

## بهینه‌سازی حذف سدیم سلنیت توسط *Lactobacillus sp. Tra Cheese 6* به روش باکس - بنکن

مراحم آشنگرف<sup>۱\*</sup>، داود صادی<sup>۲</sup>

### خلاصه

مقدمه: غلظت‌های بالای سلنیت اثرات کارسینوژنی، سیتوتوکسیکی و ژنوتوکسیکی دارد. لذا حذف این آلاینده سمی قبل از ورود به محیط زیست از اهمیت خاصی در حفظ سلامت جامعه برخوردار است. در این پژوهش، با هدف بهینه‌سازی حذف سلنیت، از روش طراحی باکس - بنکن با هدف تخمین همزمان اثرات متغیرها بر روی راندمان حذف، بررسی اثر متقابل و تعیین مقادیر بهینه شده متغیرها در باکتری پروبیوتیک *Lactobacillus sp. Tra Cheese 6* استفاده گردید.

روش: اثرات ۴ فاکتور آزمایش شده (یون سلنیت، بیومس سلولی، نمک سدیم کلراید و دور همزن) با استفاده از روش طراحی باکس - بنکن سه سطحی، مورد بررسی قرار گرفت. پس از تجزیه و تحلیل آماری نتایج از طریق روش ANOVA، کلیه ضرایب رگرسیون درجه دوم تخمین زده شد. سپس با تلفیق نتایج به دست آمده و ترسیم یک معادله درجه دوم چند متغیره، نقطه بهینه به طور دقیق تعیین شد. از نرم افزار آماری Design Expert Software برای تحلیل نتایج استفاده شد.

یافته‌ها: بهترین شرایط برای حذف سلنیت عبارت از سلنیت در غلظت ۴۹/۵ میلی مولار، بیومس سلول در غلظت ۵۶ گرم در لیتر، نمک کلرید سدیم در غلظت ۴/۲ درصد وزنی / حجمی و دور همزن ۱۰۰ rpm بود. تحت شرایط بهینه شده فوق، راندمان حذف سلنیت در مخلوط واکنش تحت شرایط سلول‌های در حال استراحت *Lactobacillus sp. Tra Cheese 6* ۷۷/۱۲ درصد پس از ۲۴ ساعت واکنش بود.

نتیجه‌گیری: در این پژوهش روش سطح پاسخ بر مبنای طراحی باکس - بنکن در بهبود حذف سلنیت توسط باکتری پروبیوتیک *Lactobacillus sp. Tra Cheese 6* به طور موفقیت آمیز به کار گرفته شد.

واژه‌های کلیدی: حذف سلنیت، طراحی باکس - بنکن، روش سطح پاسخ، *Lactobacillus sp. Tra cheese 6*

۱- استادیار میکروبیولوژی، گروه علوم زیستی، دانشکده علوم، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران ۲- دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی - مولکولی، گروه علوم زیستی، دانشکده علوم، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

\* نویسنده مسؤول، آدرس پست الکترونیک: [m.ashengroph@uok.ac.ir](mailto:m.ashengroph@uok.ac.ir)

پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۱۱/۲۸

دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۹۴/۱۰/۱۴

دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۶/۱۱

## مقدمه

به تجمع زیستی، سمی‌ترین فرم اکسی‌آنیونی سلینیوم است. فعالیت‌های طبیعی، کشاورزی و صنعتی می‌تواند در آلودگی آب‌های زیرزمینی به سلیت دخیل باشد. فاضلاب پالایشگاه‌های نفت خام، حاوی مقادیر زیادی سلیت و یک منبع قابل توجه آلاینده‌گی با این ترکیب سمی است (۶). سطوح سمی سلیت موجود در خاک می‌تواند از طریق گیاهان جذب شود و به زنجیره‌ی مواد غذایی راه یابد و از این طریق، وارد بدن انسان‌ها و حیوانات شود (۷). مواجهه با تراکم‌های بالای سلینیوم محلول به‌ویژه در فرم سلیت، منجر به سلینوس (selenosis) می‌شود که از علائم آن می‌توان به تب، استفراغ، افت شدید فشار خون، ریزش مو، سفیدی ناخن، عصبانیت، خستگی و بیقراری، بروز آبسه‌های کبدی - روده‌ای و اختلال در تنفس اشاره نمود (۸). علاوه بر مسمومیت سلنوزیس، اکسی‌آنیون سلیت اثرات کارسینوژنی روی پروستات و کبد، سیتوتوکسیکی (توقف چرخه‌ی سلول و بازدارنده‌ی رشد سلول) و ژنوتوکسیکی (تأثیرگذاری بر DNA) دارد (۹). مشخص شده است که سطح بیش از حد سلینیوم ایجاد ROS (Reactive oxygen species) می‌کند که ارتباط نزدیکی با سرطان دارد. علاوه بر این یک ارتباط نزدیک بین سرطان‌زایی سلینیوم با رشد بیماری‌های مزمن دژنراتیو مانند اسکروز جانبی آمیوتروفیک و بیماری‌های قلبی عروقی وجود دارد (۱۰) و (۱۱). نشان داده شده که اکسی‌آنیون سمی سلیت باعث القای انتقال نفوذپذیری میتوکندری در سلول‌های HepG2 (human hepatocellular liver carcinoma cell line) با واسطه استرس اکسیداتیو می‌شوند که محرک سرطان است (۱۲). مطالعات مختلف در مورد ژنوتوکسیسیته فرم‌های سمی سلینیوم وجود دارد. مشابه سیتوتوکسیسیته، اکسی‌آنیون‌های سلینیوم از

سلینیوم از عناصر کمیاب است که به‌طور طبیعی در پوسته زمین، خاک و مواد معدنی یافت می‌شود. این عنصر خواص مشابهی با دیگر عناصر کالکوژن از جمله اکسیژن و گوگرد دارد؛ شباهت‌ها با گوگرد در زمینه‌ی بسیاری از فعل و انفعالات شیمیایی و بیولوژیک بین این دو عنصر می‌باشد (۱). سلینیوم به‌عنوان یکی از اجزای سازنده سلنوپروتئین، دارای نقش ساختاری و آنزیمی است و به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان و کاتالیست برای تولید هورمون فعال تیروئید مطرح است (۲). سلینیوم برای عملکرد مناسب سیستم ایمنی بدن مورد نیاز است و به‌نظر می‌رسد یک ماده مغذی در مقابله با توسعه حدت و مهار افراد HIV مثبت است. همچنین سلینیوم برای تحرک اسپرم مورد نیاز است و می‌تواند خطر سقط جنین را کاهش دهد (۳). علیرغم اثرات مفید سلینیوم، مواجهه حاد و یا مزمن با غلظت‌های بالای این ترکیب اثرات مخرب و زیانباری بر سلامت افراد و محیط زیست ایجاد می‌نماید. سمیت سلینیوم تنها به‌دلیل شباهت ساختاریش با گوگرد و قابلیت جایگزینی‌اش طی تجمع پروتئین‌ها مربوط نمی‌شود، بلکه به فشار اکسایشی هم مربوط می‌شود (۴). سلینیوم در طبیعت به دو فرم معدنی (سلیت، سلنات، سلنید و سلینیوم فلزی) و آلی (سلنوآمینو اسیدها) وجود دارد. فرم‌های معدنی موجود در محیط زیست‌های آبی سمیت بیشتری (بیش از ۴۰ برابر) نسبت به فرم‌های آلی دارند. گونه‌های سلینیوم به‌ویژه گونه‌های غیر ارگانیک آن با تیول‌ها واکنش دارند و رادیکال‌های آزاد اکسیژن را تولید می‌کنند که سمیت سلینیوم را به سلول‌ها منتقل می‌کند (۵،۶). از بین فرم‌های سلینیوم، اکسی‌آنیون سلیت با توجه به حلالیت بالا و تمایل

طریق تولید ROS باعث القای ژنوتوکسیسیته می‌شوند. نتایج نشان داده است که سلنیوم به‌طور مستقیم می‌تواند مانع از توانایی سلولی در ترمیم DNA شود و به نحوی باعث اختلال در پایداری ژنومی، آسیب اکسیداتیو DNA و شکست ساختار DNA می‌شود (۹). 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 وجود دارند (۱۳). با این وجود، روش‌های مذکور از نظر زیست محیطی مشکل ساز، گران قیمت و نیازمند تجهیزات خاص بوده و از همه مهم‌تر ناکارآمدی کاتالیست‌های شیمیایی در حذف یا کاهش غلظت‌های پایین سلنیت استفاده اقتصادی از روش‌های فیزیکی شیمیایی را با چالش مواجه کرده است (۵). تکنیک‌های جدید مثل زیست پالایی میکروبی، به دلیل بازده بالایی که نسبت به تکنیک‌های فیزیکی و شیمیایی دارند مقرون به صرفه‌ترند. میکروارگانیسم‌ها نقش کلیدی در دگرگونی سلنیوم بازی می‌کنند. دگرگونی‌ها می‌توانند شامل تبدیل فرم‌های بسیار محلول و در دسترس بیولوژیکی آنیون سلنیت به فرم نامحلول و غیرقابل دسترس سلنیوم عنصری از طریق واکنش احیا باشند. همچنین، برخی از میکروارگانیسم‌ها می‌توانند سمیت اکسی آنیون‌های سلنیوم را از طریق متیلاسیون کاهش دهند (۶). لاکتوباسیل‌ها با توجه به ماهیت پروبیوتیک بودن و پوشش دادن استانداردهای (Generally Recognized As Safe) GRAS، می‌توانند به‌عنوان زیست کاتالیزگرهای ایمن برای آزمایشات زیست پالایی اکسی آنیون سمی سلنیت در شرایط آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار گیرند. هدف این مطالعه بهینه‌سازی متغیرهای تأثیرگذار بر فرایند حذف

زیستی سلنیت در لاکتوباسیلوس بومی جدا شده با استفاده از روش پاسخ سطح است. روش‌های صفحه پاسخ (Response surface modeling)، کمکی مضاعف برای یافتن حالت بهینه فاکتورها می‌باشد و نشان‌دهنده چگونگی تأثیر فاکتورها (در دامنه مورد مطالعه) بر نتایج آزمایشات است. علاوه بر این اثر متقابل فاکتورها را نیز در بر می‌گیرد. در طراحی آزمایشات به‌روش صفحه پاسخ، ما می‌توانیم بیشترین اطلاعات را با کمترین تعداد آزمایش به‌دست آوریم. طراحی به‌منظور تعیین اهداف و فاکتورهای مؤثر بر اهداف شروع شده و سپس اهداف در قالب یک معادله ریاضی مدل می‌شوند. از طریق معادله ریاضی پیش‌بینی شده می‌توان به‌طور دقیق مقادیر بهینه شده متغیرهای مورد آزمایش را تعیین نمود (۱۴). برای رسیدن به این هدف، طی آزمایش‌های غربال‌گری، یک سویه لاکتوباسیلوس بومی مقاوم به سلنیت جداسازی و شناسایی شد و سپس تأثیر پارامترهای مختلف بر روی حذف سلنیت در شرایط مختلف و با به‌کارگیری روش پاسخ سطحی بررسی و متغیرهای بهینه انتخاب شدند. در این بررسی برای اولین بار، طراحی باکس-بنکن در بهبود حذف سلنیت توسط باکتری پروبیوتیک جداسازی شده *Lactobacillus sp. Tra cheese 6* تحت شرایط سلول‌های در حال استراحت (سلول فعال از لحاظ متابولیکی و فاقد رشد)، مورد ارزیابی قرار گرفت.

### روش بررسی

#### میکروارگانیسم و شرایط رشد

میکروارگانیسم مورد استفاده باکتری مولد اسید لاکتیک *Lactobacillus sp. Tra cheese 6* بود که دارای مقاومت ذاتی بالا نسبت به یون سمی سلنیت (۱۲۵)

میلی مولار) بود. لاکتوباسیلوس مذکور از یک نمونه پنیر محلی در استان کردستان جداسازی و با شماره دسترسی KT033397 در پایگاه داده‌های ژنی NCBI ثبت شد. برای رشد و نگهداری سوبه باکتری مذکور از محیط کشت تجاری MRS (Man-Rogosa-Sharpe) تهیه شده از شرکت QUELAB استفاده شد.

#### آزمایشات حذف میکروبی سلنیت

به منظور ارزیابی میزان سلنیت موجود در محیط واکنش از روش رنگ سنجی بر مبنای روش پیشنهادی Hurlbut و همکاران (۱۵) استفاده شد. در این روش معرف ۳ و ۳-دی آمینو بنزیدین با یون سلنیت واکنش داده و یک ترکیب زرد رنگ ایجاد می‌شود که پس از استخراج در حلال تولوئن، جذب مخلوط در ۴۲۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (SPECORD 210, Carel Zeiss Technology, Germany) خوانده می‌شود. برای رسم منحنی استاندارد، ابتدا غلظت‌های مختلف از محلول‌های استاندارد سلنیت (۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۱۲۵ میلی گرم در لیتر) تهیه و سپس به کمک رسم منحنی کالیبراسیون و تهیه معادله خط منحنی استاندارد ( $Y=0.0116X + 0.252$   $R^2= 0.9901$ )، غلظت سلنیت باقیمانده در مخلوط واکنش زیست تبدیلی تعیین گردید. آزمایش‌های حذف میکروبی سلنیت در فلاسک‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط بافری فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار با pH برابر ۷/۲، غلظت‌های مختلف از یون سلنیت (۴۰، ۴۵ و ۵۰ میلی‌مولار)، غلظت‌های مختلف نمک NaCl (۳، ۴ و ۵ درصد وزنی/حجمی) و در حضور غلظت‌های متفاوت از بیومس سلول باکتری (۴۰، ۵۰ و ۶۰ گرم در لیتر) تهیه شده به‌عنوان بیوکاتالیزور، تحت شرایط

دمایی ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دوره‌های مختلف همزن (۸۰، ۱۰۰ و ۱۲۰) به مدت ۲۴ ساعت انجام شد. برای تهیه بیومس سلول باکتری مذکور و استفاده از آن به‌عنوان سلول در حال استراحت در آزمایشات حذف میکروبی سلنیت، ابتدا باکتری لاکتوباسیلوس در محیط کشت مایع MRS به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد. پس از برداشت سلول به کمک سانتریفیوژ با دور ۴۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه و شستشو در بافر فسفات، از سلول‌های باکتری برداشت شده به‌عنوان کاتالیزور در آزمایشات حذف سلنیت استفاده شد (۱۶).

#### طراحی آزمایش به روش باکس-بنکن (Box-Behnken)

پس از شناسایی فاکتورهای مؤثر و تعیین سطح مورد نظر از طریق روش تک عاملی (One factor at a time)، از روش سطح پاسخ بر مبنای طراحی باکس-بنکن برای ارزیابی اثر چهار متغیر مستقل بر حذف سلنیت توسط سلول‌های در حال استراحت لاکتوباسیل بومی Tra cheese 6 *Lactobacillus* sp. استفاده شد (۱۷). برای این منظور اثرات ۴ فاکتور آزمایش شده (یون سلنیت، بیومس سلولی بر حسب وزن تر سلولی، نمک سدیم کلراید و دور شیکر) در سه سطح (پایین، متوسط و بالا؛ بصورت کدهای تعریف شده ۱۰- و ۱+) در قالب ۲۷ آزمایش طراحی شده با استفاده از روش طراحی باکس-بنکن سه سطحی، مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش‌ها سه بار تکرار گردید و پس از تجزیه و تحلیل آماری نتایج از طریق روش ANOVA، کلیه ضرایب رگرسیون درجه دوم (Intercept) تخمین زده شد. سپس با تلفیق نتایج به‌دست آمده و ترسیم یک معادله درجه دوم چند متغیره (Second order polynomial equation)، نقطه بهینه به‌طور دقیق تعیین شد. تجزیه و تحلیل آماری معادلات چند

سلنیت اولیه، غلظت بیومس سلولی اولیه (بر حسب وزن تر سلولی)، غلظت نمک کلرید سدیم و همچنین دور همزن در سویه بومی 6 Lactobacillus sp. isolate Tra cheese استفاده شد. این روش اثر چهار فاکتور مذکور (به عنوان متغیرهای مستقل) را روی حذف سلنیت به عنوان پاسخ سطحی، مورد بررسی قرار می دهد. هر کدام از متغیرهای مستقل در سه سطح پایین (low, -1)، متوسط (0) و بالا (high, +1) بر حسب مقادیر کد شده تعریف شدند (جدول ۱).

متغیره، تعیین ضرایب مدل رگرسیون درجه دوم و همچنین آثار فاکتورها بر متغیرها با استفاده از نرم افزار آماری (Version 7, State-Ease Inc, USA) Design Expert Software انجام شد.

## نتایج

پس از انتخاب فاکتورهای مطلوب، از روش طراحی باکس- بنکن به عنوان یکی از روش های مؤثر سطح پاسخ، به منظور بهینه سازی حذف میکروبی سلنیت از لحاظ میزان

جدول ۱. مقادیر واقعی سطوح متغیرها و کدهای تعریف شده

متغیرها	مقادیر کد شده	مقادیر واقعی	مقادیر کد شده	مقادیر واقعی	مقادیر کد شده	مقادیر واقعی
سلنیت (میلی مولار)	۱-	۴۰	۰	۴۵	+۱	۵۰
بیومس بر حسب وزن تر سلول (گرم در لیتر)	۱-	۴۰	۰	۵۰	+۱	۶۰
کلرید سدیم (درصد وزنی/حجمی)	۱-	۳	۰	۴	+۱	۵
دور همزن (rpm)	۱-	۸۰	۰	۱۰۰	+۱	۱۲۰

طراحی مورد نظر شامل ۲۷ آزمایش مختلف بود. حذف سلنیت به عنوان سطح پاسخ به متغیرها در نظر گرفته شد. در جدول ۲ نتایج آزمایشات انجام شده به وسیله طراحی باکس- بنکن و همچنین درصد حذف سلنیت به دست آمده و پیش بینی شده نشان داده شده است. در روش های سطح پاسخ، برای هر متغیر وابسته مدلی تعریف می شود که آثار اصلی و متقابل فاکتورها را بر روی هر متغیر جداگانه بیان می نماید. در این پژوهش از یک مدل تجربی چند جمله ای درجه دوم برای بررسی چهار متغیر مورد آزمایش استفاده شد. پاسخ سیستم آزمایشی بر اساس معادله زیر انجام گرفت:

طراحی مورد نظر شامل ۲۷ آزمایش مختلف بود. حذف سلنیت به عنوان سطح پاسخ به متغیرها در نظر گرفته شد. در جدول ۲ نتایج آزمایشات انجام شده به وسیله طراحی باکس- بنکن و همچنین درصد حذف سلنیت به دست آمده و پیش بینی شده نشان داده شده است. در روش های سطح پاسخ، برای هر متغیر وابسته مدلی تعریف می شود که آثار اصلی و متقابل فاکتورها را بر روی هر متغیر جداگانه بیان می نماید. در این پژوهش از یک مدل تجربی چند جمله ای درجه دوم برای بررسی چهار متغیر مورد آزمایش استفاده شد. پاسخ سیستم آزمایشی بر اساس معادله زیر انجام گرفت:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 +$$

جدول ۲. طراحی آزمایش باکس- بنکن بر حسب متغیرهای کد شده و راندمان‌های حذف سلنیت به دست آمده و پیش بینی شده

آزمایش	سلنیت (میلی مولار)	بیومس سلول (گرم در لیتر)	کلرید سدیم (٪ وزنی /حجمی)	دور همزن (rpm)	راندمان حذف سلنیت (٪)	
					مشاهده شده	پیش بینی شده
آزمایش ۱	۴۵	۶۰	۵	۱۰۰	۶۰/۶	۵۹/۴
آزمایش ۲	۴۵	۵۰	۵	۱۲۰	۵۲/۳	۵۲/۸
آزمایش ۳	۴۵	۶۰	۴	۸۰	۶۶/۴	۶۶
آزمایش ۴	۴۵	۵۰	۴	۱۰۰	۶۷/۲	۶۸
آزمایش ۵	۴۵	۶۰	۳	۱۰۰	۸۴/۲	۸۳/۴
آزمایش ۶	۵۰	۵۰	۴	۱۲۰	۷۷/۵	۷۵
آزمایش ۷	۴۰	۴۰	۴	۱۰۰	۷۸/۳	۷۶/۶
آزمایش ۸	۴۵	۴۰	۵	۱۰۰	۷۹/۵	۷۸/۵
آزمایش ۹	۴۵	۵۰	۵	۸۰	۸۵/۲	۸۴/۳
آزمایش ۱۰	۵۰	۶۰	۴	۱۰۰	۸۷/۲	۸۷/۷
آزمایش ۱۱	۴۰	۵۰	۴	۱۲۰	۶۰/۸	۵۸/۲
آزمایش ۱۲	۴۵	۴۰	۴	۸۰	۷۹/۴	۸۰/۶
آزمایش ۱۳	۵۰	۴۰	۴	۱۰۰	۶۵/۵	۶۴/۱
آزمایش ۱۴	۴۵	۵۰	۴	۱۰۰	۶۸/۵	۶۸
آزمایش ۱۵	۴۰	۵۰	۴	۸۰	۶۹/۶	۷۰/۳
آزمایش ۱۶	۵۰	۵۰	۴	۸۰	۷۵/۲	۷۶
آزمایش ۱۷	۴۰	۶۰	۴	۱۰۰	۵۲/۶	۵۲/۷
آزمایش ۱۸	۴۰	۵۰	۵	۱۰۰	۶۳/۲	۶۴/۵
آزمایش ۱۹	۴۰	۵۰	۳	۱۰۰	۶۵/۳	۶۷
آزمایش ۲۰	۴۵	۵۰	۴	۱۰۰	۶۸/۳	۶۸
آزمایش ۲۱	۴۵	۵۰	۳	۱۲۰	۸۳/۲	۸۲/۹
آزمایش ۲۲	۴۵	۵۰	۳	۸۰	۶۶/۲	۶۴/۵
آزمایش ۲۳	۵۰	۵۰	۵	۱۰۰	۷۲/۲	۷۳/۳
آزمایش ۲۴	۴۵	۴۰	۴	۱۲۰	۵۶/۵	۵۹/۶
آزمایش ۲۵	۵۰	۵۰	۳	۱۰۰	۷۹/۵	۸۰/۹
آزمایش ۲۶	۴۵	۴۰	۳	۱۰۰	۶۵/۲	۶۴/۷
آزمایش ۲۷	۴۵	۶۰	۴	۱۲۰	۷۲/۳	۷۳/۸

جدول ۳ ارائه شده است. همانگونه که در جدول مشاهده می شود، مقادیر بالای F-value و همچنین مقادیر به دست آمده از  $P < 0.001$  نشان می دهد که مدل

از آنالیز آماری داده ها به منظور تعیین مناسب بودن مدل تجربی به کار رفته استفاده شد. نتایج آنالیز واریانس (ANOVA) مدل تجربی چند جمله ای پاسخ سطحی در

راندمان حذف سلنیت است. در مجموع می‌توان نتیجه گرفت که نتایج حاصل با مدل آزمایشی استفاده شده کاملاً مطابقت دارد.

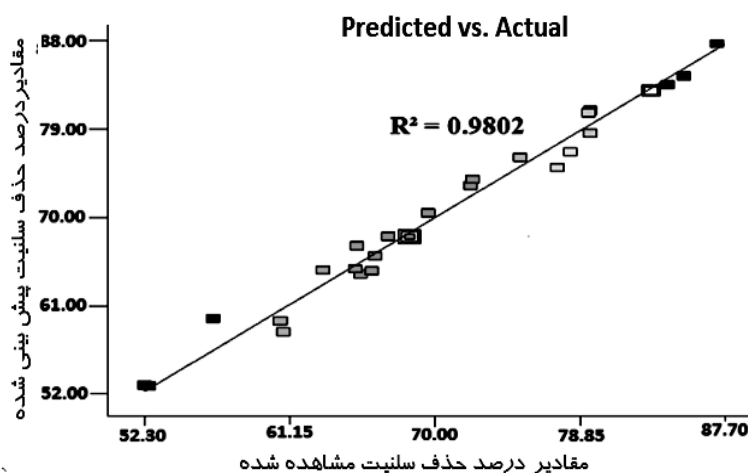
استفاده شده بسیار معنی‌دار است همچنین همانطور که در جدول مشاهده می‌شود، میانگین مربعات عدم برازش خطی (Lack of fit) نیز غیر معنی‌دار است که نشان دهنده برازش مدل درجه دو و وجود نداشتن سایر روابط در تأثیر بر میزان

جدول ۳. نتایج آنالیز واریانس (ANOVA) مدل تجربی چند جمله‌ای پاسخ سطحی برای حذف میکروبی سلنیت توسط لاکتوباسیلوس سویه *Tra cheese6*

P-value Probability > F	F Value	Mean Square	Degrees of freedom (df)	Sum of Squares	
significant < 0.0001	42/49	171/69	14	2403/66	مدل تجربی استفاده شده
< 0.0001	93/41	377/44	1	377/44	سلنیت
0.8771	0.25	0.10	1	0.10	بیومس سلول
0.0009	19/31	78/03	1	78/03	کلرید سدیم
0.0001	32/02	129/36	1	129/36	دور همزن
< 0.0001	139/02	561/69	1	561/69	بیومس سلول × سلنیت
0.2202	1/67	6/76	1	6/76	کلرید سدیم × سلنیت
0.0172	7/62	30/80	1	30/80	دور همزن × سلنیت
< 0.0001	88/88	359/10	1	359/10	کلرید سدیم × بیومس سلول
< 0.0001	51/32	207/36	1	207/36	دور همزن × بیومس سلول
< 0.0001	154/07	622/50	1	622/50	دور همزن × کلرید سدیم
0.2237	1/65	6/65	1	6/65	سلنیت × سلنیت
0.1875	1/95	7/89	1	7/89	بیومس سلول × بیومس سلول
0.0202	7/16	28/93	1	28/93	کلرید سدیم × کلرید سدیم
0.3596	0/91	3/67	1	3/67	دور همزن × دور همزن
		4/04	12	48/49	<b>Residual</b>
not significant 0.971	9/70	4/75	10	47/51	<b>Lack of Fit</b>
		0/49	2	0/98	<b>Pure Error</b>
			26	2452/15	<b>Cor Total</b>

لاکتوباسیلوس به کار گرفته شده مربوط به متغیرهای وابسته مورد استفاده می‌باشد و تنها کمتر از ۲ درصد از این تغییرات قابل توجه با مدل تجربی نمی‌باشد. بنابراین مقدار بالای  $R^2$  خود مدرک دیگری دال بر مناسب بودن مدل تجربی استفاده شده در این مطالعه می‌باشد.

در شکل (۱) رابطه خطی بین مقادیر حذف سلنیت اندازه‌گیری شده و مدل تجربی استفاده شده قابل مشاهده است. همانگونه که در شکل می‌توان دید ضریب رگرسیون مدل خطی برازش  $R^2$  برابر است با ۹۸/۰۲ که اشاره بر این دارد که بیش از ۹۸ درصد تغییرات در حذف سلنیت توسط



شکل ۱. رابطه خطی بین حذف سلنیت اندازه‌گیری شده و مدل تجربی

(غلظت سلنیت برحسب میلی‌مولار)، B (غلظت بیومس سلول بر حسب گرم در لیتر)، C (غلظت کلرید سدیم برحسب گرم در لیتر) و D (دور همزن برحسب rpm) می‌باشد. با حل معادله مذکور می‌توان نقطه بهینه حذف سلنیت را تعیین نمود. حل معادله مذکور نیازمند تعیین مقادیر بهینه شده متغیرهای سلنیت، بیومس سلول، کلرید سدیم و دور همزن می‌باشد که در ادامه توضیح داده شده است. تعیین شرایط بهینه به دو روش بررسی صفحات پاسخ و پیش بینی نقاط بهینه از طریق نرم افزار امکان پذیر است. به کمک رسم نمودارهای سه بعدی (صفحه پاسخ) حاصل از معادلات چند متغیره و همچنین خطوط کنتور حاصل از آنها می‌توان شرایط بهینه را تعیین نمود. در واقع خطوط

پس از اطمینان از مناسب بودن مدل تجربی چند جمله‌ای استفاده شده، از آنالیز رگرسیون چندگانه با کمک نرم افزار Design Expert برای تعیین ضرایب فازی معادله رگرسیون و در نهایت حل معادله درجه دوم چند متغیره با هدف پیدا کردن نقطه بهینه استفاده شد. براساس نتایج آنالیز رگرسیون و قرار دادن ضرایب فازی معادله رگرسیون در معادله چند جمله‌ای درجه دوم از معادله زیر می‌توان برای پیش‌بینی بهینه حذف میکروبی سلنیت استفاده نمود:

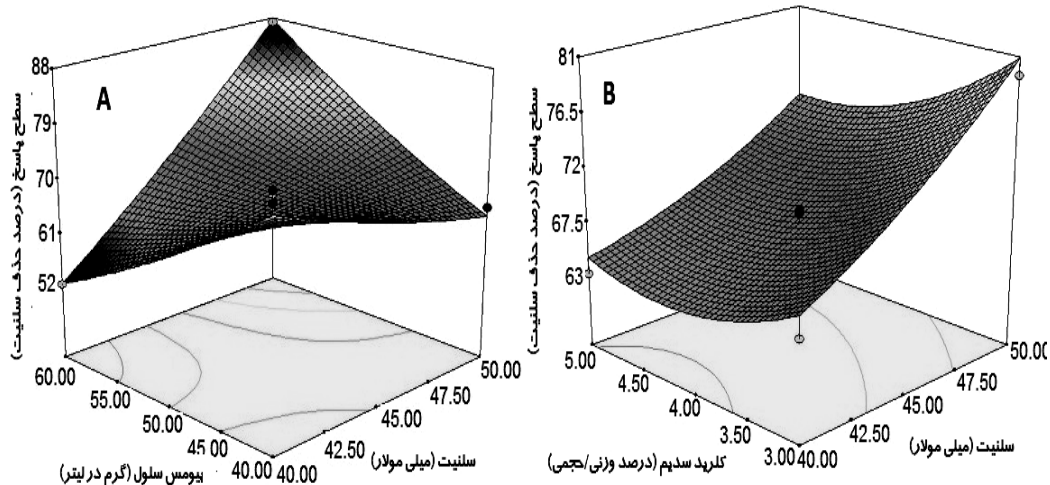
$$R = +68.00 + 5.61A - 0.092B - 2.55C - 3.28D + 11.85AB - 1.30AC + 2.77AD - 9.48BC + 7.20BD - 12.47CD + 1.12A^2 + 1.22B^2 + 2.33C^2 + 0.83D^2$$

در این معادله R: پاسخ سطحی (راندمان حذف سلنیت توسط باکتری لاکتوباسیلوس سویه 6 Tra cheese)، A

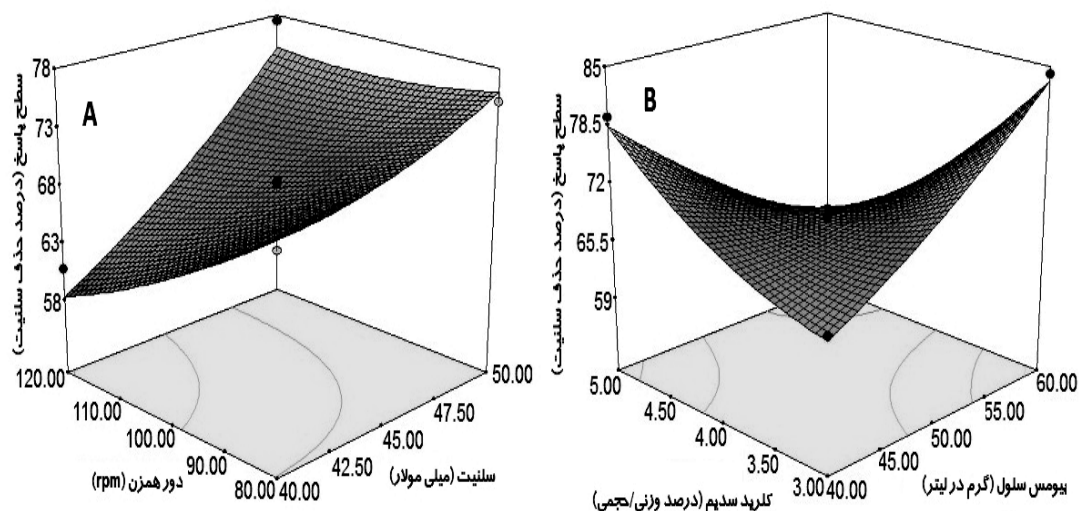


کاسته می‌شود (۱۴). اثر متقابل سلنیت و بیومس سلول (A) و همچنین سلنیت و نمک کلرید سدیم (B) بر روی میزان حذف سلنیت در شکل ۲ ارائه شده است. اثر متقابل سلنیت و دور همزن (A) و همچنین بیومس سلول و نمک سدیم کلراید (B) بر حذف سلنیت در شکل ۳ ارائه شده است. در شکل ۴ اثر متقابل بیومس سلول و دور همزن (A) و همچنین نمک سدیم کلراید و دور همزن (B) بر حذف سلنیت نشان داده شده است.

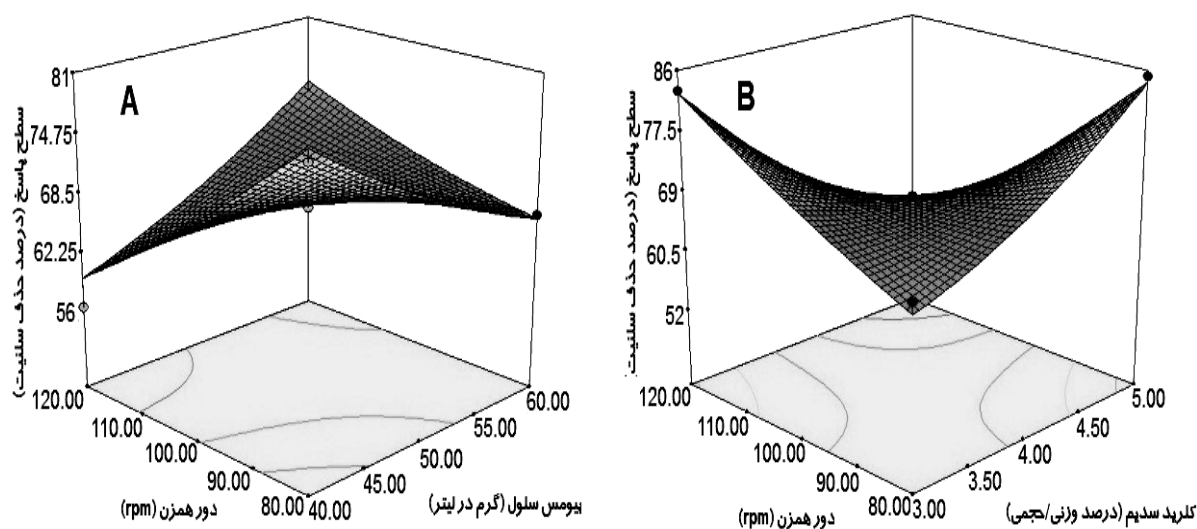
کنتور انعکاس تصاویر سه بعدی بر روی صفحه مسطح است. از کاربردهای مهم دیگر نمودارهای صفحه پاسخ، بررسی اینترکشن‌ها می‌باشد. در واقع این نوع نمودارها نشان دهنده اثر همزمان دو فاکتور مستقل بر روی پاسخ می‌باشند. شکل خطوط کنتور بیانگر معنادار بودن یا نبودن اینترکشن بین متغیرهای مستقل است. چنانچه خطوط کنتور بیضی شکل باشد، نشان از رابطه معنادار مثبت اینترکشن بین متغیرهای وابسته است و هرچه خطوط به دایره ای شکل نزدیکتر باشد از شدت اینترکشن بین متغیرهای وابسته



شکل ۲- (A) اثر متقابل سلنیت و بیومس سلول روی حذف سلنیت و (B) اثر متقابل سلنیت و کلرید سدیم روی حذف سلنیت



شکل ۳- (A) اثر متقابل سلنیت و دور همزن روی حذف سلنیت و (B) اثر متقابل بیومس سلول و کلرید سدیم روی حذف سلنیت



شکل ۴. (A) اثر متقابل بیومس سلول و دور همزن روی حذف سلنیت و (B) اثر متقابل کلرید سدیم و دور همزن روی حذف سلنیت

بین بیومس سلول و نمک کلرید سدیم می باشد. با توجه به پیچیدگی نمودارهای پاسخ سطحی، می توان به کمک point prediction نرم افزار به طور دقیق نقاط بهینه شده متغیرهای استفاده شده را تعیین نمود. براساس نتایج به دست آمده از طریق نرم افزار نقاط بهینه فاکتورهای مورد مطالعه (برحسب کدهای تعریف شده) در جدول ۴ آورده شده است. همانگونه که اشاره شد، نرم افزار نقاط بهینه شده را برحسب کدهای تعریف شده (-۱، ۰ و +۱) به ما می دهد و بنابراین بایستی آنها را به کدهای واقعی تبدیل کنیم. برای به دست آوردن مقادیر واقعی فاکتورهای بهینه شده می توان از فرمول زیر استفاده نمود:

$$Xi = \frac{xi - x0}{\Delta xi}$$

که در آن  $Xi$ : مقادیر کد شده،  $xi$ : مقادیر واقعی،  $x0$ :

مقدار واقعی فاکتور در سطح متوسط (۰) و  $\Delta xi$ : شیب تغییرات سطوح فاکتور می باشد.

با بررسی نمودارهای سه بعدی در شکل های ۲، ۳ و ۴ نتایج زیر حاصل شده است. با افزایش میزان یون سمی سلنیت از ۴۰ تا ۴۷/۵ میلی مولار بر درصد حذف سلنیت افزوده شده است و مقدار بهینه ۴۷/۵ میلی مولار تخمین زده شده است. با افزایش غلظت بیومس سلول از ۴۰ تا نزدیک به ۵۵ گرم در لیتر بر میزان حذف سلنیت افزوده شده است. با این حال، در غلظت های بالاتر از میزان حذف کاسته شده است. مقدار بهینه نمک سدیم کلراید بین ۵۵ تا ۶۰ گرم در لیتر تخمین زده شده است. با افزایش نمک کلرید سدیم از ۳ تا نزدیک به ۴/۵ درصد بر میزان حذف افزوده شده است. مقدار بهینه نمک کلرید سدیم بین ۴ تا ۴/۵ درصد تخمین زده شده است. با افزایش دور همزن از ۸۰ تا ۱۰۰ بر میزان حذف افزوده شده است. با این حال، در دورهای بالاتر همزن از میزان حذف کاسته شده است. میزان بهینه بین ۱۰۰ تا ۱۱۰ rpm تخمین زده شده است. با بررسی خطوط کنتور نمودارها می توان مشاهده نمود که بیشترین اینترکشن بین سلنیت و بیومس سلول و کمترین اینترکشن

با حل معادله بالا نقاط بهینه فاکتورهای سلنیت، بیومس سلول، نمک سدیم کلراید و دور همزن بر حسب مقادیر واقعی محاسبه می شود که نتایج آن در جدول ۴ آورده شده است.

جدول ۴. نتایج تعیین مقادیر بهینه شده فاکتورهای مورد مطالعه جهت بهینه سازی حذف سلنیت توسط لاکتوباسیلوس Cheese tra6

نقاط بهینه بر حسب کدهای تعریف شده	نقاط بهینه بر حسب کدهای واقعی
A: سلنیت	۰/۹۰۸
B: بیومس سلول	۰/۶۰۳۲
C: کلرید سدیم	۰/۲۰۰۶
D: دور همزن	۰/۰۰۵۶
	۴۹/۵ میلی مولار
	۵۶ گرم در لیتر
	۴/۲ درصد وزنی/حجمی
	۱۰۰ rpm

انکوباسیون انجام شد. براساس نتایج به دست آمده سویه مذکور تحت شرایط مذکور قادر به حذف ۷۷/۱۲ درصدی سلنیت بود که با توجه به درصد سلنیت حذف شده تحت شرایط بهینه پیش بینی شده توسط نرم افزار (۷۸/۹۴)، راندمان های به دست آمده تحت شرایط آزمایش و پیش بینی شده در فاصله مطلوب قرار گرفته است و بنابراین، طراحی آزمایش درست و بهینه سازی به پایان می رسد.

#### بحث

حذف باکتریایی سلنیت به فرم های کمتر سمی از جمله فرم عنصری سلنیوم، در سویه های باکتری متعلق به جنس های *Bacillus*، *Pseudomonas*، *Methylococcus*، *Stenotrophomonas*، *Tetrathobacter*، *Comamonas*، *Aeromonas* و *Agrobacterium* گزارش شده است که پیشنهاد می کند این قابلیت به عنوان یک روش اصلاحی برای کاهش یا حذف اکسی آنیون های سمی سلنیوم از آب های سطحی و پساب های صنعتی به کار گرفته شود (۱۸). در مطالعه صورت گرفته توسط Faisal و Ikram، میزان حذف سلنیت توسط باکتری *Bacillus pumilus* به میزان ۹۷

برای تعیین درصد بهینه حذف سلنیت تحت شرایط بهینه فاکتورها، نقاط بهینه شده فاکتورها (بر حسب کدهای تعریف شده) را در معادله رگرسیون به دست آمده قرار داده و معادله حل می شود. براساس نتایج به دست آمده درصد حذف میکروبی سلنیت تحت شرایط بهینه شده ۷۸/۹۴ درصد می باشد.

#### انجام آزمایش تاییدی

در این مرحله میزان حذف سلنیت پیش بینی شده تحت شرایط بهینه پاسخ سطحی، با میزان حذف به دست آمده در همین شرایط با یکدیگر مقایسه می شود و چنانچه در فاصله مطلوب قرار گیرد طراحی آزمایش درست و بهینه سازی به پایان می رسد. به همین دلیل آزمایشی تحت شرایط بهینه پیش بینی شده توسط نرم افزار با حضور ۵۶ گرم در لیتر بیومس سلول باکتری لاکتوباسیلوس سویه 6 Tra cheese به عنوان زیست کاتالیزگر، ۴۹/۵ میلی مولار یون سلنیت، ۴/۲ درصد نمک کلرید سدیم در محیط بافر فسفات ۱۰۰ میلی مولار با pH برابر ۷/۲ تحت شرایط دمایی ۳۷ درجه سانتی گراد و دور همزن بهینه ۱۰۰ rpm پس از ۲۴ ساعت

یکدیگر اثرات یکدیگر را تشدید و یا خنثی کنند در نظر گرفته نمی‌شود (۲۳). امروزه برای رفع این مشکل از روش‌های آماری و مهندسی محیط کشت مانند روش سطح پاسخ استفاده می‌شود. با استفاده از این روش تعداد کمتری آزمایش مورد نیاز بوده و برای سیستم‌های چند فاکتوری نیز مفید است. در این روش اثر متقابل میان فاکتورهای گوناگون نیز در نظر گرفته می‌شود (۲۴). روش‌های پاسخ سطحی به‌طور موفقیت آمیزی در بسیاری از پروسه‌های بیوتکنولوژی استفاده شده‌اند. از جمله فرآیندهای موفق بهینه شده با روش RSM می‌توان به بهینه سازی تولید اسید لاکتیک (۲۵)، اسید سیتریک (۲۶)، گزلیتول (۲۷)، بهینه سازی فرایند بیوکانورژن لجن فعال (۲۸)، بهینه سازی تولید آنزیم لپاز (۲۹)، آنزیم کیتیناز (۳۰)، بهینه کردن حذف و احیای کرومات (۳۱) و بهینه‌سازی فرآیند تولید وانیلین (۳۲) اشاره نمود. علیرغم کاربرد گسترده روش‌های پاسخ سطحی در همه جنبه‌های بیوتکنولوژی، در این بررسی برای اولین بار بهینه‌سازی شرایط حذف اکسی انیون سلنیت بوسیله روش سطح پاسخ بر مبنای طراحی باکس-بنکن توسط باکتری پروبیوتیک *Lactobacillus sp. Tra cheese 6* مورد ارزیابی قرار گرفت. طراحی باکس-بنکن در مقایسه با سایر طراحی‌های پاسخ سطحی به ویژه طرح مرکب مرکزی (Central Composite Design)، با توجه به تعداد آزمایشات کمتر، تفسیر ساده تر نتایج و همچنین امکان مطالعه همزمان چندین فاکتور مستقل، روشی مؤثرتر محسوب می‌شود (۳۳). برای این منظور چهار فاکتور غلظت اولیه یون سلنیت، غلظت بیومس سلول، غلظت نمک سدیم کلراید و دور شیکر به‌وسیله روش طراحی باکس-بنکن سه سطحی مورد مطالعه قرار گرفت. سپس براساس تعداد

درصد با غلظت اولیه ۰/۵ گرم در لیتر، پس از ۱۴۴ ساعت گرماگذاری گزارش شد (۵). Mishra و همکاران حذف کامل یون سلنیت در غلظت اولیه ۰/۲۵ میلی‌مولار پس از ۴۰ ساعت واکنش زیست تبدیلی را در باکتری مقاوم به سلنیت جداسازی شده *Bacillus megaterium* گزارش دادند (۱۹). در یکی از معدود مطالعات صورت گرفته در ارتباط با حذف سلنیت در باکتری‌های مولد اسید لاکتیک، حذف ۸۰ درصدی از یون سلنیت توسط *Enterococcus faecium* در مدت ۲۴ ساعت گزارش شد. در این بررسی حذف بهینه سلنیت در غلظت اولیه یون سلنیت به میزان ۸ میلی‌گرم در لیتر، دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و pH برابر ۷ مشاهده گردید (۲۰). در مطالعه‌ای دیگر با استفاده از طراحی پلاکت-بورمن، اثر شرایط مختلف شامل دما، pH، دور همزن، دوره انکوباسیون، میزان تلقیح و غلظت اولیه یون سلنیت در حذف سلنیت به سلنیوم در مخمر *Saccharomyces cerevisiae* مورد بررسی قرار گرفت. در این بررسی بهینه شرایط با حداکثر تجمع سلنیوم آلی عبارت از دمای کشت ۲۸ درجه سانتیگراد، pH برابر ۵/۸، دور همزن ۱۳۰ دور در دقیقه، دوره انکوباسیون ۴۸ ساعت، غلظت بیومس سلول ۳۰ گرم در لیتر و غلظت سلنیت سدیم ۲۵ میلی‌گرم در لیتر بود (۲۱). درک عوامل و شرایط تأثیرگذار برای تعیین راهبردهای اساسی به منظور طراحی سامانه‌های زیستی دارای اهمیت خاصی است (۲۲). روش عمومی برای طراحی یک محیط واکنش زیست تبدیلی بهینه، تغییر غلظت اجزاء تشکیل دهنده آن به صورت مجزا یا روش یک عامل در یک زمان است. با این روش تنها می‌توان غلظت مناسب برای هر فاکتور را به صورت مجزا به دست آورد اما این حقیقت که عوامل محیطی گوناگون می‌توانند در ترکیب با

حذف سلنیت بودند. تحت شرایط بهینه شده فوق، درصد حذف سلنیت در مخلوط واکنش زیست تبدیلی تحت شرایط سلول‌های در حال استراحت *Lactobacillus sp. Tra Cheese 6*، ۷۷/۱۲ پس از ۲۴ ساعت واکنش زیست تبدیلی بود.

### نتیجه‌گیری

علیرغم کاربرد گسترده روش‌های پاسخ سطحی در تولید بهینه متابولیت‌های صنعتی و همچنین بهبود فرآیندهای حذف آلاینده‌های سمی، تا به امروز در ارتباط با بهینه‌سازی فرآیند حذف اکسی آنیون سلنیت با استفاده از روش سطح پاسخ مطالعه‌ای صورت نگرفته است. طراحی باکس-بنکن در مقایسه با سایر طراحی‌های پاسخ سطحی با توجه به تعداد آزمایشات کمتر، تفسیر ساده تر نتایج و همچنین امکان مطالعه همزمان چندین فاکتور مستقل، روشی مؤثرتر محسوب می‌شود. در این بررسی برای اولین بار بهینه‌سازی شرایط حذف میکروبی سلنیت به وسیله روش سطح پاسخ بر مبنای طراحی باکس-بنکن توسط باکتری پروبیوتیک *Lactobacillus sp. Tra cheese 6* به طور موفقیت آمیز مورد استفاده قرار گرفت. براساس نتایج حاصل از این تحقیق، چنانچه بهینه سازی ترکیبات واکنش زیست تبدیلی تحت استراتژی سلول‌های در حال استراحت (سلول‌های فعال از لحاظ متابولیسم و فاقد رشد سلولی) برای حذف زیستی اکسی آنیون سمی سلنیت انجام گیرد می‌توان به بازده‌های قابل قبول بدون استفاده از مواد سمی و یا اضافه نمودن موادی که مستلزم صرف هزینه‌های بالای اقتصادی هستند، دست یافت.

فاکتورها و سطوح آنها جدول طرح باکس-بنکن معین شد. نقاط مرکزی چهار متغیر مورد مطالعه محاسبه گردید و با در نظر گرفتن کدهای درج شده شرایط حذف سلنیت در ۲۷ آزمایش مختلف از نظر میزان اولیه غلظت یون سلنیت، غلظت اولیه بیومس سلولی، غلظت اولیه نمک سدیم کلراید و دور همزن تعیین شد. پس از آن برای متغیرهای وابسته یک مدل ریاضی چند متغیره درجه دوم طوری تعریف شد که آثار اصلی و متقابل فاکتورها را بر روی هر متغیر جداگانه بیان نمود. در ادامه برای بررسی مناسب بودن مدل تجربی استفاده شده، تجزیه آماری معادلات چند متغیره به وسیله نرم افزار آماری Design Expert انجام شد و ضرایب رگرسیون مربوطه و همچنین آثار فاکتورها بر متغیرها، تعیین گردید. به دنبال اطمینان یافتن از مناسب بودن مدل تجربی به کار گرفته شده شرایط بهینه حذف میکروبی سلنیت تعیین گردید. برای تعیین شرایط بهینه در روش‌های سطح پاسخ می‌توان از چهار روش Point prediction (تخمین زده شده به وسیله نرم افزار)، بررسی نمودارهای سه بعدی سطح پاسخ، تجزیه استاندارد (با کمک حل ماتریس) و روش عددی (با کمک حل کننده نرم افزار اکسل) استفاده نمود (۱۴). در تحقیق اخیر از روش‌های ۱ و ۲ استفاده شد. روش‌های ۳ و ۴ با توجه به حل معادلات پیچیده و همچنین وقت گیر بودن توصیه نمی‌شود. در مواردی که دسترسی به نرم افزار وجود نداشته باشد، این روش‌ها گزینه مناسبی برای تعیین شرایط بهینه می‌باشند. پس از تلفیق نمودن نتایج به دست آمده از نمودارها و استفاده از روش point prediction غلظت سلنیت: ۴۹/۵ میلی مولار، غلظت بیومس سلول: ۵۶ گرم در لیتر، غلظت نمک کلرید سدیم: ۴/۲ درصد وزنی/حجمی و دور همزن ۱۰۰ rpm بهترین شرایط

سپاسگزاری

حمایت مالی و معنوی دانشگاه کردستان اجرا شده است که بدین وسیله، مولفین این مقاله مراتب تشکر و سپاس خود را اعلام می‌دارد.

این پژوهش برگرفته از رساله کارشناسی ارشد آقای داود صاعدی تحت راهنمایی دکتر مزاحم آشننگرف و با

## References

1. Unrine JM, Jackson BP, Hopkins WA. Selenomethionine biotransformation and incorporation into proteins along a simulated terrestrial food chain. *Environ Sci Technol* 2007; 41(10): 3601-6.
2. Köhrle J. The trace element selenium and the thyroid gland. *Biochimie* 1999; 81(5): 527-33.
3. Haug A, Graham RD, Christophersen OA, Lyons GH. How to use the world's scarce selenium resources efficiently to increase the selenium concentration in food. *Microb Ecol Health Dis* 2007; 19(4): 209-28.
4. Lavado R, Shi D, Schlenk D. Effects of salinity on the toxicity and biotransformation of L-selenomethionine in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) embryos: mechanisms of oxidative stress. *Aquat Toxicol* 2012; 108: 18-22.
5. Ikram M, Faisal M. Comparative assessment of selenite (SeIV) detoxification to elemental selenium (Se<sup>0</sup>) by *Bacillus* sp. *Biotechnol Lett* 2010; 32(9): 1255-9.
6. Hunter WJ, Kuykendall LD. Reduction of selenite to elemental red selenium by *Rhizobium* sp. strain B1. *Current microbiology* 2007; 55(4): 344-9.
7. Jaiswal SK, Prakash R, Acharya R, Nathaniel TN, Reddy AVR, Tejo PN. Bioaccessibility of selenium from Se-rich food grains of the seleniferous region of Punjab, India as analyzed by instrumental neutron activation analysis. *CYTA Journal of Food* 2012; 10(2): 160-4.
8. MacFarquhar JK, Broussard DL, Melstrom P, Hutchinson e, Wolkin A, Martin C, et al. Acute selenium toxicity associated with a dietary supplement. *Arch Intern Med* 2010; 170(3): 256-61.
9. Sun HJ, Rathinasabapathi B, Wu B, Luo J, Pu LP, Ma LQ. Arsenic and selenium toxicity and their interactive effects in humans. *Environ Int* 2014; 69: 148-58.
10. Bleys J, Navas-Acien A, Guallar E. Selenium and diabetes: more bad news for supplements. *Ann Int Med* 2007; 147(4):271-2.
11. Vinceti M, Maraldi T, Bergomi M, Malagoli C. Risk of chronic low-dose selenium overexposure in humans: insights from epidemiology and biochemistry. *Rev Environ Health* 2009; 24(3): 231-48.
12. Stewart MS, Spallholz JE, Neldner KH, Pence BC. Selenium compounds have disparate abilities to impose oxidative stress and induce apoptosis. *Free Radic Biol Med* 1999; 26(1-2): 42-8.
13. Geoffroy N, Demopoulos GP. The elimination of selenium (IV) from aqueous solution by precipitation with

- sodium sulfide. *J Hazard Mater* 2011; 185(1): 148-54.
14. Wang MJ, Xie YL, Chen ZJ, Yao SJ. Optimizing preparation of NaCS-chitosan complex to form a potential material for the colon-specific drug delivery system. *Journal of Applied Polymer Science* 2010; 117(5): 3001-12.
  15. Hurlbut JA, Burkepile RG, Geisler CA, Kijak PJ, Rummel NG. Colorimetric determination of selenium in mineral premixes. *J AOAC Int* 1997; 80(4): 709-16.
  16. Ashengroph M, Nahvi I, Zarkesh-Esfahani H, Momenbeik F. Conversion of isoeugenol to vanillin by *Psychrobacter* sp. strain CSW4. *Appl Biochem Biotechnol* 2012; 166 (1): 1-12.
  17. Box GEP, Behnken DW. Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Journal of Technometrics* 1960; 2(4): 455-75.
  18. 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.
  19. Mishra RR, Prajapati S, Das J, Dangar TK, Das N, Thatoi H. Reduction of selenite to red elemental selenium by moderately halotolerant *Bacillus megaterium* strains isolated from Bhitarkanika mangrove soil and characterization of reduced product. *Chemosphere* 2011; 84 (9): 1231-7.
  20. Pieniz S, Okeke BC, Andrezza R, Brandelli A. Evaluation of selenite bioremoval from liquid culture by *Enterococcus* species. *Microbiol Res* 2011; 166(3); 176-85.
  21. Esmaeili S, Khosravi-Darani K, Pourahmad R, Nazemi L, Komeili R. Production of selenium-enriched yeast using a Plackett-Burman design. *Iranian Journal of Nutrition Sciences and Food Technology* 2012; 7 (2): 27-36 [In Persian].
  22. Sharma SL, Pant A. Biodegradation and conversion of alkanes and crude oil by a marine *Rhodococcus*. *Biodegradation* 2000; 11(5):289-94.
  23. Rathi P, Saxena RK, Gupta R. A novel alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* for detergent formulation. *Process Biochemistry* 2001; 37(2): 187-92.
  24. Chang YC, Lee CL, Pan TM. Statistical optimization of medium components for the production of *Antrodia cinnamomea* AC0623 in submerged cultures. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006; 72(4): 654-61.
  25. Kiran KR, Manohar B, Karanth NG, Divakar S. Response surface methodological study of esterification of lactic acid with palmitic acid catalysed by immobilized lipases from *Mucor miehei* and porcine pancreas. *Eur Food Res Technol* 2000; 211: 130-5.
  26. Kumar D, Jain VK, Shanker G, Sirvastava A. Citric acid production by solid state fermentation using sugarcane bagasse. *Process Biochemistry* 2003; 38(12): 1731-8.

27. Rodrigues RCLB, Felipe MGA, Roberto IC, Vitolo M. Batch xylitol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolyzate at controlled pH values. *Bioprocess Biosyst Eng* 2003; 26(2): 103-107.
28. Mannan S, Fakhru'l-Razi A, Alam MZ. Use of fungi to improve bioconversion of activated sludge. *Water Research* 2005; 39(13): 2935-43.
29. Soo EL, Salleh AB, Basri M, Rahman RNZA, Kamaruddin, K. Response surface methodological study on lipase-catalyzed synthesis of amino acid surfactants. *Process Biochemistry* 2004; 39(11): 1511-8.
30. Singh AK, Mehta G, Chhatpar HS. Optimization of medium constituents for improved chitinase production by *Paenibacillus* sp. D1 using statistical approach. *Letters in Applied Microbiology* 2009; 49(6): 708-14.
31. Singh KP, Singh AK, Gupta S, Sinha, S. Optimization of Cr (VI) reduction by zero-valent bimetallic nanoparticles using the response surface modeling approach. *Desalination* 2011; 270(1-3): 275-84.
32. Ashengroph M, Nahvi I, Amini J. Application of Taguchi Design and Response Surface Methodology for Improving Conversion of Isoeugenol into Vanillin by Resting Cells of *Psychrobacter* sp. CSW4. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 2013; 12(3): 411-21.
33. Bosque-Sendra JM, Pescarolo S, Cuadros-Rodríguez L, García-Campaña AM, Almansa-López EM. Optimizing analytical methods using sequential response surface methodology: Application to the pararosaniline determination of formaldehyde. *Fresenius' J Anal Chem* 2001; 369(7-8): 715-18.



## Optimization of Selenite Removal by *Lactobacillus* sp. Tra cheese 6 Using Box-Behnken Design

Morahem Ashengroph, Ph.D. <sup>1\*</sup>, Davoud Saedi, B.Sc. <sup>2</sup>

1. Assistant Professor of Microbiology, Department of Biological Sciences, Faculty of Sciences, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

2. MSc. Student of Molecular Cell Biology, Department of Biological Sciences, Faculty of Sciences, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

\* Corresponding author; e-mail: m.ashengroph@uok.ac.ir

(Received: 1 Sep. 2015 Accepted: 16 Feb. 2016)

### Abstract

**Background & Aims:** High concentrations of selenite have carcinogenetic, cytotoxic and genotoxic effects. Therefore, removal of this toxic pollutant from the environment has a particular importance in maintaining public health. In this study, with the aim of optimization of selenite removal process, the design Box-Behnken method was used to estimate the simultaneous effect of variables on removal efficiency and to determine the optimal values of variables on selenite removal with the probiotic bacterium *Lactobacillus* sp. Tra Cheese 6

**Methods:** An experimental method using a three-level Box-Behnken method for testing the effects of four factors including concentrations of selenite ion, cell biomass, NaCl and agitation was investigated. Statistical Data Analysis was performed using Analysis of Variance (ANOVA) method. Regression coefficients of the second-order polynomial model were estimated. Then, by integrating the results and drawing a multivariate quadratic equation, the optimal point was precisely determined. Design-Expert software was used for data analysis.

**Results:** Optimum removal of selenite was obtained at initial concentration of Selenite 49.5 mM, biomass concentration of 56 g/l, NaCl concentration of 4.2 % (w/v) and agitation at 100rpm. Under these conditions, the optimal selenite removal was 77.12 % after a 24-h reaction under the resting cells of *Lactobacillus* sp. Tra Cheese 6.

**Conclusion:** In the current study, Response Surface Methodology based on Box-Behnken design was successfully applied for improving selenite removal with the probiotic bacterium *Lactobacillus* sp. Tra Cheese 6.

**Keywords:** Selenite removal, Box-Behnken design, Response Surface Methodology, *Lactobacillus* sp Tra Cheese 6.