig 5- The average amount of selenium absorption by strain number 4 at three temperature levels and three time levels of 20, 40, and 60 minutes

جدایه 13 یک آزمون تحلیل تک متغیره واریانس انجام شد و نتایج نشان دادند عوامل دما، زمان و اثر متقابل آنها در $P < 0.05$ اثر معنی‌داری بر جذب سلینیوم از محیط مایع توسط سویه شماره 13 داشت (شکل 6).

برای بررسی بهترین حالت اثر عوامل دما و زمان در جذب سلینیوم توسط سویه شماره 4، یک آزمون دانکن انجام شد و نتایج نشان دادند در دمای 25 و زمان 40 دقیقه بیشترین میزان میانگین جذب در آزمون‌ها وجود داشته است. برای بررسی معنی‌داری اثر دما و زمان در



شکل 6- میانگین میزان جذب سلینیوم توسط سویه شماره 13 در سه سطح دما و سه سطح زمان 20، 40 و 60 دقیقه

Fig 6- The average amount of selenium absorption by strain number 13 at three temperature levels and three time levels of 20, 40, and 60 minutes

جذب در آزمون‌ها وجود داشت. نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی برای تعیین جنس و گونه دو سویه برتر در [جدول ۸](#) مشاهده می‌شود.

برای بررسی بهترین حالت اثر عوامل دما و زمان در جذب سلنیوم توسط سویه شماره ۱۳، یک آزمون دانکن انجام شد و نتایج نشان دادند در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و زمان ۲۰ دقیقه بیشترین میزان میانگین

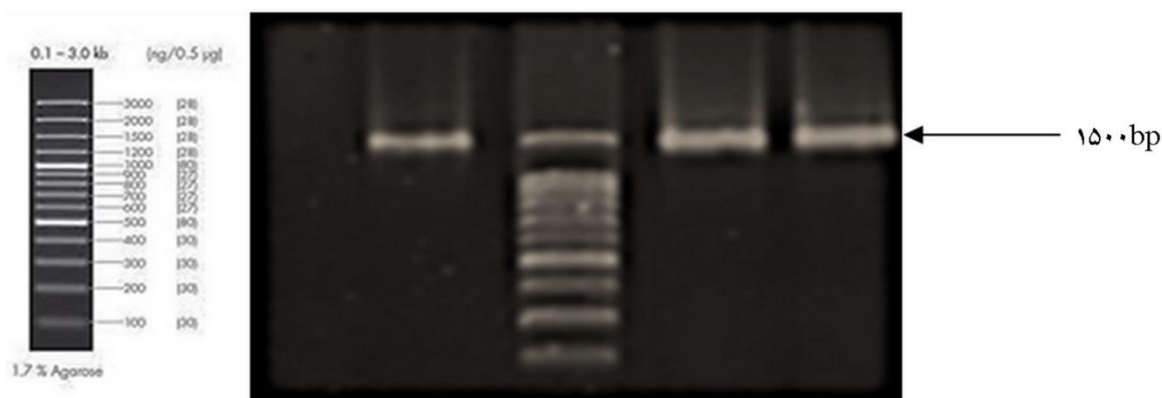
جدول ۸- نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی برای تعیین جنس و گونه دو سویه برتر

Table 8- Results of biochemical tests to determine the genus and species of the top two strains

سویه ۱۳	سویه ۴	صفت
میله‌ای رشته‌ای	میله‌ای	شکل
منفی	مثبت	واکنش گرم
+	+	کاتالاز
+	+	اکسیداز
-	+	اوره آز
+	+	اسپورزایی
-	-	اندول
+	+	حرکت
-	-	سولفید هیدروژن
٪۵	٪۵	تحمل نمک
۴۰-۱۰ درجه سانتی‌گراد	۴۱-۲۵ سانتی‌گراد	گستره دمایی رشد
۳۰-۲۸ درجه سانتی‌گراد	۳۰ سانتی‌گراد	دمای بهینه

rDNA با استفاده از پرایمرهای 27F و 1492R تکثیر شد. تصویر ژل آگارز حاصل از تکثیر ژن *16S rDNA* سویه‌های مدنظر در [شکل ۷](#) آورده شده است.

نتایج شناسایی میکروارگانسیم به کمک واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز به روش تعیین توادف *16S rDNA* در مرحله نخست بخش عمده‌ای از توالی ژن *16S*

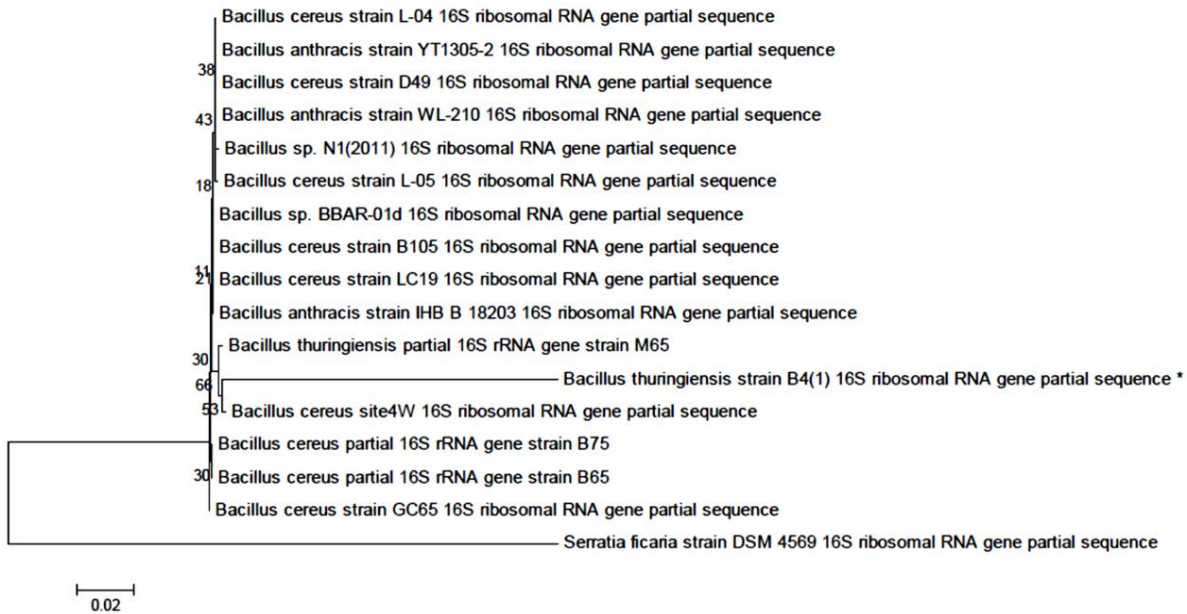


شکل ۷- راست: ژل آگارز حاصل از تکثیر ژن *16S rDNA* سویه‌های مدنظر، از سمت راست به ترتیب جدایه ۱، جدایه ۲، مارکر، کنترل مثبت، کنترل منفی، چپ: لدر به کاررفته

Fig 7- Right: Agarose gel showing the amplification of the *16S rDNA* gene from the strains considered. From right to left: Isolate 1, Isolate 2, Marker, Positive Control, and Negative Control. Left: Ladder used

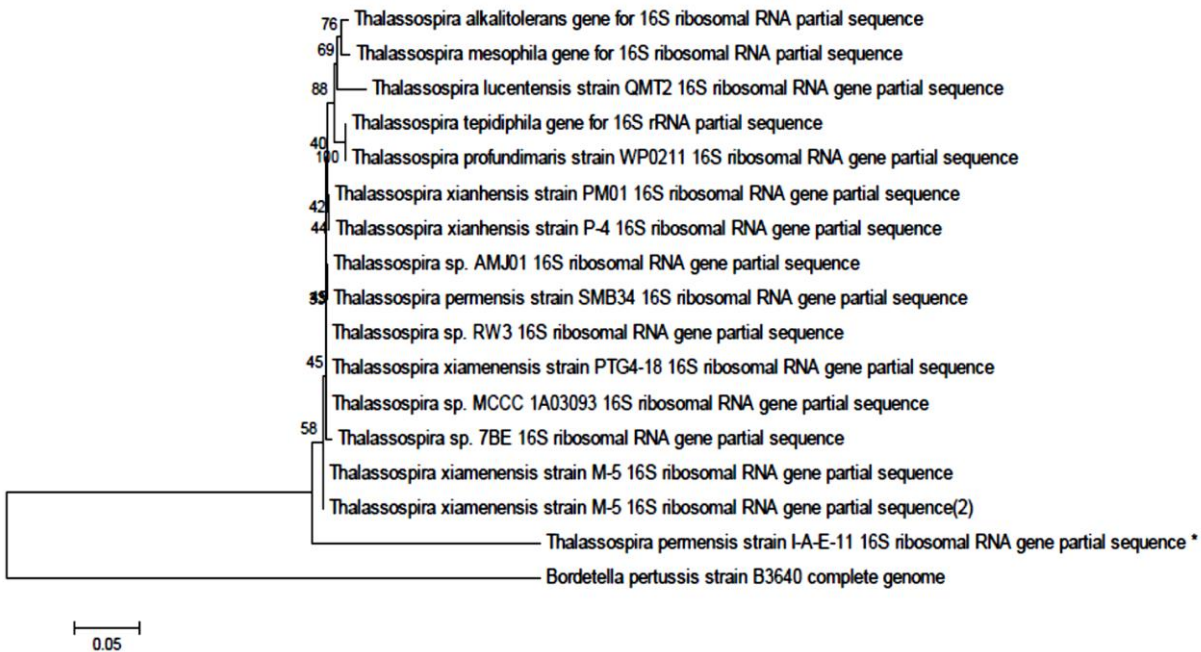
درخت‌های فیلوژنتیک^{۲۸} با روش اتصال همسایه^{۲۹} (NJ) در شکل‌های ۸ و ۹ مشاهده می‌شوند.

ژن‌های تکثیر شده سپس تعیین توالی شدند و نتایج مقایسه این توالی با توالی‌های موجود در بانک اطلاعاتی مرکز ملی برای اطلاعات بیوتکنولوژی^{۲۷} به صورت



شکل ۸- درخت فیلوژنتیک مربوط به سویه باسیلوس تورنجینسیس

Fig 8- Phylogenetic tree related to *Bacillus thuringiensis*



شکل ۹- درخت فیلوژنتیک مربوط به سویه تالازوسپیرا پرمنسیس

Fig 9- Phylogenetic tree related to *Thalassospira permensis*

بحث:

قدم اول در شناسایی میکروارگانیسم‌هایی که قادر به پاکسازی محیط زیست هستند، توانایی شناسایی انواع مقاوم به فلزات سنگین است که می‌تواند در انتخاب سویه‌های برتر برای حذف این ترکیبات سمی راه‌گشا باشد. توانایی جذب فلزات سنگین و سمی توسط میکروارگانیسم‌ها منجر به توجه خاص محققان به مطالعه انواع قارچ‌ها، مخمرها، جلبک‌ها و باکتری‌های مختلف برای جذب و به‌دنبال آن حذف آنها از محیط زیست و به‌خصوص پساب‌های کارخانه‌های صنعتی، رودخانه‌ها و فاضلاب‌های آلوده به این گونه فلزات شده است (۱۱). مشخص شده است سلنیوم در پساب صنایع و معادن مس تا ۲۰۰۰ میکروگرم بر لیتر و در کانی مس ۲۰ تا ۸۲ میکروگرم بر گرم می‌تواند وجود داشته باشد (۱۹). در این تحقیق سعی بر آن شد تا با جداسازی و شناسایی باکتری‌هایی که دارای توانایی تحمل غلظت‌های بالای سلنیوم هستند، آنها را در جذب زیستی این عنصر به کار گرفت. مایرز^{۳۰} و همکاران (۱۹۹۸) با جداسازی باکتری‌ها از یک محیط غنی از سلنیوم چنین رویه‌ای را در پیش گرفته بودند. آنها از محیط‌های آبی، رسوبات و خاک، نمونه‌ها را جدا کردند که از ۴۴ نمونه جمع‌آوری شده، ۲۰ سویه میکروبی توانایی احیای سلنات به سلنیوم را داشتند. در این آزمون مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سلنات به‌طور کامل در یک هفته گرمخانه‌گذاری تغییر یافت و حدود ۷۵ میلی‌گرم در هر لیتر، سلنات بیشتر از سلنیت به سلنیوم تبدیل شد (۲۰). جداسازی نمونه‌ها از محیط مشابه، فرایند به‌کار گرفته‌شده این تحقیق بود؛ اما در به‌کارگیری نمک‌های سلنیوم فقط از سلنیت استفاده شد. در این تحقیق صرفاً غربالگری باکتری برای جذب سلنیوم انجام

شد. کومار^{۳۱} و همکاران (۲۰۱۰) از چهار نمونه میکروارگانیسم استفاده کردند که شامل باکتری و قارچ بودند. آنها میکروارگانیسم‌ها را برای حذف چند فلز سنگین بررسی کردند؛ اما در آزمایش انجام‌شده جذب سلنیوم در خور توجه بود. پارامترهای مدنظر در این تحقیق برای پیدا کردن شرایط بهینه به‌منظور جذب بیشتر سلنیوم شامل غلظت توده زیستی، اسیدیته و دما در بازه زمانی مشخص بودند (۲۱). سالم^{۳۲} و همکاران (۲۰۱۰) از ساکارومایسس سرویزیه^{۳۳} برای جذب بهینه ۳ فلز سنگین استفاده کردند. نتایج آنها نشان دادند بیشترین ظرفیت جذب کادمیوم، روی و مس به‌ترتیب در اسیدیته ۸/۵، ۶ و ۶ بود. سایر پارامترها در مقادیر اسیدیته بهینه ارزیابی شدند و نتایج نشان دادند با افزایش زمان تماس، راندمان حذف سه یون فلزی افزایش یافت. همچنین بازدهی حذف، با افزایش دوز مخمر تا ۲ درصد، افزایش و با افزایش دوز مخمر تا ۴ درصد کاهش یافت (۲۲). کاهش راندمان حذف در پژوهش آنها ممکن است به‌دلیل تجمع مخمر باشد. آل‌آشه (۱۹۹۵) گزارش کرد جذب بیشتر در دوز زیست‌توده کمتر می‌تواند به‌دلیل نسبت مناسب یون‌های فلزی و جاذب زیستی باشد که با افزایش دوز توده زیستی کاهش می‌یابد و ممکن است باعث تداخل بین محل‌های اتصال در دوز زیست‌توده بالاتر شود. این احتمال وجود دارد که پروتون‌ها سپس با یون‌های فلزی ترکیب شوند و در نتیجه برهمکنش آنها با اجزای سلول را کاهش دهند (۲۳). در تحقیق حاضر از توده زیستی خالص باکتری برای جذب سلنیوم استفاده شد و نشان داد افزایش توده زیستی تا ۴ درصد، باعث افزایش بازدهی جذب فلز شد که با نتایج سالم مطابقت ندارد.

فیشر^{۳۴} در مطالعه‌ای برای جذب بیشتر سلنیوم توسط باکتری از ملاسی استفاده کرد که حاوی مواد مغذی

باکتری را شناسایی کردند که توانایی تحمل گستره بالایی از سلنیت یعنی ۵۰۰ و ۵۵۰ میلی‌مولار را داشتند و براساس آزمون بیوشیمیایی و PCR دو سویه مدنظر *Sordomonas marinicola*^{۳۹} سویه af326382 و گونه *باسیلوس frb21125* شناخته شدند؛ درنهایت، برای شناسایی دقیق از واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز استفاده شد (۱).

پیرز (۲۰۱۰) جدایه‌های به‌دست‌آمده را از لحاظ خصوصیات فنوتیپی و تجزیه و تحلیل توالی *16S rRNA* و آزمون تحمل با فلزات مختلف با گونه‌های مختلف بررسی کرد. باکتری *متالیدورانس*^{۴۰} سویه CH34 در پالایش زیستی^{۴۱} سلنیوم، طلا و بخار جیوه مؤثر بود (۱۰). در این پژوهش همچنین دو گونه یافت‌شده در جذب زیستی سلنیوم مقایسه شدند و نشان داده شد که *تالازوسپیرا پرمنیسیس*^{۴۲} توانایی جذب سلنیوم بیشتری را به‌صورت سلنیت نسبت به *باسیلوس تورنجینسیس*^{۴۳} داشت. اهرابی و همکاران (۱۳۹۲) در نتایج حاصل از تعیین حداقل غلظت ممانعت‌کننده رشد نشان دادند سویه *باسیلوس لیکنیفورمیس*^{۴۴} جداشده از کارخانه شیشه و بلور مقاومت بالاتری نسبت به *سودوموناس آئروجینوزا* جداشده از پساب قیطره داشت. این سویه همچنین دارای توانایی احیای کامل سلنیت به سلنیوم عنصری بود (۲۸).

خسروان و همکاران با مقایسه توانایی جذب روی توسط لجن فعال^{۴۵} در دامنه‌های مختلف اسیدیته، بهترین اسیدیته برای جذب روی را در اسیدیته ۶ نشان دادند (۲۹). در این تحقیق مشخص شد اسیدیته مناسب برای جذب سلنیوم توسط *باسیلوس تورنجینسیس* در مدت زمان ۴۰ دقیقه برابر با ۵ و برای *تالازوسپیرا پرمنیسیس* در مدت زمان ۶۰ دقیقه برابر با ۷ بود. همچنین نتایج نشان دادند در *باسیلوس تورنجینسیس* با افزایش اسیدیته به ۵،

برای باکتری‌ها بود که نتایج این مطالعه مغایر با نتایج مطالعه حاضر بود. نتایج آنها نشان دادند باکتری به همراه ملاس میزان سلنیوم کمتری را کاهش داد. باکتری به همراه ملاس تنها ۱۰ درصد غلظت اولیه فلز را کاهش داد؛ اما در شرایط مشابه و بدون حضور ملاس، ۸۰ درصد غلظت اولیه کاهش یافت. نتایج نشان دادند غلظت پایین ملاس، کربن کافی در اختیار باکتری در حال رشد قرار داد که به جذب بیشتر سلنیوم منجر شد (۲۴). مین^{۳۵} و همکاران (۲۰۱۱) ظرفیت جذب سلنیوم توسط توده زیستی جلبک *اسپیروژیرا* همراه *نوستوک کومون*^{۳۶} را بررسی کردند که نتایج آن حداکثر بازده حذف سلنیوم در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت را نشان داد (۲۵). در این تحقیق منبع سلنیوم نمک سدیم سلنات بود. روبرت^{۳۷} و همکاران (۲۰۱۵) از جلبک *گراسیلاریا*^{۳۸} به‌عنوان منبع زیستی برای جذب سلنیوم استفاده کردند که نتایج آنها میزان ظرفیت جاذب برای سلنیوم ۲/۷۲ تا ۲/۶ میلی‌گرم سلنات در اسیدیته برابر با ۲/۵ تا ۸ بود (۲۶).

عبدالهی (۱۳۸۲) در فرایند لیچینگ، پارامترهایی مانند غلظت اسید، دما و اسیدیته را بررسی کرد و نتیجه گرفت همه عوامل، بر فرایند لیچینگ مؤثر بودند و شرایط بهینه دمایی برابر با ۹۰ درجه سانتی‌گراد، غلظت اسید ۴ مول و زمان ۶۰ دقیقه بود. مشخص شد که در این شرایط ۹۹ درصد فلز، حل و وارد محلول شد (۲۷). میزان سلنیت به‌کاربرده‌شده در مشخص کردن مقاومت جدایه‌ها به سلنیوم در حد بسیار بالا (میلی‌مولار) بود که تنها اجازه رشد به سویه‌های مقاوم نسبت به این عنصر را داد. همچنین از طریق آزمون‌های بیوشیمیایی و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز می‌توان به شناسایی این گونه‌ها پرداخت. ذوالفقاری و همکاران (۱۳۹۲) سویه‌هایی از

تأثیر در میزان جذب را در میان دو سویه تحقیق حاضر، عامل مقدار باکتری تلقیحی داشت که توسط *تالازوسپیرا* پرمنیسیس صورت گرفت.

ملکوئیان و همکاران (۱۳۹۱) از جلیک/اولوتریکس *زوناتا*^{۴۶} در حذف فلزات سنگین مس، روی، سرب و کادمیوم در شرایط مختلف استفاده کردند. طبق نتایج آنها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و اسیدیته ۴ فلزات مس و سرب و در اسیدیته ۵، روی و کادمیوم در مدت ۶۰ دقیقه با میزان جذب ۱/۵ گرم بر لیتر حذف شدند و در این بین میزان حذف مس، روی، سرب و کادمیوم به ترتیب ۹۸/۴، ۹۶/۲، ۹۸ و ۹۴/۷ درصد بود (۳۰). در مطالعه حاضر برای حذف فلز سلنیوم از محیط، به جای جلیک از باکتری استفاده شد و بهترین مقدار جاذب بیومس ۴ درصد، دما ۲۵ درجه سانتی‌گراد و اسیدیته ۵، برای *باسیلوس تورنجینسیس* و اسیدیته ۷ برای *تالازوسپیرا پرمنیسیس* بود. همچنین بهترین جذب توسط *تالازوسپیرا پرمنیسیس* در توده زیستی ۴ درصد در مدت ۲۰ دقیقه انجام شد که ۹۵/۱ میلی‌گرم بر لیتر بود.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز و آزمون‌های بیوشیمیایی نشان دادند دو سویه آزمایش‌شده *باسیلوس تورنجینسیس* و *تالازوسپیرا پرمنیسیس* هستند و باکتری دوم با جذب ۹۵/۱ میلی‌گرم بر لیتر از مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سدیم سلنیت موجود در محیط در مدت زمان ۲۰ دقیقه و با بیومس ۴ درصد، از میزان جذب زیستی بالایی برخوردار بود. همچنین نتایج نشان دادند بیشترین میزان جذب زیستی سلنیوم در *تالازوسپیرا پرمنیسیس* با افزایش میزان بیومس، در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد (دمای محیط) در اسیدیته ۷ و در *باسیلوس*

میزان جذب افزایش یافت؛ اما در *تالازوسپیرا پرمنیسیس* با کاهش اسیدیته به ۷ میزان جذب سلنیوم توسط این سویه افزایش داشت. سالم و همکاران با استفاده از مخمر نان در جذب سه عنصر کادمیوم، روی و مس نشان دادند اسیدیته بهینه برای جذب این عناصر توسط *ساکارومیسس سرویزیه* برای کادمیوم ۸/۶ و برای روی و مس ۶ بود. همچنین اثر میزان توده مخمر بر جذب این عناصر نشان داد با افزایش میزان تا ۲ گرم بر ۱۰۰ میلی‌لیتر، میزان جذب افزایش یافت؛ اما با افزایش میزان مخمر از ۲/۲ تا ۴ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر، میزان جذب کاهش داشت (۲۲). در نتایج به‌دست‌آمده بیشترین میانگین جذب سلنیوم توسط *باسیلوس تورنجینسیس* توسط ۴ درصد توده زیستی باکتری در زمان ۶۰ دقیقه بود؛ درحالی‌که بهترین شرایط جذب از لحاظ میزان بیومس تلقیحی *تالازوسپیرا پرمنیسیس* ۴ درصد میزان توده زیستی در ۲۰ دقیقه بود که نشان داد افزایش میزان توده زیستی باعث افزایش میزان جذب شد.

عبداللهی و همکاران با استفاده از روش تاگوچی و کاهش تعداد آزمایش‌ها به این نتیجه رسیدند که اگر عملیات لیچینگ در محیط اسیدی ۴ مول صورت گیرد، در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد طی ۶۰ دقیقه، بیشترین میزان بازیابی سلنیوم را خواهند داشت (۲۷). در این آزمایش نتایج نشان دادند استفاده از *باسیلوس تورنجینسیس* در ۲۵ درجه سانتی‌گراد طی ۴۰ دقیقه بیشترین میزان میانگین جذب صورت گرفت. این اثر در زمان ۶۰ دقیقه و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد توسط *تالازوسپیرا پرمنیسیس* نیز صورت گرفت که نشان داد دو سویه توانایی جذب در دمای آزمایشگاه و محیط را داشتند. همچنین نتایج این مطالعه نشان داد بیشترین تأثیر در جذب سلنیوم را عامل دما داشت. حال آنکه بیشترین

می‌تواند پیشنهاد شود و در حذف سلیوم از محیط بسیار مؤثر باشد.

تورنجینسیس با افزایش توده زیستی ۴ درصد، در دمایی مشابه و در اسیدیته ۵ بود. نتایج به دست آمده در مجموع تعیین کرد تالازوسپیرا پرمنیسیس برای مطالعات میدانی

References

- (1) Zolfaghari M.R., Khalilian M. Isolation and Characterization of Selenite Resistant Microorganisms from Industrial Wastewaters. *Scientific J Ilam Uni of Med Sci*, 2014; 21(7):142-152. <http://sjimu.medilam.ac.ir/article-1-1093-fa.html> [In Persian].
- (2) Werkneh A.A., Gebretsadik G.G., Gebru S.B. Review on environmental selenium: Occurrence, public health implications and biological treatment strategies. *Environmental Challenges*, 2023; 11: 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.envc.2023.100698>
- (3) Irannajad M., Kamran Haghighi H. Removal of Heavy Metals from Polluted Solutions by Zeolitic Adsorbents: a Review. *Environmental Processes*, 2021; 8(1): 1-29. <https://doi.org/10.1007/s40710-020-00476-x>
- (4) Choupani M.H. Introduction In: *Environmental pollutants and environmental protection*. First Edition, Training and equipping the human resources of National Gas Company of Iran; 2009: 42-43.
- (5) Yaghoobzadeh F., Roayaei Ardekani M., Zolgharnein H. Screening and identification of efficient strain in selenium oxyanions sorption in order to biological wastewater treatment. *Biological Journal of Microorganism*, 2016; 5(17): 185-198. <https://doi.org/10.22108/bjm.2016.20378> [In Persian].
- (6) Hashemi Sharafabad S., Rahimi M., Ghaedi M. Removal of metals (lead, chromium and cobalt) from the water environment by a mixture of absorbents of sawdust and baneh tree stems. *National Conference of Water and Wastewater Engineering Sciences*, Kerman, 2012. <https://civilica.com/doc/208955/> [In Persian].
- (7) Khakpour H., Younesi H., Mohammadhosseini M. Two-stage biosorption of selenium from aqueous solution using dried biomass of the baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of environmental chemical engineering*, 2014; 2(1): 532-542. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2013.10.010>
- (8) Milton J.D., Reetha D. removal of heavy metals using bacteria isolated from lignite mining environment. *International Journal of recent scientific research*, 2012; 3: 1071-1078. <http://www.recentscientific.com>
- (9) Shayestehfar M.R., Rezai A. Evaluation of the level of contamination and distribution of heavy metals in the sediments of Sarcheshme copper mine using geochemical data and statistical analysis. *Iranian Journal of Mining Engineering*, 2011; 6(11): 25-34. https://ijme.iranjournals.ir/article_1513.html?lang=en [In Persian].
- (10) Pires C. Bacteria in Heavy Metal Contaminated Soil: Diversity, Tolerance and Use in Remediation Systems [Dissertation]. Bedford: Cranfield University; 2010. <http://dspace.lib.cranfield.ac.uk/handle/1826/5581>
- (11) Meybodi S.M., Fotoohi S.J., Jalilzadeh E., Fotoohi M.R., Jalili T., Shamloo S. Biosorption of Cadmium by Fungal Strains Isolated from Wastewater of Zanzan Leads and Zinc Plants. *Journal of water & wastewater*, 2013; 24(3): 122-127. https://www.wjjournal.ir/article_3178.html?lang=en [In Persian].
- (12) Mohammadzadeh Karkaragh R., Chorom M., Motamedi H., Mohabat A. Biosorption and bioaccumulation of Cd and Ni in competitive solution by three bacteria isolated from polluted soils to sewage sludge. *Journal of Microbial World*, 2014; 7(3): 241-251. <https://sanad.iau.ir/Journal/jmw/Article/1056926> [In Persian].
- (13) Baldani J., et al. Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria. In: *The Prokaryotes*. Springer, Berlin, Heidelberg; 2014: 533-618.
- (14) Shahcheraghi S.H., Nowruzi J., Namazi M.J., Shahhoseini M.H., Samadi H.

- Frequency of PXO1 Gene in *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus subtilis* by SDS PAGE Technique. *Journal of Sabzevar University of Medical Sciences*, 2010; 17(3): 196-206. https://jsums.medsab.ac.ir/article_56.html [In Persian].
- (15) Lane D.J. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M, editors. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, New York, Wiley; 1991: 115–175.
- (16) Jiang H., Dong H, Zhang G, Yu B, Chapman L.R., Fields M.W. Microbial Diversity in Water and Sediment of Lake Chaka, an Athalassohaline Lake in Northwestern China. *Appl Environ Microbiol*, 2006; 72(6): 3832–3845. <https://doi.org/10.1128/AEM.02869-05>
- (17) Sambrook J., Russell D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd Edition, Vol. 1, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 2001.
- (18) [Website] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.
- (19) Lemly A.D. Aquatic selenium pollution is a global environmental safety issue. *Journal/ecotoxicology-and-environmental-safety*, 2004; 59(1): 44-56. [https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(03\)00095-2](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(03)00095-2)
- (20) Maiers D.T., Wichlacz P.L., Thompson D.L., Bruhn D.F. Selenate reduction by bacteria from a selenium-rich environment. *Applied and environmental microbiology*, 1988; 2591-2593. <https://doi.org/10.1128/aem.54.10.2591-2593.1988>
- (21) Kumar A., Bisht B., Joshi V. Biosorption of heavy metals by four acclimated microbial species, *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp. and *Aspergillus niger*. *Journal boil environ Sci*, 2010; 4(12): 97-108. <https://dergipark.org.tr/en/download/article-file/497764>
- (22) Salem M., Hamza S., Ahmed H., Ehab A. Optimization of Cadmium, Zinc and Copper biosorption in an aqueous solution by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of American Science*, 2010; 6(12): 597-604. https://www.jofamericanscience.org/journal/s/am-sci/am0612/68_4104am0612_597_604.pdf
- (23) Al-Asheh S, Duvnjak Z. Adsorption of copper and chromium by *Aspergillus carbonarius*. *Biotechnology Progress*, 1995; 11(6): 638-42. <https://doi.org/10.1021/bp00036a006>
- (24) Fisher L. The effect of molasses concentration on bacterial treatment of selenium in agriculture wastewater in the San Joaquin Valley, 2004; California Berkley website: <http://socrates.berkeley.edu/~es196/projects/2004final/Fischer.pdf>
- (25) Mane P.C., Bhosle A.B., Jangam C.M., Vishwakarma C.V. Bioadsorption of selenium by pretreated algal biomass. *Advances in applied science research*, 2011; 2(2): 202-207. <https://www.researchgate.net/profile/Chandrankant-Jangam/publication/281550486>
- (26) Robert D., Paul A.N., Gracilaria waste biomass (sampah rumput laut) as a bioresource for selenium biosorption. *Journal appl phycol*, 2015; 27: 611-620. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0346-y>
- (27) Abdollahi M., Shefai Tonekaboni S.Z. Determining the optimal conditions for selenium extraction (208/11) from Sarcheshmeh anode copper sludge by Taguchi method, *The 8th National Congress of Chemical Engineering of Iran*, Mashhad Ferdowsi University, 2003; 1-6. <https://civilica.com/doc/48105/> [In Persian].
- (28) Ahrabi M., Hosseini F., Akhavan Sepahi A. Isolation and identification of bacteria with bioremediation of selenite salts ability from environmental source. *New Cellular and Molecular Biotechnology Journal*, 2014; 4(13): 85-91. <https://www.sid.ir/paper/204373/en> [In Persian].
- (29) Khosravan A., Amini J., Sarsalari S., Rohanian E. Comparison of Biosorption of Heavy Metal Zinc by four different Microbial Biomas(Activated sludge) in Industrial Waste Water in order to Biological Refinement. *Journal of Microbial World*, 2009; 2(2): 23-30. <https://sanad.iau.ir/Journal/jmw/Article/105>

7391 [In Persian].

- (30) Malakootian M., Moussavi S.G.H., Toolabi A. A study of kinetics and biosorption isotherms of heavy metals by Algae *Ulothrix zonata* from Industrial

wastewater. *Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences*, 2012; 19(4): 26-37. <https://sjimu.medilam.ac.ir/article-1-567-en.html> [In Persian].

-
- ¹ Metallurgy
 - ² Food supplement
 - ³ COVID-19
 - ⁴ Angiotensin-converting enzyme 2(ACE-2)
 - ⁵ Waste dams
 - ⁶ Metal extraction
 - ⁷ Adsorption
 - ⁸ Chelatin agents
 - ⁹ Luria bertani Agar
 - ¹⁰ Minimum Inhibitory Concentration
 - ¹¹ Biomass
 - ¹² Freeze drying apparatus
 - ¹³ Atomic absorption spectroscopy
 - ¹⁴ Crosse & Goodmann
 - ¹⁵ Tris-EDTA(TE)
 - ¹⁶ Sodium Dodecyl Sulfate(SDS)
 - ¹⁷ Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide/Sodium Chloride(CTAB/NaCl)
 - ¹⁸ Ethidium bromide
 - ¹⁹ Loading buffer
 - ²⁰ DNA ladder
 - ²¹ Gel documentation machine
 - ²² Nucleotide Sequencing
 - ²³ Bioneer company
 - ²⁴ Chromas software
 - ²⁵ One Way ANOVA
 - ²⁶ Duncan Test
 - ²⁷ National Center for Biotechnology Information(NCBI)
 - ²⁸ Phylogenetic Trees
 - ²⁹ Neighbor joining
 - ³⁰ Maier
 - ³¹ Kumar
 - ³² Salem
 - ³³ *Saccharomyces cerevisiae*
 - ³⁴ Fischer
 - ³⁵ Mane
 - ³⁶ *Nostoc commune*
 - ³⁷ Robert
 - ³⁸ Gracilaria
 - ³⁹ *Pseudomonas marincola*
 - ⁴⁰ *Metallidurans*
 - ⁴¹ Bioremediation
 - ⁴² *Thalassospira permensis*
 - ⁴³ *Bacillus thuringiensis*
 - ⁴⁴ *Bacillus licheniformis*
 - ⁴⁵ Activated sludge
 - ⁴⁶ *Ulothrix zonata*