مجله علوم پزشکی رازی دوره ۲۹، شماره ۹، آذر ۱۴۰۱ http://rjms.iums.ac.ir

مقاله پژوهشی

ارزیابی مخمرهای جداشده از پساب‌های صنعتی جهت حذف سلنیوم و به‌کارگیری بیومس تولیدی در غذای دام و طیور

عمادالدین شفیعی: دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد سیرجان، دانشگاه آزاد اسلامی، سیرجان، ایران

مجید صادق پور: کارشناس ارشد میکروبیولوژی، عضو علمی انجمن میکروب شناسی ایران ، تهران، ایران

احسان استبرقی: استادیار، گروه دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهربابک، شهربابک، ایران

کیومرث امینی: دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران (* نویسنده مسئول) dr_kumarss_amini@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: جذب زیستی جایگزین مناسبی برای روش‌های فیزیکی و شیمیایی مرسوم برای حذف فلزات سمی از آب‌های زیرزمینی و پساب‌ها است. در این تحقیق، مطالعه فنوتیپی و ژنوتیپی به‌کارگیری مخمرهای جداشده از پساب‌های صنعتی باهدف حذف زیستی سلنیوم و به‌کارگیری بیومس تولیدی به عنوان غذای دام و طیور انجام شد. هدف نهایی ارزیابی مخمرهای جدا شده از پساب‌های صنعتی جهت حذف سلنیوم و به‌کارگیری بیومس تولیدی در غذای دام و طیور است.

روش کار: در مطالعه حا ضر سویه‌های مخمری از پساب فا ضلاب جدا سازی شد و پس از تأیید آن‌ها با ا ستفاده از تکثیر ناحیه ITs و بررسی ارتباط تکاملی آن‌ها با سویه‌های S1 (*کاندیدا آلبیکانس* NG67) و S2 (*کاندیدا آلبیکانس* m48a) حذف سلنیومی انجام شد.

یافته‌ها: بررسی توان این جدایه‌ها برای تحمل سلنیوم با استفاده از محیط کشت PYT agar حاوی غلظت‌های مختلف از ۴ تا ۱۵ mmol از Se^{2+} انجام شد. سویه‌های دارای قابلیت سلنیوم کلنی‌های قرمزرنگ در محیط PYD آگار حاوی سلنیت بود. این سویه‌ها به عنوان سویه‌های برتر انتخاب شدند. در ادامه به منظور انتخاب بهترین سویه مخمری کارآمد برای انجام آزمایش‌ها سلنیت زدایی، آزمون MFC انجام شد.

نتیجه‌گیری: الگوی مقاومت سویه‌های مخمری جداشده با توجه به MFC نشان داد که بیش‌ترین مقاومت به یون سمی سلنیت (تحمل‌پذیری بالاتر از ۲۲ gr/l) مربوط به سویه S1 بود. پروتئین میکروبی تولیدشده در این تحقیق کاربرد فراوانی داشته و می‌توان از آن به عنوان یک ماده افزودنی و پروبیوتیک در جیره غذایی دام، طیور آبزیان استفاده نمود.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت‌کننده: حامی مالی ندارد.

کلیدواژه‌ها

مخمر،

فاضلاب صنعتی،

سلنیوم

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۶/۱۹

تاریخ چاپ: ۱۴۰۱/۰۹/۱۹

شیوه استناد به این مقاله:

Shafiei E, Sadeghpour M, Estabarqi E, Amini K. Evaluation of Yeast Isolated from Industrial Waste to Remove Selenium and the Use of Biomass in Livestock and Poultry Food. Razi J Med Sci. 2022;29(9):172-182.

*انتشار این مقاله به‌صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 3.0 صورت گرفته است.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-06-29]

Razi Journal of Medical Sciences. 2022;29(9):172-182. http://rjms.iums.ac.ir

Original Article

Evaluation of Yeast Isolated from Industrial Waste to Remove Selenium and the Use of Biomass in Livestock and Poultry Food

Emadadin Shafiei: MSc, Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Sirjan Branch, Islamic Azad University, Sirjan, Iran
Majid Sadeghpour : Master of Microbiology, Scientific Member of Iranian Microbiological Association, Tehran, Iran
Ehsan Estabarqi : Assistant Professor, Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Shahrbabak Branch, Shahrbabak, Iran
Kumarss Amini : Assistant Professor, Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran (* Corresponding author) dr_kumarss_amini@yahoo.com

Abstract

Background & Aims: Bioavailability is a good alternative to conventional physical and chemical methods for removing toxic metals from groundwater and wastewater. Selenium is a non-metallic substance. Although large amounts of selenium are toxic, proper consumption is essential for specific cellular functions. In the seasons when there is a maximum spawning rate, due to the excretion of high levels of selenium through the eggs from the body, the balance of selenium in the body is disturbed and its amount is reduced to a minimum and the body becomes susceptible to virus attack. Laying birds are more common (1, 2).

Reproduction of viruses, especially avian influenza, also requires selenium, which is higher due to the high proliferation of viruses, but the selenium required for a virus is very low, and if there is enough selenium in animals, the virus enters the body. In other words, the virus poisons itself with selenium, and this is a schematic example of the fight against toxins, as well as a way to fight and defend the type of prevention, not when the disease occurs. falls down. Numerous microorganisms such as bacteria, yeasts, molds, algae and higher fungi that are grown on a large scale can be used as a rich source of protein for humans and animals. Yeasts are among the organisms that are widely used to produce protozoan proteins, and the most important of them are Saccharomyces, Torulopsis, Candida, Didium, etc. (5).

Methods: In this research, phenotypic and genotypic study was carried out on the use of isolated yeast from industrial effluents with the aim of eliminating Selenium biological and the production of biomass as a feed for livestock and poultry. In the present study, yeast strains were isolated from wastewater and after confirmation by using the replication of the ITs region and their evolutional correlation with S1 strains (*Candida albicans* NG67) and S2 (*Candida albicans* m48a) selenium removal was performed. Sequencing: To confirm the sequences obtained by PCR, the sequencing reaction was performed according to Sanger method by Gene Fanavaran Company. In this sequencing, the Cycle Sequencing Kit Big Dye Terminatorv3.1 from Applied Biosystems and the ABI Sequence Analyzer 3130xl from the same company were used. The sequence of each DNA strand was analyzed using the corresponding chromatogram and Chromas (Technelysium) software. The questionable bases were examined by careful examination of the chromatogram and comparison with the chromatogram of the reverse string sequence.
Chromas (Technelysium) software was used to analyze and compare all genetic changes.

Results: The ability of these isolates to tolerate selenium was performed using PYT agar medium containing different concentrations of 4-15 mM of Se2 +. Selenium-capable

Keywords
Yeast,
Industrial sewage,
Selenium

Received: 10/09/2022
Published: 10/12/2022

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-06-29]

strains of reddish colonies contained Selenite in PYD Agar medium. These strains were selected as superior strains.

Enrichment and Determination of Selenium Resistance Pattern in Yeast Strains: After optimizing the reaction conditions of bilenium selenite removal reaction by single factor method and finding appropriate values of reaction parameters, the effect of heating time on removal efficiency was investigated. Based on the results obtained after 72 hours of heating, the resting yeast cells were able to remove more than 93% of the selenium in the conversion medium, indicating the potential potential of the microbial catalyst to remove toxic selenium from the reaction medium.

Conclusion: The MFC test was conducted to select the best yeast strain for performing desulphurisation tests. The resistance pattern of isolated yeast strains according to MFC showed that the highest resistance to toxic selenite ions (tolerance greater than 22 g / l) was related to strain S1. The microbial protein produced in this study is widely used and can be used as an additive and probiotic in the diet of livestock, poultry, and aquatic animals.

In the present study, yeast strains were isolated from wastewater and after confirmation, selenium removal was performed by replicating the ITs region and investigating their evolutionary relationship with strains S1 (Candida albicans NG67) and S2 (Candida albicans m48a). For this purpose, selenium-capable strains of red colonies in PYD agar medium contained selenite. These strains were selected as the top strains. Then, in order to select the best efficient yeast strain for selenite removal experiments, MFC test was performed. Resistance pattern of isolated yeast strains according to MFC showed that the highest resistance to toxic selenite ion (tolerance above 22 g / l) was related to S1 strain. These results are consistent with the study of Ashnagarov et al. Protozoan protein can be produced from various sources. Researchers have conducted various studies on the production of protozoan proteins from substrates such as agricultural wastes (molasses, rice, citrus), chemical by-products (methane and petroleum derivatives), and fishery wastes (such as shrimp skin). Each of the studies used different microbes or microbes and the conditions for preparing the growth medium of the microorganisms used were different. The results of studies by Scholes et al. Showed that the amount of crude protein in SCP produced from yeasts was between 39-68%, while this amount in bacterial SCP was about 82%. The amount of essential amino acids of yeast protein was between 6.4-6.4% per gram of protein. However, the amount of total fat in protein with different microbial origins has been variable. The results of the present study also confirm the above results.

The results of a study by Samuel et al. In 1992 showed that when using microbes, the average crude protein in fish and crab waste was 60.4% and 44.1%, respectively. Ferrer et al. Used shrimp shells to produce microbial protein and used marine yeast to achieve this goal. The results showed that the specific growth rate and crop production coefficient were 0.398 per hour and 447% kg dry cell weight, respectively. Recently, due to the lack of protein, efforts have been made to discover alternative sources of common food and feed. SCP is cheap for everyone and safe to eat. Genetically modified, high-yielding non-toxic microbes can also be used to increase SCP production. During a study, scientists coated medical lenses with selenium to prevent bacteria from growing and multiplying on the lenses (11).

Conflicts of interest: None
Funding: None

Cite this article as:

Shafiei E, Sadeghpour M, Estabarqi E, Amini K. Evaluation of Yeast Isolated from Industrial Waste to Remove Selenium and the Use of Biomass in Livestock and Poultry Food. Razi J Med Sci. 2022;29(9):172-182.

*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-06-29]

مقدمه

پیشرفت روزافزون فن‌آوری در دهه‌های اخیر مهم‌ترین عامل آلودگی محیط‌زیست است. زمانی که از آب جهت انجام فرایندهای صنعتی، مورداستفاده قرار می‌گیرد با ترکیب شدن بخشی از آلاینده‌های موجود در آن صنعت و یا تغییر در بخشی از ساختار آب مانند تبخیر، خروجی از آن واحد صنعتی به عنوان فاضلاب صنعتی تلقی می شود. سلنیوم نوعی فلز سنگین است که در خاک موجود بوده ولی خاک بطور قابل ملاحظه ای می تواند از نظر سلنیوم فقیر یا غنی باشد. نقش متابولیکی سلنیوم در سال ۱۹۷۲ مشخص شد. سلنیوم یک ماده معدنی کمیاب و ضروری است که آرایه وسیعی از خواص درمانی همچون محافظت در برابر بیماری‌های قلبی خاص، افزایش قدرت سیستم ایمنی بدن، به حداکثر رساندن عملکرد تیروئید، کاهش التهاب و ... را دارد (۱، ۲).

زیست توده یا بیومس (Biomass) یکی از منابع انرژی تجدید پذیر می باشد که از مواد زیستی و سازگار با محیط زیست به دست می‌آید. منابع انرژی زیست توده به‌طورکلی از زباله‌هایی که منشأ زیستی داشته باشند و از تکثیر سلولی پدید آمده باشند ،تامین می شوند. اگرچه سوخت های فسیلی ریشه در زیست توده در زمان های بسیار قدیم داشته اند، کربن موجود در سوخت های فسیلی از چرخه زیستی طبیعت خارج می شود. سلنیوم یک ماده ارگانیک است که به‌طور عمده از خاک، آب و مواد گیاهی مشتق می شود. فقدان سلنیوم در جیره غذایی، تولید و کارآیی آنزیم گلوتاتیون پراکسیدآز را محدود می سازد و منجر به تولید هیدروپراکسیدهای لیپیدی در سلول‌ها می‌شود و به دنبال آن به دیواره سلولی آسیب می‌رسد (۳).

سلنیوم به عنوان یک ماده غیرفلزی است. اگرچه مقادیر زیاد سلنیوم سمی بوده ولی مصرف صحیح آن برای عملکردهای سلولی خاص بسیار ضروری است. در فصولی که ماکزیمم میزان تخمگذاری وجود دارد به علت دفع میزان بالای سلنیوم از طریق تخم از بدن تعادل سلنیوم در بدن به هم خورده و مقدار آن به حداقل می رسد و بدن حساس به حمله ویروس می‌گردد و شاید به این دلیل با شد که بیماری در طیور تخمگذار بیشتر مشاهده می‌گردد (۴).

تولید مثل ویروس‌ها بویژه آنفلوانزای مرغی هم، نیازمند به سلنیوم بوده و با توجه به تکثیر بالای ویروس‌ها این میزان بیشتر می‌باشد، ولی سلنیوم مورد نیاز برای یک ویروس بسیار کم است و اگر سلنیوم کافی در بدن حیوانات موجود باشد، ویروسی که وارد بدن می شود به علت مسمومیت ناشی از سلنیوم بالا از بین می‌رود به عبارت دیگر ویروس خودش را با سلنیوم مسموم می کند و این یک نمونه شماتیک از مبارزه سم با سم است و همینطور یک روش مبارزه و دفاع از نوع پیشگیری است، نه وقتی بیماری اتفاق می افتد. میکروارگانیسم‌های متعدد مانند باکتری‌ها، مخمرها، کپک ها، جلبک ها و قارچ های عالی تر که در مقیاس وسیع کشت می‌شوند می‌توانند بعنوان منبع غنی از پروتئین برای انسان و دام مورد استفاده قرار گیرد. مخمرها از جمله ارگانیسمهای هستند که بطور گسترده در جهت تولید پروتئین تک یاخته مورد استفاده قرار می‌گیرد و از مهمترین آنها می‌توان به ساکارومیسس، تورولوپسیس، کاندیدا، دیدیوم و ... اشاره نمود (۵). از مزیتهای مهم مخمرها در تولید پروتئین تک یاخته در مقایسه با باکتریها میتوان به رشد نسبتا بالا، تولید محصول بیشتر در زمان کوتاهتر، آسان بودن استخراج پروتئین تولید شده و آلودگی بسیار پایین محصول میکروبی حاصل از استخراج (به لحاظ رشد مخمرها در pH اسیدی) می‌باشد (۵، ۶). ارزش غذایی پروتئین های تولید شده در بین مخمرها می‌توان به گروه *کاندیدا* با ۶۱/۲ - ۵۸/۶ درصد بیشترین تولید و گروه *ساکارومیسس* با ۵۵/۲-۵۳/۶ کمترین تولید را دارند (۷).

میکروارگانیسم‌ها تقریباً به همان طریق که گوگرد را به ترکیبات مختلف تبدیل می‌کنند قادر به تبدیل و تغییر سلنیوم می‌باشند. بررسی‌ها نشان داده که روش‌های شیمیایی و فیزیکی مانند اکسیداسیون-احیاء، رسوب دادن شیمیایی، پالایش، تیمار الکترو شیمیایی، تبخیر، تبادل یونی و اسمزی معکوس محدودیت‌هایی دارند و از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه نیستند و در مورد پساب‌های دارای مواد آلی کمپلکس شده با فلزات، نامناسب هستند (۸، ۹).

مزایای فرایند جذب زیستی ازجمله ارزان‌قیمت بودن، جذب سریع و کارایی بالا، ظرفیت بالای جذب، خاصیت

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-06-29]

انتخابی مواد جاذب زیستی در جذب فلزات، قابلیت احیای جاذب، استفاده مجدد از آن و بازیافت فلزات جذب‌شده باعث مطلوب بودن این فرایند برای حذف فلزات سنگین شده است (۷). هدف از این تحقیق مطالعه فنوتیپی و ژنوتیپی به‌کارگیری مخمرهای جدا شده از پساب‌های صنعتی باهدف جذب سلنیوم و به‌کارگیری بیومس تولیدی به عنوان غذای دام و طیور می‌باشد.

روش کار

کمیت و کیفیت فاضلاب یا پساب صنعتی در کارخانجات و صنایع مختلف بسته به نوع و ماهیت تولیدی متفاوت بوده و به همین نسبت روش تصفیه آنها نیز گوناگون است. نمونه‌های پساب پس از جمع‌آوری ازکارخانه های صنعتی شهر کرمان در سانتریفوژ با rpm ۳۵۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه رسوب داده و میزان ۲۰ میکرولیتر از محلول رویی و رسوب حاصل، به لوله‌های حاوی محیط کشت نوترینت براث با pH معادل ۷ افزوده و در دمای ۳۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک هفته گرما گذاری شد. مخمرهای غنی‌شده به‌دست‌آمده با استفاده از محیط کشت نوترینت آگار، جدا و خالص شد.

به منظور تولید بیومس (زیست توده) سویه های مخمر در محیط مایع (نوترینت براث شرکت مرک آلمان) کشت داده و در انکوباتور شیکردار (۱۵۰ دور دردقیقه) برای ۵-۳ روز در دمای ۳۰ درجه انکوبه شدند. جداسازی و تخلیص بیومس تولیدی به روش سانتریفیوژ (۳۰۰۰ دور در ۱۰ دقیقه) و یا فیلتراسیون (فیلترهای ۰/۴۵ µ) انجام شد. بررسی جذب سطحی سلنیوم توسط مخمر با افزودن بیومس مشخص انجام شد.

حساسیت سویه‌ها به سلنیوم: حساسیت سویه‌ها به Se^{2+} به روش سنجش مهار رشد تعیین شد. به این منظور از محیط PYT agar استفاده شد. پس از اتوکلاو به این محیط، غلظت‌های مختلف (۴، ۵، ۶، ۶/۵، ۷، ۸، ۱۰، ۱۲ و ۱۵ mmol) سلنیوم استریل با صافی ۰/۴۵ میکرونی و به کمک فیلتر اضافه شد. سپس ۱۰ µl از سوسپانسیون باکتریایی دارای $1/5\times10^6$ CFU/ml به صورت لکه‌گذاری تلقیح و در ۳۴ درجه به مدت ۵-۲ روز نگه‌داری و حداقل غلظت مهار رشد سلنیوم (MFC) تعیین شد.

سنجش میزان حذف سلنیوم: میزان جذب فلز توسط سویه برتر دارای توانایی بالای تحمل سلنیوم سنجیده شد. به این منظور ۱٪ از سوسپانسیون باکتریایی دارای حدود $1/5\times10^6$ CFU/ml در فلاسک های ml ۱۰۰ دارای ml ۲۰ محیط کشت PYT براث با pH ۶/۵ دارای ml ۸۰ سلنیوم تلقیح شد و فلاسک ها در rpm ۱۵۰ و درجه حرارت ۳۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ و ۹۶ ساعت گرما گذاری شدند. در زمان‌های ۴۸ و ۹۶ ساعت، نمونه‌برداری شد و نمونه‌ها در rpm ۵۰۰۰ و به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. میزان سلنیوم باقی‌مانده در محلول رویی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری جذب اتمی سنجیده شد.

برای ارزیابی میزان احیا سلنیت سدیم به سلنیوم با روش۳و۳دی آمینو بنزیدین (DAB) ۱۸ ml از محیط کشت نوترینت براث حاوی ۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون سویه مخمر جداشده معادل نیم مک فارلند و ۴۸ µl سلنیت سدیم، در زمان‌های ۲۴و ۴۸ ساعت به‌طور استریل، برداشته و توده سلولی آن از طریق سانتریفوژ نمودن دور rpm ۱۵۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه جدا شدند. سپس به مایع رویی جداشده ۷ml اسید کلریدریک غلیظ M6 و محلول ۳و۳دی آمینو بنزیدین ۰/۵٪ اضافه شد. محلول حاصل را به قیف جداکننده حاوی تولوئن منتقل نموده و میزان جذب آن در طول موج ۴۲۰nm قرائت شد.

سنجش احیای سلنیت سدیم با استفاده از تکنیک جذب اتمی(Absorption Atomic Spectroscopy) بعد از تنظیم pH در حدود ۷ محیط کشت نوترینت براث حاوی ۱ mmol سلنیت سدیم، توده سلولی را از طریق سانتریفوژکردن در دور rpm ۱۴۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه جدا نموده و محلول رویی حاوی سلنیوم به روش Absorption Sector Atomic Generation Hydride Photometry طیف‌سنجی جذب اتمی در مرکز پژوهش‌های کاربردی سازمان زمین شناسی اندازه‌گیری شد. به رسوبات حاصل از سانتریفوژ ۵ ml HNO3

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-06-29]

جدول ۱- توالی‌های نوکلئوتیدی پرایمرهای ITs جهت شناسایی ایزوله‌های کاندیدا (۱)

Primer	Oligonucleotide Sequence (5′→ 3′)
ITs	F=5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′ R=5′-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3′

غلیظ اضافه شد و نمونه به مدت ۵ دقیقه جوشانده و مقدار کل سلنیوم موجود در محلول حاصل از هضم اسیدی توسط دستگاه ASS HG موردسنجش قرار گرفت.

رسم منحنی رشد: بدین منظور ۱ml از سوسپانسیون مخمر موردنظر معادل با کدورت نیم مک فارلند ($10^{8}\times10^{5}$ cfu/ml) به محیط کشت نوترینت براث حاوی ۲۰ ml سلنیت سدیم و فاقد آن افزوده و جذب نوری در ۶۰۰nm و در زمان های مختلف قرائت گردید و منحنی رشد مخمر ترسیم شد. همچنین اشکال مخمر در زمان‌های مختلف در حضور سلنیت در زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت.

شناسایی مولکولی: استخراج DNA با استفاده از کیت تجاری شرکت سیناکلون شرکت سینا کلون با نام CAT NO: PR881612 CinnaPure-DNA,50 Preps انجام شد. پس از BLAST آغازگرهای انتخاب‌شده در سایت NCBI (جدول ۱)، واکنش PCR به حجم نهایی ۲۵ µl شامل ۹/۵ µl PCR master mix 5X (سینا کلون، ایران) حاوی (0.05 Taq DNA polymerase U/µl، MgCl2 3 mM و (0.4mM dNTPs)، ۰/۷ µl از هر یک از پرایمرها، ۱ µl از DNA الگو (۱۰ ngr) و ۱۳/۱ µl آب دو بار تقطیر استریل با استفاده از گرادیانت ترموسایکلر(اپندورف، آلمان) برای ۳۳ سیکل انجام شد.

با انتخاب برنامه مرتبط به‌صورت ذیل عمل گردید: گام اول واسرشت ثانویه ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۶۰ ثانیه، گام دوم اتصال آغازگر ۵۶ درجه برای ۴۵ ثانیه، گام سوم بسط اولیه ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۲ دقیقه و یک بسط نهایی ۷۲ درجه برای ۷ دقیقه در نظر گرفته شد. در پایان، محصولات واکنش M-PCR در ژل آگارز ۱٪ حاوی اتیدیوم بروماید (0.5 µg/ml) الکتروفورز شد.

تعیین توالی: برای تأیید توالی‌های حاصل از PCR، واکنش تعیین توالی بر اساس روش سانجر توسط شرکت ژن فناوران انجام شد. در این تعیین توالی از کیت Dye Big Cycle Sequencing Kit Terminatorv3.1 کمپانی Applied Biosystems و دستگاه ABI Sequence Analyzer 3130xl همان کمپانی استفاده شد. توالی هر رشته DNA با استفاده از کروماتوگرام مربوطه و توسط نرم‌افزارهای Chromas (Technelysium) مورد بررسی دقیق قرار گرفت. بازهای سؤال‌برانگیز با بررسی دقیق کروماتوگرام و مقایسه با کروماتوگرام توالی رشته معکوس مورد بررسی قرار گرفت. به منظور آنالیز و مقایسه تمامی تغییرات ژنتیکی از نرم‌افزار Chromas (Technelysium) استفاده شد.

یافته‌ها

جداسازی مخمر از پساب صنعتی: نتایج آزمون تکثیر ژنوم: در این مطالعه پس از تکثیر توالی یونیورسال پرایمری ITs تمامی سویه‌ها تعیین هویت شدند (شکل ۱).

شناسایی فیلوژنتیکی سویه جداسازی شده: از نظر رنگ کلنی سویه مخمری بر روی محیط PYD آگار به شکل کلنی‌های نرم و صاف و به رنگ زرد متمایل به کرم مشاهده شد (شکل ۲ قسمت A). همچنین سویه مذکور دارای پتانسیل احیای یون سلنیت به سلنیوم عنصری که با ایجاد کلنی قرمزرنگ در محیط کشت قابل‌شناسایی است، می‌باشد (شکل ۲ قسمت B).

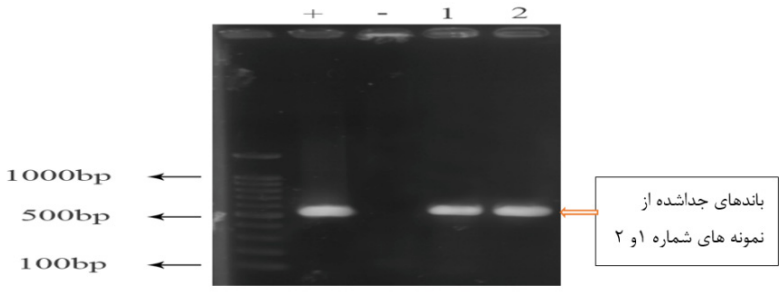
نتایج درخت تکاملی (فیلوژنی) سویه های به‌دست‌آمده: در این مطالعه تمامی سویه‌ها با استفاده از دوسویه S1 (کاندیدا آلبیکنس سویه m48a) و S2 (کاندیدا آلبیکنس) NC 012867.1مقایسه شدند (شکل ۳).

اثر پارامتر های مختلف روی حذف سلنیوم: منحنی رشد سویه مخمری در محیط کشت مایع YPD تحت شرایط دمایی ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دور شیکر ۱۵۰ rpm ترسیم گردید. برای تهیه سلول‌های در حال استراحت، سلول‌ها در محیط YPD به مدت ۴۴

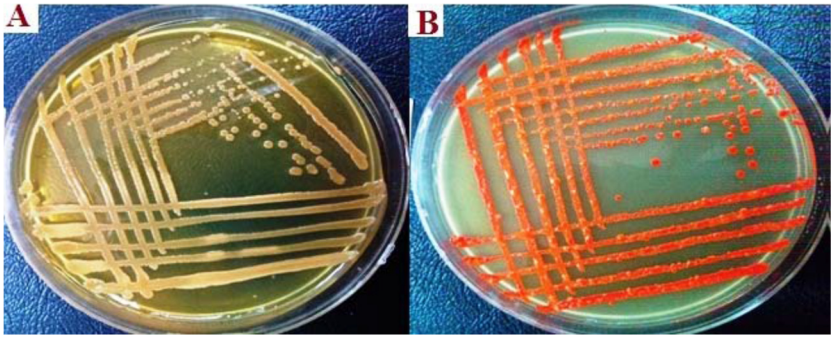
[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-06-29]

ساعت ر شد داده شدند. در فوا صل زمانی هر ۴ ساعت یک‌بار میزان دانسیته سلولی (OD=600nm) اندازه گیری و منحنی رشد ترسیم شد. سپس سلول‌ها با استفاده از سانتریفیوژ یخچالی (g× ۳۰۰۰، ۱۰ دقیقه، ۴ درجه سانتی‌گراد) بردا شت و توده سلولی سه مرتبه با بافر فسفات (KH2PO4/K2HPO4) شستشو داده شد. از این سلول‌های برداشت‌شده از انتهای فاز رشد لگاریتمی (ساعت ۲۸ ام) به عنوان کاتالیست برای آزمایش‌ها سلنیت زدایی استفاده شد (نمودار ۱).

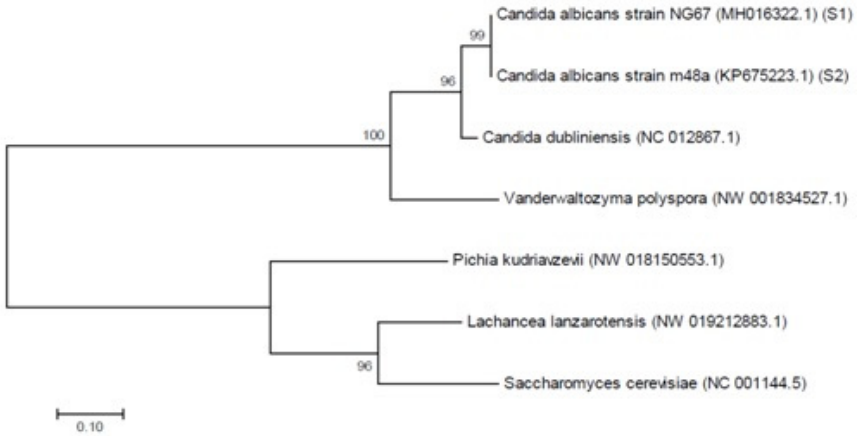
ارزیابی حذف سلنیوم تو سط سویه مخمر: برای



شکل ۱- الکتروفورز سویه‌های جداشده از نمونه پساب صنعتی. +C؛ کنترل مثبت، -C؛ کنترل منفی (آب مقطر). M؛ DNA size marker 100bp.

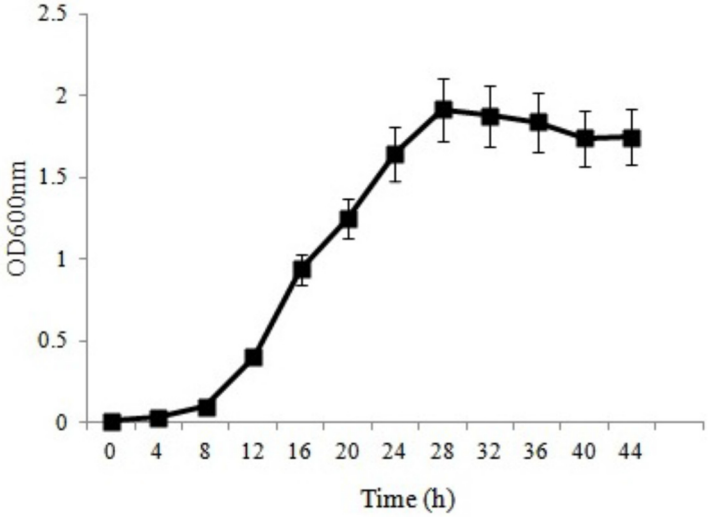


شکل ۲- سویه مخمری خالص در محیط کشت YPD آگار پس از ۴۸ ساعت گرما گذاری در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و (B) سویه مخمری خالص در محیط کشت حاوی ۲۰ گرم در لیتر یون سلنیت پس از ۴۸ ساعت گرما گذاری در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد

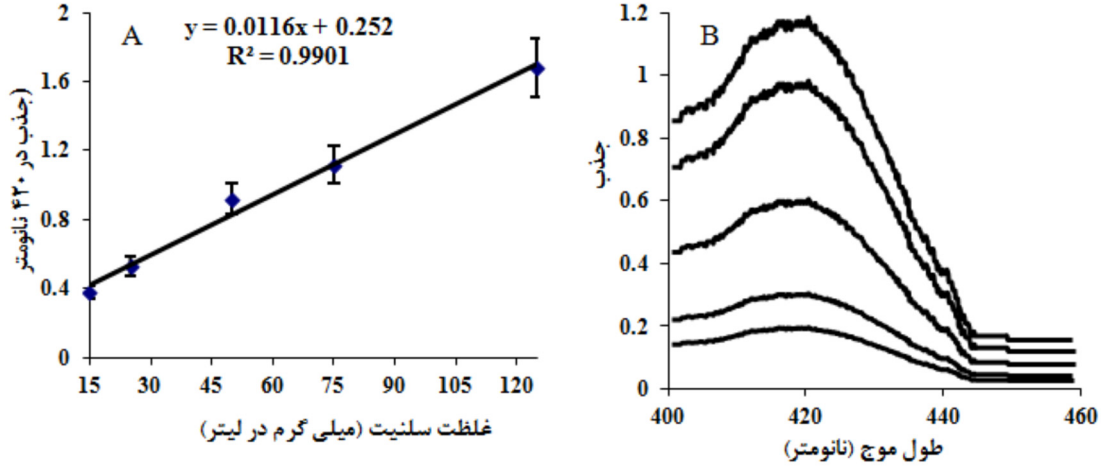


شکل ۳- ارتباط تکاملی سویه‌های جداشده با دوسویه مرجع S1 و S2.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-06-29]



نمودار ۱- منحنی رشد سویه مخمری در محیط کشت مایعYPD تحت شرایط دمایی ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دور شیکر ۱۵۰ rpm



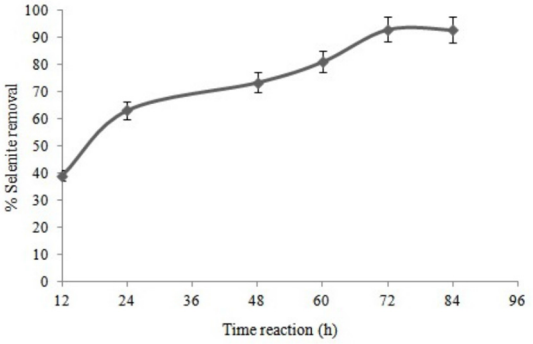
نمودار ۲- رسم منحنی کالیبراسیون با استفاده از جذب محلول‌های استاندارد سلنیوم و (B) طیف جذبی محلول سلنیوم – معرف در حلال تولوئن

ارزیابی حذف سلنیوم توسط سویه مخمر از روش Hurlbut و همکاران طبق استاندارد AOAC استفاده شد. در این روش معرف ۳ و ۳- دی آمینو بنزیدین با یون سلنیت واکنش داده و یک ترکیب زردرنگ ایجاد می‌شود که پس از استخراج در حلال تولوئن، جذب مخلوط در ۴۲۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد.

برای رسم منحنی استاندارد، ابتدا غلظت‌های مختلف از محلول‌های استاندارد سلنیوم تهیه و سپس به کمک رسم منحنی کالیبراسیون و تهیه معادله خط منحنی استاندارد، غلظت سلنیوم باقیمانده در مخلوط واکنش زیست تبدیلی تعیین شد. جهت ارزیابی اثر غلظت‌های اولیه یون سلنیوم مختلف (۲/۵ تا ۲۰ gr/l) سنجیده شد.

سایر عامل‌ها شامل غلظت اولیه توده سلولی ۱۰ gr/l، دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد، pH برابر ۵/۸، دور شیکر ۱۵۰ rpm و زمان گرما گذاری ۲۴ ساعت، ثابت در نظر گرفته شدند. همچنین حذف سلنیوم در غلظت‌های مختلف از توده سلولی بر حسب وزن‌تر (۱۰ تا ۵۰ gr/l)، غلظت‌های مختلف نمک کلرید سدیم (۱ تا ۵ در صد وزنی/حجمی)، در شرایط pH (۵/۸ تا ۷/۸)، دمای (۲۵ تا ۳۵ درجه سانتی‌گراد) در محیط واکنش

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-06-29]



نمودار ۳- اثر زمان گرما گذاری بر میزان حذف سلنیت توسط مخمر

زیست تبدیلی حاوی ۱۰ gr/l یون سلنیوم و پس از ۲۴ ساعت گرما گذاری تخمین زده شد.

پس از بهینه‌سازی عامل‌های واکنش زیست تبدیلی از طریق روش تک عاملی، اثر زمان گرما گذاری (۱۲، ۲۴، ۴۸، ۶۰، ۷۲ و ۸۴ ساعت) بر حذف سلنیوم توسط سویه مخمر بررسی شد. درصد حذف سلنیوم از تقسیم تفاضل غلظت اولیه و غلظت باقی‌مانده بر غلظت اولیه ضربدر ۱۰۰ تخمین زده شد. تمام آزمایش‌ها به صورت سه‌تایی انجام شد و نتایج به صورت میانگین گزارش شد.

غنی سازی و تعیین الگوی مقاومت به سلنیوم در سویه‌های مخمری: پس از بهینه‌سازی شرایط واکنش حذف زیستی سلنیت از طریق روش تک عاملی و پیدا نمودن مقادیر مناسب از پارامترهای واکنش، اثر زمان گرما گذاری بر راندمان حذف موردبررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده پس از ۷۲ ساعت گرما گذاری، سلول‌های در حالت استراحت مخمری توانستند بیش از ۹۳ درصد از سلنیوم موجود در محیط‌زیست تبدیلی را حذف کنند که حکایت از پتانسیل مناسب کاتالیزور میکروبی مذکور در حذف سلنیوم سمی از محیط‌های واکنش دارد.

بحث

پروتئین‌های تک‌سلولی (Single cell Protein) سلول‌های خشک شده باکتری‌ها هستند که به عنوان مکمل پروتئین در غذای انسان و خوراک دام استفاده می‌شوند. میکروارگانیسم‌ها از قبیل جلبک‌ها، قارچ‌ها، مخمرها و باکتری‌ها از مواد اولیه ارزان زباله به عنوان منبع کربن و انرژی برای رشد و تولید توده سلولی، کنستانتره پروتئین و اسیدآمینه استفاده می‌کنند (۱۱).

اگرچه پروتئین تک‌سلولی به دلیل پروتئین زیاد، ویتامین‌ها، اسیدهای آمینه ضروری و محتوای چربی، دارای ارزش غذایی بالایی است اما باز هم به دلیل اسید نوکلئیک زیاد و هضم کندتر پروتئین تک‌سلولی، مشکل جایگزینی SCP با منابع پروتئینی مرسوم، وجود دارد و حتی ممکن است آن‌ها در بدن به عنوان ماده خارجی در نظر گرفته‌شده، باعث واکنش‌های آلرژیک در بدن شوند. به دلیل کمبود پروتئین، تلاش برای کشف پروتئین جایگزین منابع معمول غذا و خوراک انجام شده است. فرآیندهای مقیاس بزرگ برای تولید SCP ویژگی‌های جالبی از قبیل طیف گسترده‌ای از روش‌ها را نشان می‌دهند (۱۲).

مواد خام و میکروارگانیسم ها می‌توانند برای این منظور مورداستفاده شوند. بهره‌وری بالا در تبدیل سوبسترا، نرخ رشد سریع میکروارگانیسم‌ها، استقلال تغذیه‌ای از عوامل فصلی، محتوای اسیدهای نوکلئیک در SCP، از عوامل اصلی مانع استفاده از آن به عنوان غذا می‌باشند (۱۳). *سودوموناس* و *آلکالیژنز*، جلبک *اسپیرولینا* و *کلرلا*، قارچ کپک سیاه نان و مخمر *کاندیدا* و *ساکارومیسس*، برای تولید SCP استفاده می‌شوند. همچنین از تورولوپسیس و دیدیوم نیز جهت تولید SCP استفاده می‌شود. میکروارگانیسم‌ها می‌توانند از انواع بستر، همانند ضایعات کشاورزی و فاضلاب، زباله‌های صنعتی، گاز طبیعی مانند متان و غیره که در تجزیه آلاینده نیز کمک می‌کنند، استفاده نمایند (۱۴).

از SCP در تغذیه دام، پروار‌بندی گوساله، مرغ، خوک، ماهی و در مواد غذایی به صورت حامل‌های آروماتیک، ویتامین‌ها، امولسیفایرها و بهبود ارزش غذایی محصولات پخته‌شده از قبیل سوپ‌ها، غذاهای آماده و نیز به عنوان پایدارکننده کف به کار می‌روند (۷، ۱۳).

از مزیت های مهم مخمر ها در تولید پروتئین تک یاخته در مقایسه با باکتری‌ها، رشد نسبتاً بالا، تولید محصول بیشتر در زمان کوتاه‌تر، آسان بودن استخراج پروتئین تولیدشده و آلودگی بسیار پایین محصول میکروبی حاصل از استخراج (به لحاظ رشد مخمرها در

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-06-29]

pH اسیدی) می‌باشد (۱۵).

صفری و یعقوب زاده در سال ۱۳۹۳ در مطالعه‌ای تحت عنوان استفاده از مخمرها به منظور تولید پروتئین تک یاخته از امعاء و احشاء تون ماهیان دریافتند که مخمرهای مورداستفاده *کاندیدا اوتیلیس*، *ساکارومیسس سرویزیه* و *رودوتورولا گلوتینوس* بوده و سیستم مورداستفاده از نوع هوازی بوده که در شرایط بسته و در دو مقیاس آزمایشگاهی و فرمانتور (CSTR) انجام شد (۱۱).

نتایج نشان داد که میانگین وزنی پروتئین خام تولید شده به ازای یک لیتر از محیط کشت تهیه شده از پروتئین هیدرولیز شده امعاء و احشاء، بین ۳۲ تا ۳۸ گرم و ۳۷/۵ تا ۴۵ گرم در لیتر در دو مقیاس آزمایشگاهی و فرمانتور بوده است. میزان رشد مخمر کاندیدا اوتیلیس نسبت به سایر مخمرها سریع‌تر بوده و درصد پروتئین خام تولیدشده از آن نیز بیشتر بوده است. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که با مهیا نمودن شرایط مطلوب رشد مخمرها و استفاده از فرمانتور مناسب، می‌توان درصد بالایی از پروتئین میکروبی از ضایعات ماهی تولید کرده و به عنوان مکمل غذایی در غذای دام، طیور و آبزیان استفاده نمود (۱۶).

در مطالعه حاضر سویه‌های مخمری از پساب فاضلاب جدا سازی شد و پس از تأیید آن‌ها با استفاده از تکثیر ناحیه ITs و بررسی ارتباط تکاملی آن‌ها با سویه‌های S1 (*کاندیدا آلبیکنس* NG67) و S2 (*کاندیدا آلبیکنس* m48a) حذف سلنیومی انجام شد. برای این منظور سویه‌های دارای قابلیت سلنیوم کلنی‌های قرمزرنگ در محیط PYD آگار حاوی سلنیت بود. این سویه‌ها به عنوان سویه‌های برتر انتخاب شدند. در ادامه به منظور انتخاب بهترین سویه مخمری کارآمد جهت انجام آزمایش‌ها سلنیت زدایی، آزمون MFC انجام شد. الگوی مقاومت سویه‌های مخمری جداشده با توجه به MFC نشان داد که بیش‌ترین مقاومت به یون سمی سلنیت (تحمل‌پذیری بالاتر از ۲۲ گرم در لیتر) مربوط به سویه S1 بود. این نتایج با مطالعه آشنگرف و همکاران مطابقت دارد. پروتئین تک یاخته از منابع مختلف قابل تهیه و تولید می‌باشد. محققین Safari مطالعات مختلفی را در ارتباط با تولید پروتئین تک یاخته از سوبستراهایی نظیر ضایعات کشاورزی (ملاس، برنج، مرکبات)، محصولات جانبی شیمیایی (متان و مشتقات نفتی) و ضایعات شیلاتی (نظیر پوست میگو) انجام داده‌اند. هر یک از مطالعات انجام‌شده، از میکروب یا میکروب‌های مختلف استفاده شده و شرایط مهیا نمودن محیط رشد میکروارگانیسم‌های مورداستفاده نیز متفاوت بوده است(۱۷). نتایج مطالعات اسچولز و همکارانش نشان داده که میزان پروتئین خام در SCP تولیدشده از مخمرها بین ۶۸-۳۹٪ بوده در صورتی که این میزان در SCP باکتریایی در حدود ۸۲٪ می‌باشد. میزان اسیدهای آمینه ضروری پروتئین مخمر بین ۸/۴-۶/۶ در صد گرم پروتئین بوده است. ولی با این وجود، میزان چربی کل در پروتئین با منشأ میکروب‌های مختلف، متغیر بوده است. نتایج تحقیق حاضر نیز نتایج فوق را تأیید می‌کند (۱۸).

نتایج مطالعات سموئل و همکارانش در سال ۱۹۹۲ نشان داد که به هنگام استفاده از میکروب‌ها، میانگین پروتئین خام در ضایعات ماهی و خرچنگ به ترتیب ۶۰/۴٪ و ۴۴/۱٪ بوده است. فرر و همکارانش از پوسته میگو در جهت تولید پروتئین میکروبی استفاده نمود و از مخمرهای دریایی به منظور دستیابی به این هدف بهره گرفته است. نتایج نشان داد که میزان رشد اختصاصی و ضریب تولید محصول به ترتیب ۰/۳۹۸ در ساعت و ۴۴۷٪ کیلوگرم وزن خشک سلول بوده است (۱۹).

در دوران اخیر به دلیل کمبود پروتئین، تلاش برای کشف جایگزین منابع معمول غذا و خوراک صورت گرفته است. SCP برای همه ارزان و برای خوردن امن است. همچنین می‌توان برای افزایش تولید SCP از میکروب‌های غیر سمی بهبودیافته ژنتیکی و پر محصول استفاده کرد (۲۰). دانشمندان طی تحقیقی لنزهای طبی را با سلنیوم پوشاندند تا از رشد و تکثیر باکتری ها بر روی لنزها جلوگیری شود و این آزمایش روی خرگوش انجام شد و نتیجه حاصله اینکه سلنیوم می تواند حدود دو ماه در محافظت از لنزها موثر باشد و از رشد و تکثیر باکتری ها روی لنزها جلوگیری نماید.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-06-29]

نتیجه‌گیری

موارد موجود در این تحقیق کاربرد فراوانی داشـــته و می‌توان از آن به عنوان یک ماده افزودنی و پروبیوتیک در جیره غذایی دام، طیور آبزیان اســـتفاده نمود. اما بایســـتی به این نکته توجه داشـــت که ارزیابی ســـایر فاکتورهای غذایی ازجمله وجود اســـیدهای نوکلئیک، پروفایل اسیدهای آمینه، میزان املاح معدنی و درنهایت انجام کامل تست فارمی لازم و ضروری به نظر می‌رسد. امروزه از پروتئین تولیدی به عنوان ماده غذایی جایگزین پودر ماهی در آبزیان اســـتفاده می‌گردد. برتری که پروتئین تولیدی نسبت به پودر ماهی دارد آن است که پروتئین تولیدی اولاً مقرون به صرفه‌تر بوده ثانیاً سرشار از پروتئین بوده ثالثاً به عنوان پروبیوتیک عمل کرده و به واسطه داشتن مخمر یا مخمرهای مفید باعث افزایش مقاومت آبزیان، تقویت سیستم ایمنی، افزایش رشد و بازماندگی، متعادل نمودن دستگاه گوارش و ... می‌شود.

References

1. Pearce C, Lloyd J, Guthrie J. The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells: a review. Dyes Pigments. 2003;58(3):179-96.
2. Şengil İA, Özacar M. The decolorization of CI Reactive Black 5 in aqueous solution by electrocoagulation using sacrificial iron electrodes. J Hazard Mat. 2009;161(2-3):1369-76.
3. Robinson T, Chandran B, Nigam P. Removal of dyes from a synthetic textile dye effluent by biosorption on apple pomace and wheat straw. Water Res. 2002;36(11):2824-30.
4. Henze M, Harremoes P, Jansen JL, Arvin E. Wastewater treatment: biological and chemical process: Springer; 2002.
5. Rhishipal R, Philip R. Selection of marine yeasts for the generation of single cell protein from prawn-shell waste. Bioresource Technol. 1998;65(3):255-6.
6. Gálvez A, Ramírez MdJ, García-Garibay M. Chemical composition of a mixture of single-cell protein obtained from Kluyveromyces fragilis and whey proteins. Arch Latinoamericanos Nutr. 1990;40(2):252-62.
7. Ravindra P. Value-added food:: Single cell protein. Biotechnol Adv. 2000;18(6):459-79.
8. Raraz AG. Biological and biotechnological waste management in materials processing. JOM. 1995;47(2):56-63.
9. Timberleey M, Rome I. Microorganisms and metal pollutants. J Environ Microbiol. 2002;17:403-23.
10. Bandara H, K Cheung B, Watt R, Jin L, Samaranayake L. Pseudomonas aeruginosa lipopolysaccharide inhibits C andida albicans hyphae formation and alters gene expression during biofilm development. mOL ORAL MICROBIOL. 2013;28(1):54-69.
11. Rippon JW. Medical mycology; the pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes: Eastbourne, UK; WB Saunders Company; 1982.
12. Prajapati S, Sharma M, Gupta P, Kumar M, Dwivedi B, Singh Arya B. Evaluation of antifungal activity of different homoeopathic mother tinctures against Candida albicans. 2017.
13. Hube B. Candida albicans secreted aspartyl proteinases. Curr Topics Med Mycol. 1996;7(1):55-69.
14. Blancou J, Calvet H, Riviere R. Single cell protein production from peanut shells. Revue d'elevage et de medecine veterinaire des pays tropicaux. 1978;31(3):363-8.
15. El-Saadany R, Khalaf H, El-Manawaty H, Salem F, editors. The production of single cell protein from agricultural wastes by fungi. 1 Conference of Food Science and Technology for Mediterranean Countries, Cairo (Egypt), 30 Mar-2 Apr 1986; 1986.
16. Ferrer J, Paez G, Marmol Z, Ramones E, Garcia H, Forster C. Acid hydrolysis of shrimp-shell wastes and the production of single cell protein from the hydrolysate. Bioresource Technol. 1996;57(1):55-60.
17. Safari R, Salmani A, Laloei F, Arshad R, Gholamipour S, Yaghobzadeh Z, et al. Single cell protein Production from culture and marine fish wastes. Iranian Fisheries Science Research Institut 2008.
18. Storebakken T, Kvien I, Shearer K, Grisdale-Helland B, Helland S, Berge G. The apparent digestibility of diets containing fish meal, soybean meal or bacterial meal fed to Atlantic salmon (Salmo salar): evaluation of different faecal collection methods. Aquaculture. 1998;169(3-4):195-210.
19. Mahnken CV, Spinelli J, Waknitz FW. Evaluation of an alkane yeast (Candida sp.) as a substitute for fish meal in Oregon Moist Pellet: feeding trials with coho salmon (Oncorhynchus kisutch) and rainbow trout (Salmo gairdneri). Aquaculture. 1980;20(1):41-56.
20. Nilsang S, Lertsiri S, Suphantharika M, Assavanig A. Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. J Food Eng. 2005;70(4):571-8.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-06-29]