کاربرد روش سطح پاسخ در بهینه سازی احیای زیستی سلنات به نانوذرات سلنیم توسط باکتری *Bacillus* sp. Strain TR-6

عطیه سادات رضوی[۱]، پریسا تاجرمحمد قزوینی*[۲]، جواد حامدی[۳]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۷/۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۲

چکیده

معدنی‌سازی زیستی سلنیم توسط باکتری‌ها نه تنها پتانسیل لازم برای زدودن اکسی آنیون‌های سمی سلنیم را از محیط دارا می‌باشد، بلکه می‌تواند سلنیم عنصری را در مقیاس نانو تولید نماید. در این پژوهش از روش رویه‌ی پاسخ با طراحی باکس- بنکن برای ارزیابی و بهینه سازی تأثیر پارامترهای عملیاتی مختلف بر فرآیند احیای زیستی سلنات استفاده گردید. مدل درجه دوم پیشنهادی با ضریب همبستگی $R^2=$ ۰/۹۶ ضمن پیش‌بینی مناسب رفتار فرآیند، مقدار ۴۱/۲۵درصد احیای سلنات توسط باکتری Bacillus sp. Strain TR-6 را در شرایط ۵/۲۴ درصد تلقیح اولیه باکتری، مدت زمان ۲۴ ساعت و مقدار ۳/۸ mM نمک سلنات سدیم به عنوان نقطه بهینه تعیین نمود. مطالعات میکروسکوپ الکترونی نگاره مجهز به سیستم طیف سنجی پراش انرژی پرتو ایکس توانایی تولید نانوسفرهای سلنیم توسط باکتری منتخب را تأ یید کرد. نهایتاً باکتری مذکور به عنوان یک باکتری منتخب باارزش در فناوری‌های نانو و معدنی‌سازی زیستی سلنیم معرفی می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: احیای باکتریایی، اکسی آنیون‌های سلنیم، طراحی آزمایش، نانوبیوتکنولوژی.

مقدمه

سلنیم یک عنصر نادر دارای اهمیت قابل ملاحظه‌ای در سایز نانو در زمینه‌ی کاربردهای مربوط به حوزه‌ی سلامت (به عنوان ماده ضد میکروبی، آنتی اکسیدان، ضدسرطان و غیره) و تکنولوژی (برای مثال تجهیزات الکترونیکی) است. سلنیم نه تنها یک عنصر استراتژیک در تجهیزات الکترونیکی می‌باشد، بلکه یک عنصر کمیاب ضروری در ارگانیسم‌های زنده نیز است. سلنیم عنصری است که از نظر بررسی‌های زیست محیطی بسیار مهم می‌باشد، زیرا بین غلظت ضروری آن و غلظت سمی آن برای موجودات زنده تفاوت کمی وجود دارد. برای مثال میزان غلظت توصیه شده‌ی سلنیم توسط انجمن غذا و تغذیه انستیتوی پزشکی ایالات متحده در رژیم غذایی بزرگسالان برابر با ۵۵ میکروگرم در روز می باشد، در حالی‌که میزان بالاترین سطح قابل تحمل برای بزرگسالان ۴۰۰ میکروگرم در روز در ایالات متحده و در اروپا ۳۰۰ میکروگرم در روز معرفی شده است. مطالعات نشان داده

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲- پژوهشکده مواد و سوخت هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، تهران، ایران
*(نویسنده مسئول: ptajer@aeoi.org.ir)
۳- دانشکده زیست شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران

که مطالعه‌ی آلودگی سلنیم یکی از وسیع‌ترین و گران قیمت‌ترین مطالعات از مثال‌های فلزات خطرناک گروه V وVI است. به‌طور معمول سلنیم (Se) به دو فرم بسیار محلول سلنات (SeO_4^{2-}) و سلنیت (SeO_3^{2-}) در خاک‌های آلوده و آبهای زهکشی شده کشاورزی وجود دارد. هر دو فرم محلول این عنصر در غلظت‌های خاصی بسیار سمی هستند. سلنات بیشترین فرم اکسید شده‌ی سلنیم است و بیشترین حلالیت را در آب دارد. خروج سلنات از آبهای آلوده به دلیل حلالیت بالای آن مشکل است. بنابراین احیای زیستی سلنات به سلنیم از نظر پاکسازی زیستی بسیار حائز اهمیت است (Nancharaiah & Lens, 2015a; Santos *et al*., 2015; Soudi *et al*., 2009; Stolz *et al*., 2002; Tajer- Mohammad-Ghazvini, 2007; Wadhwani *et al*., 2016).

میکروارگانیسم‌ها در چرخه زیستی سلنیم نقش به سزایی دارند و مطالعات نشان می‌دهد که سویه‌های باکتریایی خاصی می‌توانند به اکسی آنیونهای سلنیم مقاوم باشند و آنها را به سلنیم عنصری نامحلول احیا نمایند. از این میکروارگانیسم‌ها برای پاکسازی زیستی خاک‌ها و رسوبات، آبهای آلوده با آلاینده‌های صنعتی و کشاورزی استفاده می‌شود (Nancharaiah & Lens, 2015b; Oremland *et al*., 1989). میکروارگانیسم‌های احیاکننده‌ی اکسی آنیونهای سلنیم دارای پتانسیل بی‌نظیری برای بیوسنتز سلنیم عنصری و نانومواد سلنیدی تحت شرایط محیطی با استفاده از پیش ماده‌های سلنیم از مواد خام کم هزینه و پسابها می‌باشند (Yuan *et al*., 2015). سلنیم در فرم اکسیداسیون صفر (Se^0) در محیط‌های مایع می‌تواند بصورت نانوذره‌های جداگانه وجود داشته باشد. امروزه نانوذرات سلنیم به دلیل کاربرد آنها در صنایع و پزشکی بسیار مورد توجه هستند. این نانوذرات می‌توانند با کاهش خطر سمیت به عنوان یک آنتی اکسیدان عمل کنند (Raevskaya *et al*., 2008). امروزه استفاده از میکروارگانیسم‌ها در سنتز سبز نانومواد موضوع تحقیقی جذابی است، چراکه میکروارگانیسم‌ها کاتالیزورهای ارزان قیمتی هستند که پیش ماده آنها می‌تواند از مواد خام ارزان قیمت و پسابها تهیه گردد و از مواد کاهنده و خطرناک در فرایندهای آنها استفاده نمی‌شود. این امر منجر به کاهش مصرف انرژی و زدودن مواد سمی در تولید نانومواد می‌شود. همچنین سنتز زیستی نانومواد می‌تواند در pH نزدیک به خنثی، دما و فشار محیط انجام پذیرد که مقرون به صرفه می‌باشد (Dobias *et al*., 2011).

اخیراً روش سطح پاسخ (Response Surface Method, RSM) در میان تکنیک‌های متداول چند متغیره به عنوان یک روش مناسب برای طراحی آزمایش‌ها به صورت گسترده استفاده شده است. روش سطح پاسخ در واقع ترکیبی از روش‌های ریاضی و آماری می‌باشد که توصیف کننده روابط میان چندین متغیر مستقل و یک یا چند پاسخ است. روش سطح پاسخ براساس مدل‌های ریاضی با نتایج آزمایشگاهی بدست آمده از طراحی آزمایش و تأیید مدل بدست آمده به کمک روش‌های آماری عمل می‌نماید. نمایش نموداری از این معادلات به عنوان سطوح پاسخ نامیده می شود که می‌تواند برای توصیف اثر فردی و جمعی متغیرهای آزمون بر پاسخ و تعیین تعامل متقابل بین متغیرهای آزمون و تأثیر بعدی آنها در پاسخ باشد. همچنین گزارش شده است که روش Box-Behnken طراحی‌هایی با خصوصیات آماری مطلوب ایجاد می‌کند (Preetha & Viruthagiri, 2007; Singh *et al*.,

(2010; Sohbatzadeh Lonbar, 2016. بنابراین در مطالعه حاضر بهینه‌سازی احیای سلنات و تولید نانوذرات سلنیم توسط باکتری *Bacillus* sp. Strain TR-6 با استفاده از طراحی آزمایش به روش سطح پاسخ مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

منبع میکرو ارگانیسم

باکتری مورد استفاده در این پژوهش باکتری *Bacillus* sp. Strain TR-6 می‌باشد که در سال ۱۳۹۶ از رودخانه قره‌سو در شهر کرمانشاه جدا گردیده است (Razavi, 2019).

سنجش میزان مقاومت باکتری *Bacillus* sp. Strain TR-6 نسبت به سلنات

در این مرحله برای تعیین میزان مقاومت باکتری نسبت به غلظت‌های مختلف سلنات از آزمایش MIC (Minimum inhibitory concentration) روش رقت در آبگوشت در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه استفاده گردید (Tajer-Mohammad-Ghazvini, 2007). از کشت ۲۴ ساعته باکتری با غلظت ۰/۵ مک فارلند در میکروپلیت‌های دارای محیط کشت مایع Luria Bertani (LB) حاوی غلظت‌های مختلف سلنیم (۶۴۰mM, ۳۲۰, ۱۶۰, ۸۰, ۴۰, ۲۰, ۱۰، ۵) از نمک‌های سلنات سدیم کشت داده شد. میکروپلیت‌ها در گرمخانه در دمای ۳۰°C به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت گرماگذاری شد. رشد باکتری‌ها و تغییر رنگ خانه‌ها به رنگ قرمز که نشانه مقاومت باکتری و نیز احیای سلنات به سلنیم عنصری می‌باشد، مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش‌ها با ۲ تکرار انجام گرفت. خانه‌های حاوی محیط کشت و سوسپانسیون باکتری بدون سلنات به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. به‌منظور تعیین MBC (minimum bactericidal concentration) محتویات چاهک مربوط به MIC و چاهک مربوط به غلظت بالاتر، بر روی محیط کشت LB آگار فاقد سلنات کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری در ۳۰°C، رشد باکتری بر روی پلیت‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی کینتیک احیای سلنات توسط باکتری *Bacillus* sp. Strain TR-6

به‌منظور بررسی کینتیک احیای سلنات، باکتری در محیط کشت مایع Luria Bertani (LB) حاوی ۱ mM نمک سدیم سلنات در شرایط هوازی و دمای ۳۰°C کشت داده شد. در بازه‌های زمانی متوالی از مایع رویی محیط کشت، نمونه‌گیری انجام شد و غلظت سلنیم محلول در نمونه‌ها توسط دستگاه ICP-Optical Emission Spectroscopy آنالیز شد (Soudi *et al*., 2009).

طراحی آزمایش به منظور ارزیابی فاکتورهای موثر بر فرآیند احیای زیستی سلنات و بهینه‌سازی آن

در این پژوهش، روش سطح پاسخ (RSM) برای ارزیابی فرآیند احیای زیستی سلنات توسط باکتری *Bacillus* sp. Strain TR-6 و بهینه‌سازی فاکتورهای موثر بر فرآیند احیای زیستی استفاده شد. سه متغیر شامل درصد اولیه تلقیح باکتری،

مدت زمان و مقدار غلظت نمک سدیم سلنات در سه سطح 1-، 0، 1+ به صورت جدول ۱ مورد مطالعه قرار گرفت. بر اساس متغیرها و مقادیر آنها یک سری شامل ۱۵ آزمایش با استفاده از طراحی باکس- بنکن (Box-Behnken) طراحی گردید. تمامی آزمایش‌ها در دمای ۳۰ °C و در شیکر اینکوباتور با دور ۱۵۰ rpm گرماگذاری شدند.

برای تحلیل آماری داده‌ها از نرم‌افزار آماری Design-Expert 7.0 (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN, USA) استفاده شد (Sohbatzadeh Lonbar, 2016; Witek-Krowiak *et al*., 2014).

جدول ۱: متغیرهای روش طراحی باکس- بنکن

متغیر	نماد	سطح‌ها		
		-1	0	+1
درصد اولیه تلقیح باکتری	A	۵	۷/۵	۱۰
مدت زمان (ساعت)	B	۸	۲۰	۳۲
مقدار غلظت نمک سدیم سلنات (mM)	C	۱	۵/۵	۱۰

بررسی تولید نانو ذرات سلنیم توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره مجهز به طیف سنجی پراش انرژی پرتو ایکس

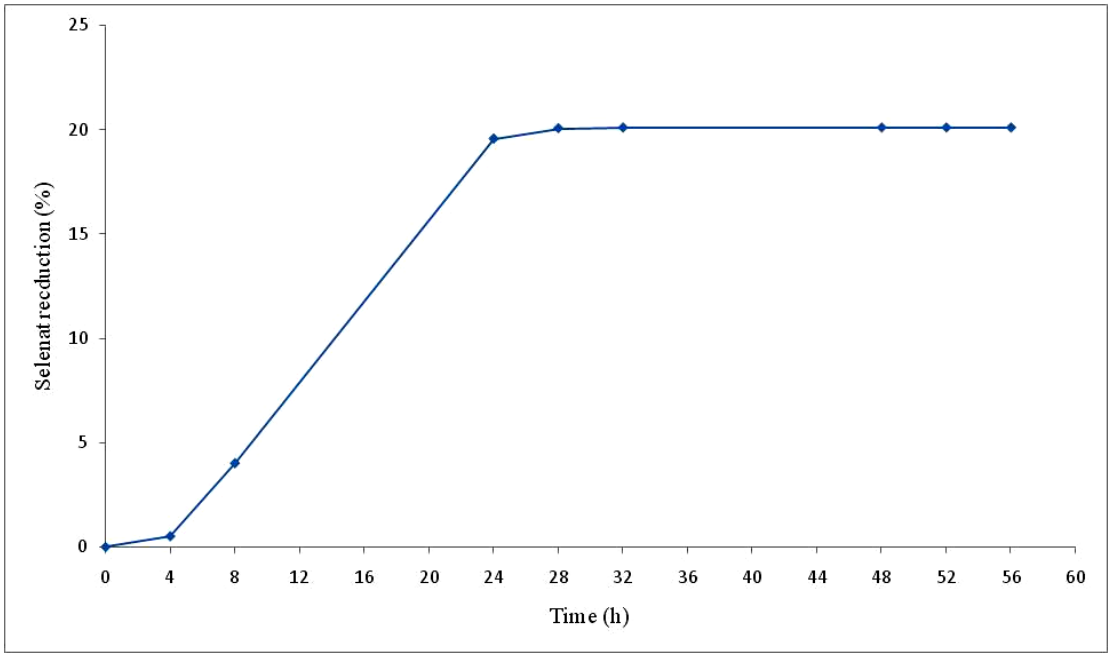
بررسی شکل سلول‌های باکتری در مجاورت با نمک سدیم سلنات توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM, Scanning Electron Microscopy) انجام شد. ابتدا باکتری در محیط کشت مایع LB حاوی ۱ mM نمک سدیم سلنات در شرایط هوازی و دمای ۳۰ °C کشت داده شد. سپس برای بررسی، لامل‌های شیشه‌ای به ابعاد ۱۰×۱۰ mm^2 تهیه و در محلول آگار ۰/۸ درصد غوطه‌ور شدند. بعد از خشک شدن و بستن آگار، سلول‌های باکتری بر روی لامل‌ها قرار گرفتند. به منظور دهیدراته شدن آگار، نمونه‌ها به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ °C قرار داده شدند. برای آبگیری نمونه‌ها، از روش غوطه‌ور کردن متوالی به مدت ۳۰ دقیقه در اتانول با غلظت کم به زیاد (۱۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۹۶ و ۹۹/۹ درصد) استفاده گردید. در آخر، برای تبخیر اتانول، نمونه‌ها به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷°C قرار گرفتند.

بر روی نمونه‌ها پوششی از طلا به‌وسیله دستگاه Ion-Coater (KIC-IA, COXEM) داده شد، سپس نمونه‌ها با میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM- ZEISS EVO 18 Special Edition) مجهز به سیستم طیف سنجی پراش انرژی پرتو ایکس (EDX-Energy dispersive x-ray spectroscopy) مورد بررسی قرار گرفتند (Piroeva *et al*., 2013).

نتایج و بحث

نتایج این تحقیق نشان داد که حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) نمک سدیم سلنات برای باکتری *Bacillus* sp. Strain TR-6 برابر با ۳۲۰mM سلنیم می‌باشد. امروزه ثابت شده است که احیای اکسی آنیون‌های سلنیم به نانوذرات سلنیم می‌تواند توسط گونه‌های متنوعی از باکتری‌های مقاوم به سلنیم انجام شود. در حقیقت باکتری‌های مقاوم به اکسی آنیونهای سلنیم، سنتز نانوذرات سلنیم را به‌عنوان یکی از مکانیسم‌های سم‌زدایی سلنواکسی آنیون‌ها

بکار می‌گیرند (Eswayah *et al*., 2016; Wadhwani *et al*., 2016). همچنین بررسی کینتیک احیای سلنات باکتری *Bacillus* sp. Strain TR-6 نشان داد که باکتری مذکور قادر است بعد از گذشت ۵۶ ساعت حدود ۲۰ درصد از سلنواکسی آنیون محلول در محیط را احیا و به سلنیم عنصری (نامحلول) کاهش دهد (شکل۱).



شکل۱: نمودار کینتیک احیای سلنات به سلنیم عنصری بر حسب زمان توسط باکتری *Bacillus* sp. Strain TR-6 در محیط کشت مایع LB حاوی ۱ mM نمک سلنات سدیم در شرایط هوازی و دمای ۳۰°C.

در این پژوهش، روش سطح پاسخ (Response surface methodology, RSM) برای ارزیابی فاکتورهای موٌثر بر فرآیند احیای زیستی سلنات و بهینه‌سازی آن مورد استفاده قرار گرفت. سه متغیر شامل درصد اولیه تلقیح باکتری، مدت زمان و مقدار غلظت نمک سدیم سلنات در سه سطح 1-، 0، 1+ مورد مطالعه قرار گرفت. بر اساس متغیرها و مقادیر آنها یک سری شامل ۱۵ آزمایش با استفاده از طراحی باکس- بنکن (Box-Behnken) طراحی گردید. مقادیر متغیرها و پاسخ‌های آزمایشگاهی در جدول ۲ ارائه شده است.

جدول۲: مقادیر متغیرها و پاسخ‌های آزمایشگاهی طراحی باکس- بنکن در روش رویه پاسخ.

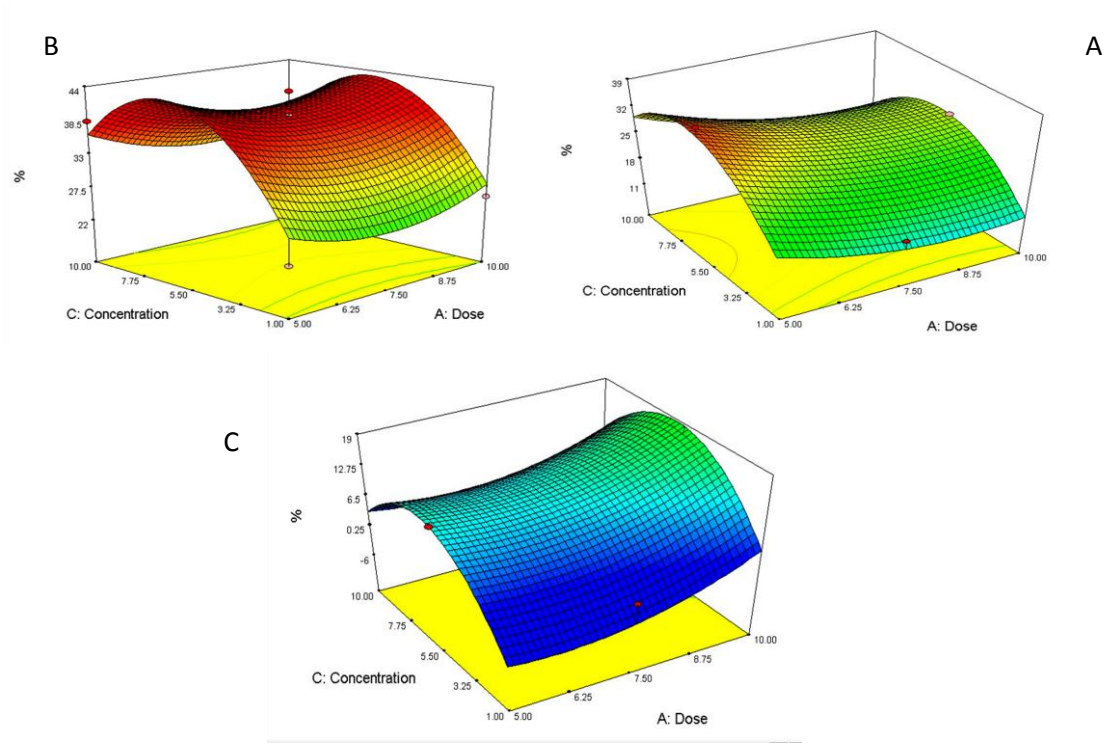
آزمایش	متغیر A (درصد تلقیح باکتری)	متغیر B (زمان- ساعت)	متغیر C (غلظت نمک سدیم سلنات - mM)	R درصد سلنواکسی آنیون احیا شده
۱	۵	۳۲	۵/۵	۳۸/۲۱
۲	۷/۵	۲۰	۵/۵	۳۹/۳۰
۳	۱۰	۲۰	۱	۲۵/۹۷
۴	۱۰	۳۲	۵/۵	۲۷/۷۲
۵	۷/۵	۲۰	۵/۵	۳۹/۹۶
۶	۱۰	۸	۵/۵	۱۶/۳۸
۷	۷/۵	۲۰	۵/۵	۳۹/۷۸
۸	۵	۲۰	۱	۲۲/۸۷
۹	۷/۵	۸	۱۰	۰/۶۴
۱۰	۷/۵	۳۲	۱	۱۴/۲۴
۱۱	۷/۵	۸	۱	۰/۵۳
۱۲	۵	۲۰	۱۰	۳۸/۳۵
۱۳	۵	۸	۵/۵	۱۱/۳۳
۱۴	۷/۵	۳۲	۱۰	۱۶/۶۱
۱۵	۱۰	۲۰	۱۰	۳۸/۳۶

تحلیل واریانس به منظور تأیید مؤثر بودن اثرات اصلی و برهمکنشی متغیرها انجام شد. به طور کلی، مقدار P کمتر از ۰/۰۵ و مقدار F بزرگ در تحلیل واریانس نشان‌دهنده تأثیر بیشتر متغیرها با سطح اطمینان ۹۵ درصد می‌باشد. مقادیر P و F مدل پیشنهادی به ترتیب برابر با ۰/۰۰۳۹ و ۱۵/۳۱ می‌باشد که دلالت بر صحت مدل پیشنهادی دارد. همچنین مقادیر R^2 و R^2adj به ترتیب برابر با ۰/۹۶ و ۰/۹۰ می‌باشند که این مقادیر نشان می‌دهند مدل پیشنهادی به خوبی قادر است مقادیر تجربی را پیش‌بینی کند. نتایج نشان دادند که متغیر A (درصد تلقیح اولیه باکتری) از نظر آماری با p-value برابر با ۰/۸۶(۰/۰۵ < p-value) کمترین اثر را بر میزان احیای سلنات دارد. اما فاکتور B (زمان) با p-value برابر با ۰/۰۰۳ (p-value<۰/۰۵) بر میزان احیای سلنات بسیار تاثیرگذار می‌باشد. مدل پیشنهاد شده توسط نرم‌افزار به صورت زیر تعریف شده است:

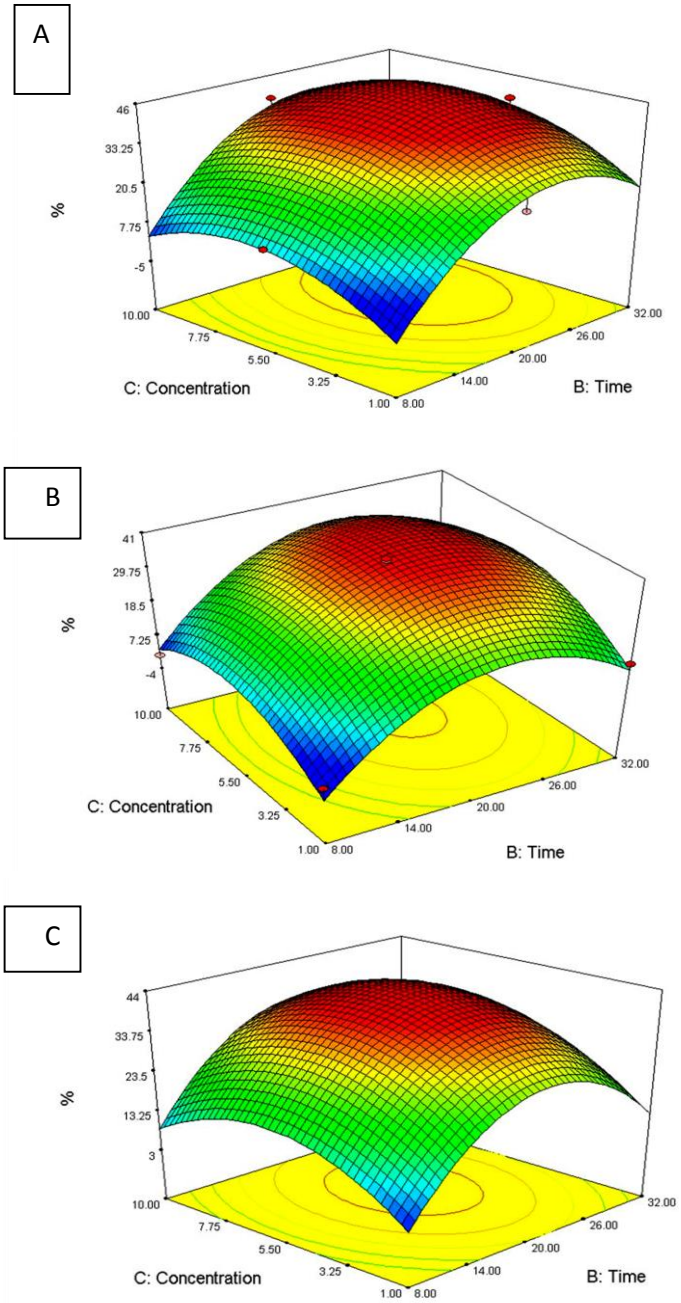
$$\% = -40.14636-5.67154* Dose+7.12874* Time+7.58498* Concentration-0.12957 * Dose * Time-0.068697* Dose * Concentration+0.010462* Time * Concentration+0.56831* Dose^2-0.13768 * Time^2-0.58508* Concentration^2$$

رویه‌های سه‌بعدی پاسخ‌ها که ناشی از برهمکنش سه متغیر درصد اولیه تلقیح باکتری، مدت زمان و مقدار غلظت نمک سلنات می‌باشد، دراشکال ۴-۲ نشان داده شده است. همانطور که در سطح‌های سه‌بعدی پاسخ‌های شکل ۲ نشان داده شده است، میزان احیای سلنات می‌تواند متأثر از غلظت نمک سلنات در محیط نیز باشد، به‌طوری که هر چه میزان غلظت نمک (از ۱ mM تا ۱۰ mM) در محیط بیشتر باشد، میزان درصد احیای سلنات به‌طور کلی بیشتر می‌گردد. این نتیجه احتمالاً به‌علت افزایش سمیت سلنات با افزایش غلظت نمک برای باکتری و مکانیسم مقاومت باکتری و تمایل به سم‌زدایی سریع آن می‌باشد. اما همان

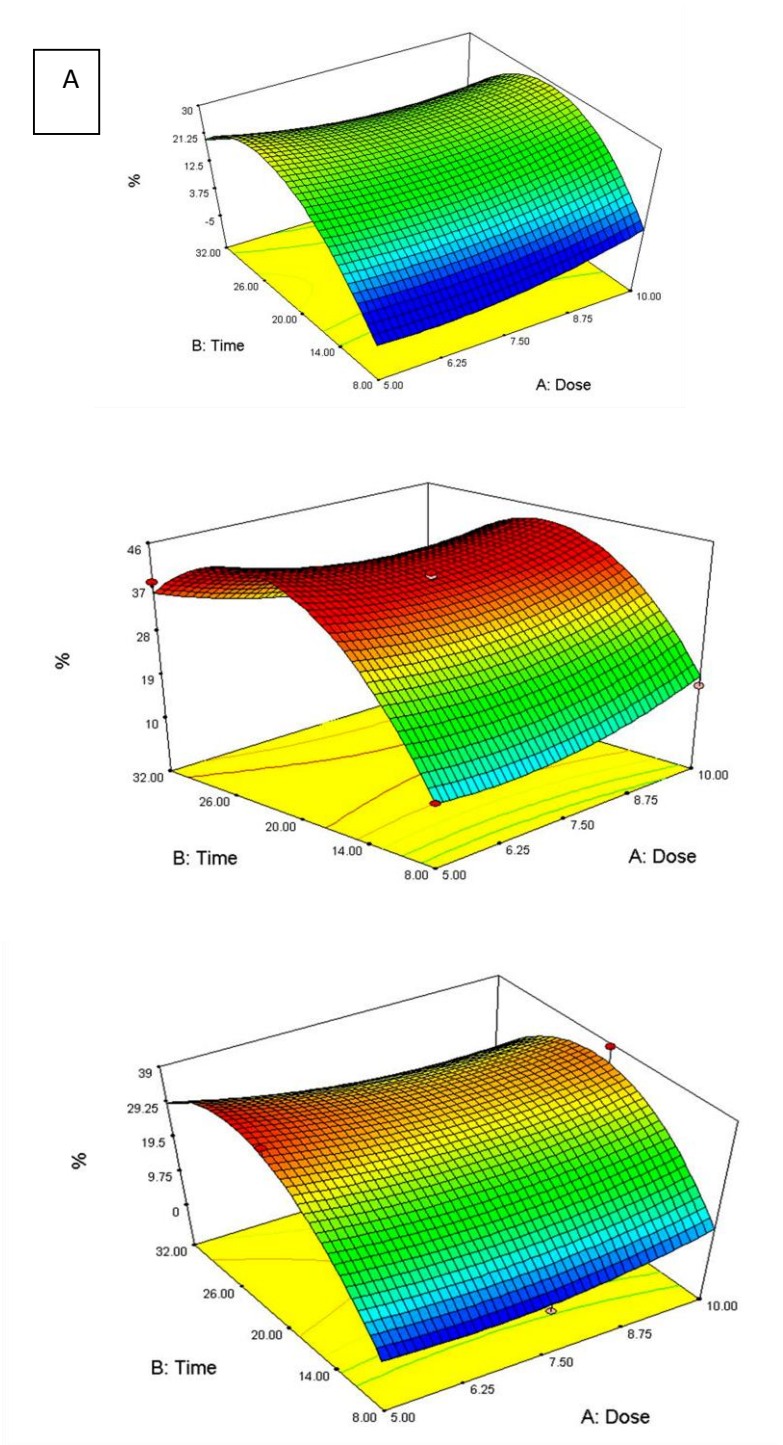
طورکه در نمودارهای سه بعدی دیده می شود، میزان احیای سلنات با افزایش غلظت نمک از ۳/۲۵ mM تا ۱۰mM مقدار کمی کاهش یافته است که به دلیل افزایش سمیت در اثر افزایش غلظت سلنات در محیط می‌باشد. همچنین نتایج نشان دادند که میزان درصد تلقیح اولیه باکتری در این آزمایش‌ها با گذشت زمان تأثیر چندانی نداشته است. بیشترین تأثیر را ۸ ساعت اولیه تلقیح دارد. با گذشت زمان و با رشد و افزایش تعداد سلولها، سلولهای باکتری تقریباً قادر به احیای ۴۰ درصد از سلنات محیط می‌باشد. اما مطابق با اشکال ۳ و ۴، میزان احیای سلنات با زمان رابطه مستقیم دارد. به عبارتی درصد احیای سلنات با گذشت زمان بیشتر می‌گردد. بیشترین تأثیر زمان تا ۲۴ ساعت پس از رشد باکتری در مجاورت با سلنات سدیم می‌باشد. با گذشت زمان و اثر سمیت سلنات بر رشد باکتری، تأثیر زمان نیز کمتر می‌گردد. نهایتاً نتایج نشان دادند که باکتری *Bacillus* sp. Strain TR-6در شرایط بهینه پیشنهاد شده توسط نرم‌افزار Design-Expert 7.0 (۵/۲۴ درصد تلقیح باکتری، مدت زمان ۲۴ ساعت و مقدار غلظت سلنیم ۳/۸ mM) قادر به احیای کامل ۴۱/۲۵ درصد از سلنات محلول محیط به سلنیم عنصری می‌باشد.



شکل ۲:سطح‌های سه بعدی برهمکنش درصد تلقیح اولیه باکتری و مقدار غلظت نمک سلنات سدیم در احیای سلنات به سلنیم توسط باکتری *Bacillus* sp. Strain TR-6 (A) مدت زمان ۲۰ ساعت (B) مدت زمان ۳۲ ساعت (C) مدت زمان ۸ ساعت.



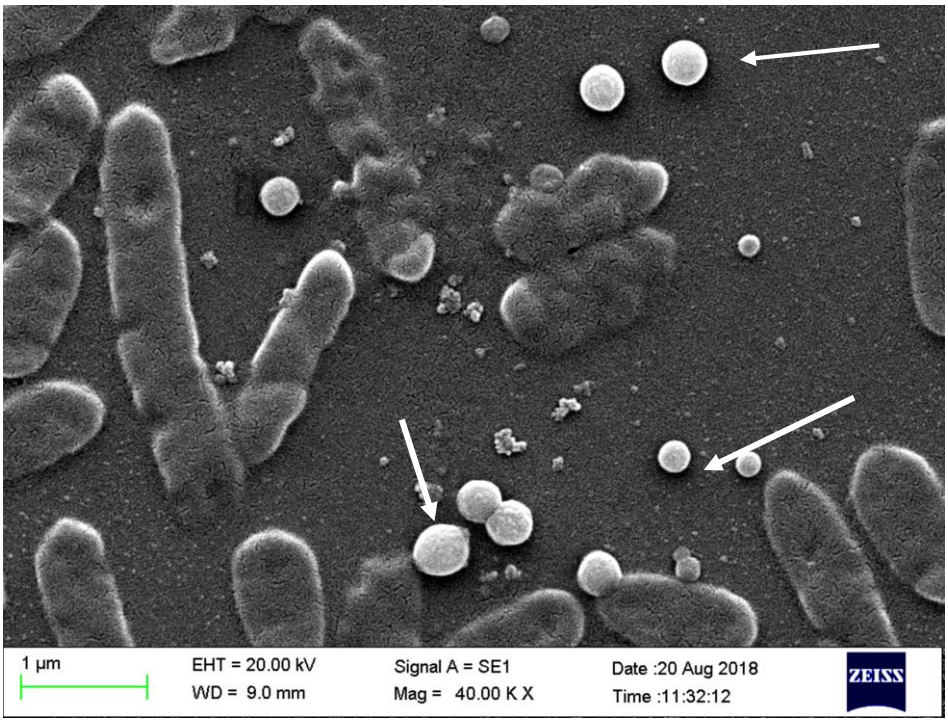
شکل ۳: سطح‌های سه بعدی برهمکنش زمان و مقدار غلظت نمک سلنات سدیم در احیای سلنات به سلنیم توسط باکتری *Bacillus* sp. Strain TR-6 (A) ۵ درصد تلقیح اولیه باکتری (B) ۷/۵ درصد تلقیح اولیه باکتری (C) ۱۰درصد تلقیح اولیه باکتری.



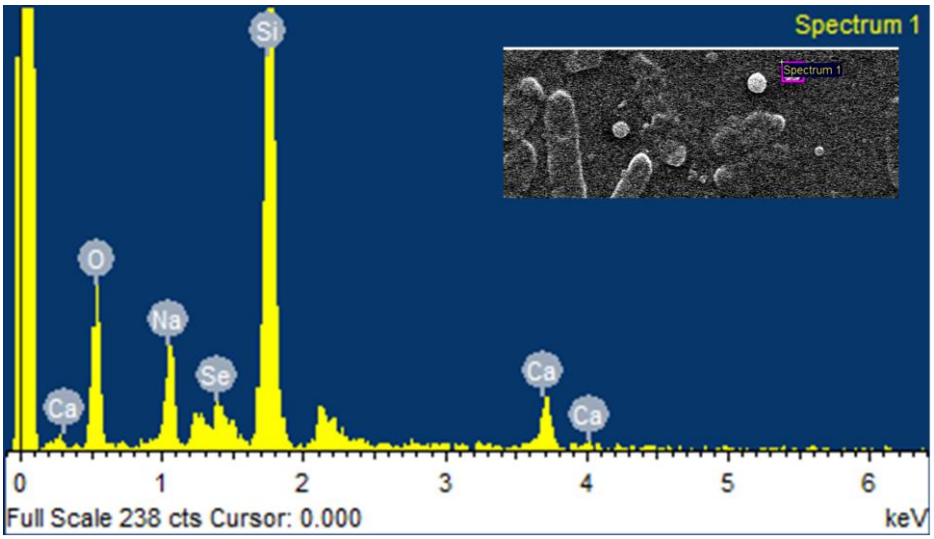
شکل ۴: سطح‌های سه بعدی برهمکنش زمان و تلقیح اولیه باکتری در احیای سلنات به سلنیم توسط باکتری *Bacillus* sp. Strain TR-6 (A) غلظت ۱mM نمک سلنات سدیم (B) غلظت ۵/۵ mM نمک سلنات سدیم (C) غلظت ۱۰ mM نمک سلنات سدیم.

تولید نانوذرات سلنیم توسط باکتری *Bacillus* sp. Strain TR-6 با میکروسکوپ الکترونی نگاره بررسی گردید. نتایج میکروسکوپی نشان دادند باکتری *Bacillus* sp. Strain TR-6 در مجاورت با اکسی آنیون سلنات قادر به تشکیل نانوذرات سلنیم است که داده‌های EDX نیز این موضوع را تأیید کرد (شکل ۵). امروزه تصویربرداری از محیط‌های کشت باکتریایی و جوامع میکروبی با میکروسکوپ الکترونی در تحقیقات دیگر نیز ثابت کرده است که اتم‌های سلنیم تشکیل شده در زمان احیای زیستی اکسی آنیون‌های سلنیم می توانند هسته‌زایی کنند و به تشکیل حالت‌های ساختاری متفاوت از Se^0 بیانجامند و نیز به صورت شکل‌های کروی رشد نمایند و به شکل سلنوسفرهای سلنیم (نانوذرات) در سیتوپلاسم، روی سطح سلول و در محیط پیرامون وجود داشته باشند (Butler *et al.*, 2012; Nancharaiah & Lens, 2015a). مطالعات مختلف شواهدی ارائه می‌دهند مبنی بر اینکه باکتری‌ها در میان سیستم‌های زیستی در تولید نانوذراتی با اندازه و شکل‌های مختلف کارآمدتر هستند. مثال‌هایی در این زمینه عبارتند از باکتری *Bacillus selenitireducens* که قادر به احیای اکسی آنیونهای سلنیم (سلنات و سلنیت) و تولید ذرات کروی به قطر ۲۰۰ نانومتر می‌باشد (Dobias et al., 2011). باکتری *Thauera selenatis* نیز یک باکتری گرم منفی است که قادر به احیای سلنات به سلنیت و سپس احیای سلنیت تولیدی در سیتوپلاسم به نانوسفرهای سلنیم می‌باشد (Butler *et al.*, 2012). همچنین محققان نشان دادند که نانوذرات سلنیم تشکیل شده توسط سه باکتری *Sulfurospirillium barnesii*، *Bacillus selenitireducens* و *Selenihalanaerobacter shriftii* از نظر ساختاری تفاوت منحصر به فردی با نانوذرات سلنیم تولید شده با روش غیر زیستی دارند. این تفاوت‌های ساختاری ناشی از تنوع آنزیم‌هایی است که عمل احیا را در این باکتری‌ها کاتالیز می‌کردند (Oremland *et al.*, 2004; Oremland *et al.*, 1989). به عبارتی می‌توان نتیجه گرفت که باکتری‌های احیاکننده اکسی آنیون‌های سلنیم دارای پتانسیل بی‌نظیری برای بیوسنتز فرم عنصری سلنیم و نانومواد سلنیدی تحت شرایط محیطی با استفاده از پیش ماده‌های سلنیم از مواد خام کم‌هزینه و یا پساب‌ها می‌باشند.

A



B



شکل ۵: (A) تصویر میکروسکوپ الکترونی نگاره از *Bacillus* sp. Strain TR-6 رشد کرده در محیط کشت LB حاوی اکسی آنیون سلنات (پیکان‌ها نشان دهنده نانوذرات سلنیم تولید شده می‌باشند). (B) نمودار حاصل از EDX نانوذارت تولید شده توسط باکتری *Bacillus* sp. Strain TR-6 در مجاورت با اکسی آنیون سلنات.

نتیجه‌گیری

امروزه میکروارگانیسم‌ها از جمله باکتری‌ها به عنوان میکروکارخانه‌های مهم تولید نانومواد سازگار با محیط زیست و ایمن مطرح هستند. مطالعات این تحقیق نشان داد که باکتری *Bacillus* sp. Strain TR-6 دارای پتانسیل معدنی‌سازی زیستی سلنیم از سلنات در شرایط هوازی می‌باشد. بنابراین باکتری مذکور نه تنها پتانسیل لازم برای زدودن سلنات از آب‌های آلوده را

دارد، بلکه می‌تواند آن را به شکل ارزشمند نانوذرات سلنیم تبدیل کند. با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان باکتری *Bacillus* sp. Strain TR-6 را به عنوان انتخابی باارزش در علم و کاربردهای زیست پالایی و نانو فناوری زیستی معرفی کرد. همچنین نتایج این پژوهش بیانگر این می‌باشد که روش سطح پاسخ می‌تواند به عنوان یک روش کارآمد برای طراحی آزمایش‌ها و بهینه‌سازی فرایندهای معدنی‌سازی زیستی سلنیم استفاده گردد. به‌طوری که با استفاده از این روش می توان بهینه سازی پارامترهای موثر بر فرایند را با تعداد کمتری از آزمایش‌ها به طور موثر انجام داد.

منابع

Butler, C.S., Debieux, C.M., Dridge, E.J., Splatt, P., Wright, M. 2012. Biomineralization of selenium by the selenate-respiring bacterium Thauera selenatis, Biochemical Society Transactions, 40(6), 1239-1243.

Dobias, J., Suvorova, E.I., Bernier-Latmani, R. 2011. Role of proteins in controlling selenium nanoparticle size. Nanotechnology, 22(19), 195605.

Eswayah, A.S., Smith, T.J., Gardiner, P.H. 2016. Microbial transformations of selenium species of relevance to bioremediation. Appl. Environ. Microbiol., 82(16), 4848-4859.

Nancharaiah, Y.V., Lens, P.N. 2015a. Selenium biomineralization for biotechnological applications. Trends in biotechnology, 33(6), 323-330.

Nancharaiah, Y.V., Lens, P.N.L. 2015b. Ecology and Biotechnology of Selenium-Respiring Bacteria. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 79(1), 61-80.

Oremland, R.S., Herbel, M.J., Blum, J.S., Langley, S., Beveridge, T.J., Ajayan, P.M., Sutto, T., Ellis, A.V., Curran, S. 2004. Structural and spectral features of selenium nanospheres produced by Se-respiring bacteria. Applied and environmental microbiology, 70(1), 52-60.

Oremland, R.S., Hollibaugh, J.T., Maest, A.S., Presser, T.S., Miller, L.G., Culbertson, C.W. 1989. Selenate reduction to elemental selenium by anaerobic bacteria in sediments and culture: biogeochemical significance of a novel, sulfate-independent respiration. Appl. Environ. Microbiol., 55(9), 2333-2343.

Piroeva, I., Atanassova-Vladimirova, S., Dimowa, L., Sbirkova, H., Radoslavov, G., Hristov, P., Shivachev, B. 2013. A simple and rapid scanning electron microscope preparative technique for observation of biological samples: application on bacteria and DNA samples. Bulg. Chem. Commun, 45(4), 510-515.

Preetha, B., Viruthagiri, T. 2007. Application of response surface methodology for the biosorption of copper using Rhizopus arrhizus. Journal of hazardous materials, 143(1-2), 506-510.

Raevskaya, A.E., Stroyuk, A.L., Kuchmiy, S.Y., Dzhagan, V.M., Zahn, D.R., Schulze, S. 2008. Annealing-induced structural transformation of gelatin-capped Se nanoparticles. Solid State Communications, 145(5-6), 288-292.

Razavi, A.S. 2019. Study of Biomineralization of Selenium by the Seleno-oxyanions Reducing Microorganisms, Master of Science Thesis, Islamic Azad University, Tehran Medical Sciences Branch.

Santos, S., Ungureanu, G ,.Boaventura, R., Botelho, C. 2015. Selenium contaminated waters: an overview of analytical methods, treatment options and recent advances in sorption methods. Science of the Total Environment, 521, 246-260.

Singh, R., Chadetrik, R., Kumar, R., Bishnoi, K ,.Bhatia, D., Kumar, A., Bishnoi, N.R., Singh, N. 2010. Biosorption optimization of lead (II), cadmium (II) and copper (II) using response surface methodology and applicability in isotherms and thermodynamics modeling. Journal of hazardous materials, 174(1-3), 623-634.

Sohbatzadeh Lonbar, H. 2016. Experimental investigation of operational parameters involved in uranium biosorption in fixed-bed columns using composite biosorbent of Pseudomonas-chitosan, PhD thesis. Amirkabir University of Technology & Nuclear Science and Technology Research Institute. ,

Soudi, M.R., Tajer MohammadGhazvini, P., Khajeh, K., Gharavi, S. 2009. Bioprocessing of seleno-oxyanions and tellurite in a novel Bacillus sp. strain STG-83: A solution to removal of toxic oxyanions in presence of nitrate. Journal of hazardous materials, 165(1-3), 71-77.

Stolz, J., Basu, P., Oremland, R. 2002. Microbial transformation of elements: the case of arsenic and selenium. International Microbiology, 5(4), 201-207.

Tajer- Mohammad-Ghazvini, P. 2007 .Study of microbial reduction of oxyanions under the condition of selenooxyanions–tellurite dual pollution, Master of Science Thesis. Alzahra University, Tehran, Iran.

Wadhwani, S.A., Shedbalkar, U.U., Singh, R., Chopade, B.A. 2016. Biogenic selenium nanoparticles: current status and future prospects. Applied microbiology and biotechnology, 100(6), 2555-2566.

Witek-Krowiak, A., Chojnacka, K., Podstawczyk, D., Dawiec, A., Pokomeda, K. 2014. Application of response surface methodology and artificial neural network methods in modelling and optimization of biosorption process. Bioresource Technology, 160, 150-160.

Yuan, Y., Zhu, J., Liu, C., Yu, S., Lei, L. 2015. Biomineralization of Se nanoshpere by Bacillus licheniformis. Journal of Earth Science, 26(2), 246-250.

Application of Response Surface Methodology in optimization of Selenate bioreduction to selenium nanoparticles by *Bacillus* sp. Strain TR-6

A.S. Razavi [1], P.Tajer-Mohammad-Ghazvini [2*], J.Hamedi [3]

Received: 2019.7.22
Accepted:2019.12.7

Abstract

Biomineralization of Selenium by bacteria not only has the potential to remove toxic Selenium oxyanions from the environment, but can also produce nano- scale elemental Selenium. In this work, the Response Surface Method (RSM) based on the Box- Behnken design was used for evaluation and optimization of different process parameters affecting on the bioreduction process of Selenate. The proposed second order model with a correlation coefficient $R^2 = 0.96$ appropriately predicted the process behavior and determined the 41.25 percent reduction of Selenate by *Bacillus* sp. Strain TR-6 at 5.24 percent initial bacterial inoculation, process time of 24 h and 3.8 mM concentration of Sodium Selenate was optimal. Scanning Electron Microscope (SEM) with the Energy Dispersive X-ray spectroscopy (EDX) confirmed the ability of the selected bacteria to produce Selenium nanospheres. Finally, *Bacillus* sp. Strain TR-6 is determined as a valuable candidate for nano- technologies and Selenium biomineralization processes.

Keywords: Bacterial Reduction; Selenium Oxyanions; Experimental Design; Nanobiotechnology.

1- Department of Microbiology, Faculty of Advance Science, Tehran Medical Science, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Materials and Nuclear Fuel Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, Tehran, Iran

*(Corresponding Author: ptajer@aeoi.org.ir)

3- Department of Biology, Faculty of Science, University of Tehran, Tehran, Iran