مجله دانشگاه علوم پزشکی فسا | سال دهم | شماره ۱ | بهار ۱۳۹۹

مقاله پژوهشی

طراحی ماتریکس ترکیبی L18 تاگوچی برای بهبود عملکرد مخمر بومی Trichosporon sp. Cas se5 در حذف سلنیت

مراحم آشنگرف*، راضیه ارجمند

گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۱۰/۳۰ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۰۵/۰۱

چکیده

زمینه و هدف: سلنیوم در سطوح پایین، اهمیت فیزیولوژیک دارد و به‌عنوان ریزمغذی ضروری برای انسان‌ها و حیوانات محسوب می‌شود. بااین‌حال، غلظت‌های بالای سلنیوم محلول (سلنیت)، منجر به مسمومیت حاد سلنیومی (سلنوزیس) می‌شود. این مطالعه باهدف کاربرد روش تاگوچی به‌عنوان یک روش مؤثر، کارآمد و بدون نیاز به تعداد زیاد آزمایش، جهت بهینه کردن حذف سلنیت انجام شد.

مواد و روش‌ها: متغیرهای مستقل در این مطالعه؛غلظت اولیه یون سلنیت، غلظت اولیه بیومس سلول، غلظت اولیه کلرید سدیم، دور همزن و pH بودند که هرکدام دارای سه سطح بودند. برای متغیرهای مذکور آرایه متعامد L18 طراحی شد. آزمایش‌ها سه بار تکرار و میانگین مقادیر آن‌ها به‌صورت نتایج نهایی به کمک نرم‌افزار Qualitek-4 مورد تجزیه‌وتحلیل آماری قرار گرفت.

نتایج: عوامل با تأثیر معنی‌داری بر فرآیند حذف میکروبی سلنیت به ترتیب اهمیت یون سلنیت در غلظت ۸ گرم در لیتر، دور شیکر ۸۰rpm، کلرید سدیم در غلظت ۲/۵ درصد وزنی/حجمی، بیومس سلول در غلظت ۴۰ گرم در لیتر و pH برابر ۶/۸ تعیین شدند. تحت شرایط بهینه، ماکزیمم حذف سلنیت در سطح معنی‌داری ۵٪ ($p< 0.05$)، ۹۲/۱ درصد پس از ۴۸ ساعت گرما گذاری تخمین زده شد.

نتیجه‌گیری: مطالعه اخیر نخستین گزارش از کاربرد موفقیت‌آمیز روش تاگوچی در بهینه‌سازی حذف سلنیت تحت شرایط سلول‌های در حال استراحت مخمر بومی *Trichosporon* sp. به‌عنوان کاتالیست زیستی است. بنابراین استفاده از روش‌های بهینه‌سازی انجام‌شده در این تحقیق را می‌توان برای زیست پالایی محیط‌های آلوده پیشنهاد نمود.

کلمات کلیدی: بهینه‌سازی، تاگوچی، حذف سلنیت، *Trichosporon* sp

مقدمه

عمده‌ترین آلاینده‌های مکان‌های دفع زباله، فلزات سنگین و شبه فلزات می‌باشند. در میان شبه فلزات جدول تناوبی آرسنیک، سلنیوم و تلوریوم به دلیل تجمع بالا و اثرات سمی که دارند از مهم‌ترین عناصر موردتوجه در حوزه محیط‌زیست و سلامت به شمار می‌روند (۱). سلنیوم شصت و ششمین عنصر فراوان موجود در زمین است که دارای ۶ فرم ایزوتوپی است که در غلظت‌های ۰/۰۱ تا ۲ میکروگرم در هر گرم از سطح خاک به‌صورت اکسی آنیون‌های سلنات Se(IV)، سلنیت Se(IV)، سلنید Se(−II) و سلنیوم عنصری Se^0 و همچنین فرم‌های آلی سلنوسیستئین و سلنومتیونین و شکل آنیونی سلنوسیانات موجود است (۲). سلنیوم یکی از عناصر پرکاربرد در صنایع شیشه‌سازی، تولید سلول‌های نوری، سلول‌های خورشیدی، یکسو کننده‌ها، دستگاه‌های فتوکپی و به‌عنوان افزودنی برای ساخت فولاد ضدزنگ استفاده می‌شود (۳). سلنیوم به‌عنوان یک ریزمغذی و آنتی‌اکسیدانت بالقوه در پیشگیری از سرطان، تقویت سیستم

*نویسنده مسئول: **مراحم آشنگرف**، گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران
Email: m.ashengroph@uok.ac.ir
https://orcid.org/0000-0001-6821-0192

ایمنی، بهبود عملکرد سلول‌های قلب و ماهیچه مفید است (۴ و ۵). دسترسی زیستی، سمیت و حفاظت شیمیایی سلنیوم به نوع ترکیب، تمایل به جذب و انباشت در سلول‌ها بستگی دارد. از میان اکسی آنیون‌های سلنیوم، سلنیت با انحلال‌پذیری و نرخ تجمع زیستی بالا به‌عنوان سمی‌ترین فرم اکسی آنیون سلنیوم محسوب می‌شود، به‌طوری‌که افزایش آن در محیط اثرات منفی بر سلامت انسان و جانوران دارد (۶). بسیاری از فعالیت‌های انسانی منجر به تجمع این ترکیب سمی در محیط‌زیست می‌شود. معدن، کشاورزی، متالورژی، احتراق سوخت‌های فسیلی، دفع ناقص زباله‌ها و عملیات نظامی حجم زیادی از سلنیت سمی را به محیط‌زیست منتشر کرده‌اند (۷). اکسی آنیون سلنیت از طریق تماس پوستی، استنشاق هوا و مصرف آب، گیاه و جانورانی که از رژیم غذایی حاوی تولیدات خاک‌های سلنیومی استفاده می‌کنند، به سیستم زنده منتقل می‌شود. از عوارض سمیت ناشی از غلظت بالای سلنیت، ایجاد سلنوسیس است. سلنوسیس، مسمومیت ناشی از سلنیوم است که به دو صورت حاد یا مزمن برزو می‌کند. مسمومیت حاد ناشی از مواجهه شغلی در صنایعی چون ریز الکترونیک، زیراکس، نیمه‌هادی‌ها و صنایع نوری است. مسمومیت مزمن به علت حضور سطح بالایی از سلنیت در غذا و آب رخ می‌دهد که باعث بی‌رنگ شدن پوست، ریزش مو، بی‌شکل شدن (دفرمه شدن) ناخن‌ها، پوسیدگی دندان و تغییر رنگ آن‌ها، ضعف و عدم هوشیاری، خستگی، تحریک‌پذیری، آسیب‌های خفیف عصبی، واکنش مفرط، لرزش و نوروپاتی محیطی می‌شود (۸). از نشانه‌های سلنوسیس حاد سیروز کبدی، ادم ریوی، ترومبوسیتوپنی مشکلات تیروئید و مرگ است (۷ و ۸). پاک‌سازی محیط‌های آلوده به سلنیت صدمات ناشی از این ترکیب سمی را به حداقل می‌رساند. چندین روش معمول برای پاک‌سازی اکسی آنیون سلنیت وجود دارد. ازجمله این روش‌ها تصفیه فیزیکی و شیمیایی است. از معایب این روش‌ها هزینه بالای اجرایی و مواد مصرفی، بازده کمتر در غلظت‌های پایین سلنیت و تغییرات چشمگیر در خواص فیزیک و شیمیایی خاک و آب است (۹). این معایب منجر به استفاده از تکنیک‌های سازگارتر با محیط‌زیست و مقرون‌به‌صرفه تر شده است. تکنیک‌های جدید مثل زیست پالایی میکروبی (Microbial bioremediation)، به دلیل بازده بالایی که نسبت به تکنیک‌های فیزیکی و شیمیایی دارند مقرون‌به‌صرفه ترند (۱۰). تحقیقات نشان داده است که افزودن اکسی آنیون سلنیت به محیط کشت مخمری از طریق سیستم بسته منجر به تولید مقدار قابل‌توجهی سلنیوم جذب‌شده به‌وسیله مخمر می‌شود. در طی این فرایند حذف میکروبی، سلنیت معدنی با سمیت بالا و زیست سازگاری کمتر به گونه‌های با سمیت کمتر و زیست سازگارتر با خواص تغذیه‌ای تبدیل می‌شود؛ بنابراین بهینه‌سازی محیط کشت طبیعی برای پاک‌سازی این آلاینده‌ها از محیط، امری مناسب به نظر می‌رسد (۱۱). طراحی آزمایش‌ها، بررسی توأم چندین متغیر فرآیند است. با ترکیب چندین متغیر در یک مطالعه، به‌جای انجام مطالعات مجزا برای هر یک از آن‌ها، تعداد آزمایش‌های موردنیاز به میزان قابل‌توجهی کاهش‌یافته و درنتیجه درک بهتری در مورد فرآیند حاصل می‌گردد. روش‌های طراحی آزمایش، ما را دررسیدن به تولید بهینه متابولیت‌های صنعتی و همچنین بهبود فرآیندهای حذف زیستی یاری می‌نماید. در این میان، روش آماری تاگوچی به‌عنوان یک روش قدرتمند طراحی آزمایش، امکان بررسی حداکثر متغیرهای مؤثر بر فرآیند، بررسی اینترکشن میان فاکتورهای مختلف و تعیین ترکیب بهینه فاکتورهای مورد آزمایش را با انجام تعداد کمی آزمایش تجربی فراهم می‌کند (۱۲). در این پژوهش برای نخستین بار، بهینه-سازی حذف میکروبی سلنیت به‌وسیله سلول‌های در حال استراحت مخمر بومی *Trichosporon*، جداشده از دریای خزر، با استفاده از مدل آماری تاگوچی مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد، میکروارگانیسم و شرایط رشد: مواد بکار گرفته‌شده در این مطالعه؛ شامل سلنیت سدیم، معرف ۳ و ۳- دی آمینو بنزیدین، حلال تولوئن، اسیدکلریدریک، نمک کلرید سدیم، فسفات دی هیدروژن پتاسیم، دی پتاسیم هیدروژن فسفات، عصاره مخمر، پپتون، گلوکز و آگار- آگار که از کمپانی‌های سیگما و مرک تهیه شدند. میکروارگانیسم مورداستفاده در این پژوهش مخمر بومی دریازی *Trichosporon sp.* Cas se5 بود که دارای قابلیت تحمل‌پذیری ذاتی بالا نسبت به یون سمی سلنیت (۲۲ گرم در لیتر) بود. مخمر مذکور از دریای خزر جداسازی و با شماره دستیابی KT033396 در بانک اطلاعات ژنی NCBI ثبت شد (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KT033396). جهت رشد و نگهداری سویه مخمری مذکور از محیط کشت YPD (Yeast Peptone Dextrose) غنی‌شده با کلرید سدیم که حاوی ۲۰ گرم در لیتر گلوکز، ۲۰ گرم در لیتر پپتون، ۱۰ گرم

در لیتر عصاره مخمر و ۳۰ گرم در لیتر نمک کلرید سدیم بود، استفاده شد (۱۳).

آزمایش‌های سلنیت زدایی تحت شرایط سلول‌های در حال استراحت: آزمایش‌ها در داخل ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر بافر فسفات (K_2HPO_4/KH_2PO_4, 100 mM) و غلظت‌های مختلف سلنیت، بیومس سلول و غلظت‌های مختلف NaCl در pH و دور شیکرهای مختلف تحت شرایط سلول‌های در حال استراحت انجام شد. همه آزمایش‌های سلنیت زدایی تحت شرایط دمایی ۳۰ درجه سانتی‌گراد و در یک دوره انکوباسیون ۴۸ ساعت صورت گرفت. به‌منظور تهیه سلول‌های در حال استراحت مخمر بومی *Trichosporon* و استفاده از آن‌ها به‌عنوان بیوکاتالیست در آزمایش‌های سلنیت زدایی، سلول‌های مخمری در محیط مایع YPD در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دور شیکر ۱۰۰ rpm به مدت ۲۴ ساعت (تا رسیدن به انتهای فاز رشد لگاریتمی) کشت داده شدند. سپس توده سلولی به کمک سانتریفیوژ برداشت و پس از شستشوی سلول‌ها در بافر فسفات، از سلول‌های برداشت‌شده به‌عنوان کاتالیست در آزمایش‌های سلنیت زدایی استفاده شد (۱۴). به‌منظور سنجش میزان سلنیت اولیه و باقیمانده در محیط واکنش و درنهایت تخمین درصد حذف سلنیت از متد کالری متری به کمک معرف ۳ و ۳- دی آمینوبنزیدین و اندازه‌گیری جذب سلنیت در طول‌موج ۴۲۰ نانومتر استفاده شد (۱۵).

بهینه‌سازی فرآیند حذف سلنیت با روش آماری تاگوچی: از روش طراحی تاگوچی جهت ارزیابی اثر پنج متغیر مستقل بر حذف سلنیت توسط سلول‌های در حال استراحت مخمر بومی *Trichosporon* استفاده شد. متغیرهای مستقل در این مطالعه غلظت اولیه یون سلنیت، غلظت اولیه بیومس سلول، غلظت اولیه کلرید سدیم، دور همزن و pH بودند که هرکدام دارای سه سطح بودند. برای متغیرهای مذکور آرایه متعامد L18 طراحی شد. معمولاً پس از تشکیل جدول ANOVA و انجام آزمون معناداری درروش تاگوچی، واریانس خطا با استفاده از روش آماری Pooling انجام می‌شود. با استفاده از تکنیک مذکور فاکتورهایی که دارای تأثیر ناچیز هستند به‌عنوان منبع خطا در نظر گرفته‌شده و حذف می‌شوند. بدین ترتیب متغیرهایی که pool نشده باشند به‌عنوان فاکتورهای معنی‌دار معرفی می‌شوند. آزمایش‌ها سه بار تکرار و میانگین مقادیر آن‌ها به‌صورت نتایج نهایی به کمک نرم‌افزار Qualitek-4 مورد تجزیه‌وتحلیل آماری قرار گرفت و درنهایت شرایط بهینه واکنش تخمین زده شد.

نتایج

در این پژوهش از روش آماری تاگوچی به‌عنوان یکی از پرکاربردترین روش‌های فاکتوریل جزئی استفاده شد. نتایج مهمی که می‌توان از به‌کارگیری طراحی آزمایش‌ها به روش تاگوچی در حذف زیستی سلنیت توسط مخمر بومی

جدول ۱- طراحی آرایه متعامد L18 تاگوچی برای بهینه‌سازی فرآیند حذف زیستی سلنیت تحت شرایط سلول‌های در حال استراحت مخمر بومی *Trichosporon*

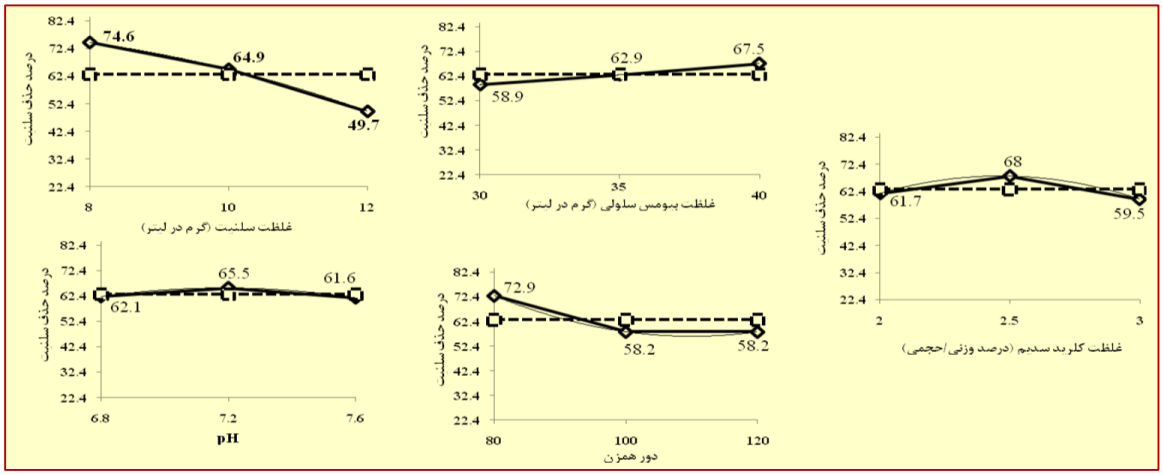
	یون سلنیت	بیومس سلولی	کلرید سدیم	دور همزن	pH	درصد حذف سلنیت
آزمایش ۱	۸	۳۰	۲	۸۰	۶/۸	۷۵/۶
آزمایش ۲	۸	۳۵	۲/۵	۱۰۰	۷/۲	۷۸/۳
آزمایش ۳	۸	۴۰	۳	۱۲۰	۷/۶	۶۹/۱
آزمایش ۴	۱۰	۳۰	۲	۱۰۰	۷/۲	۵۵/۳
آزمایش ۵	۱۰	۳۵	۲/۵	۱۲۰	۷/۶	۵۹/۴
آزمایش ۶	۱۰	۴۰	۳	۸۰	۶/۸	۷۴/۱
آزمایش ۷	۱۲	۳۰	۲/۵	۸۰	۷/۶	۶۴/۵
آزمایش ۸	۱۲	۳۵	۳	۱۰۰	۶/۸	۴۱/۷
آزمایش ۹	۱۲	۴۰	۲	۱۲۰	۷/۲	۴۹/۴
آزمایش ۱۰	۸	۳۰	۳	۱۲۰	۷/۲	۶۷/۴
آزمایش ۱۱	۸	۳۵	۲	۸۰	۷/۶	۸۰/۳
آزمایش ۱۲	۸	۴۰	۲/۵	۱۰۰	۶/۸	۷۷/۴
آزمایش ۱۳	۱۰	۳۰	۲/۵	۱۲۰	۶/۸	۶۰/۳
آزمایش ۱۴	۱۰	۳۵	۳	۸۰	۷/۲	۷۴/۴
آزمایش ۱۵	۱۰	۴۰	۲	۱۰۰	۷/۶	۶۶/۳
آزمایش ۱۶	۱۲	۳۰	۳	۱۰۰	۷/۶	۳۰/۶
آزمایش ۱۷	۱۲	۳۵	۲	۱۲۰	۶/۸	۴۳/۷
آزمایش ۱۸	۱۲	۴۰	۲/۵	۸۰	۷/۲	۶۸/۷

Trichosporon انتظار داشت عبارت‌اند از: دستیابی به اثر تغییر سطح هر یک از متغیرهای واکنش بر روند حذف سلنیت، ارزیابی اثر متقابل جفت متغیرهای مختلف بر میزان حذف، تعیین سهم نسبی هر فاکتور در فرآیند بهینه‌سازی به‌وسیله روش تحلیل واریانس، تعیین شرایط بهینه و درنهایت سنجش راندمان حذف سلنیت تحت شرایط بهینه‌شده واکنش. برای این منظور غلظت سلنیت (۸، ۱۰ و ۱۲ گرم در لیتر)، غلظت بیومس سلول (۳۰، ۳۵ و ۴۰ گرم در لیتر)، غلظت NaCl (۲، ۲/۵ و ۳ گرم در لیتر)، دور شیکر (۸۰، ۱۰۰ و ۱۲۰) و pH (۶/۸، ۷/۲ و ۷/۶) به‌عنوان فاکتورهای مؤثر در نظر و در سه سطح در نظر گرفته شدند.

با توجه به تعداد متغیرها، سطح‌های انتخاب‌شده و اثر متقابل بین جفت فاکتورها، درجه آزادی برابر ۱۷ است که لزوم انتخاب آرایه متعامد L18 با ۱۸ آزمایش مختلف را ایجاب می‌کند (جدول ۱). در جدول (۱) آزمایش‌های انجام‌شده مطابق با جدول آرایه استاندارد L18، فاکتورها و سطوح بکار گرفته‌شده مشاهده می‌شود. همان‌طور که در جدول نشان داده‌شده است درصد حذف سلنیت بر مبنای اثر ترکیبی فاکتورهای انتخاب‌شده در محدوده ۳۰/۶ تا ۸۰/۳ است.

در ادامه این مطالعه، اثر تغییر سطح هرکدام از متغیرهای موردبررسی بر روند فرآیند حذف سلنیت تحت شرایط سلول‌های در حال استراحت مخمر *Trichosporon* بررسی شد (شکل ۱). همان‌گونه که در شکل (۱) آورده شده است راندمان‌های بالاتری از حذف سلنیت در سطح سه بیومس سلول (۴۰ گرم در لیتر)، سطح‌های دو کلرید سدیم (۲/۵ درصد) وpH برابر (۷/۲) مشاهده شد.

در ارتباط با غلظت‌های سلنیت و دور همزن بیشترین میزان حذف سلنیت در سطح یک سلنیت یعنی ۸ گرم در لیتر و دور شیکر ملایم ۸۰ rpm مشاهده گردید. با استفاده از طراحی



شکل ۱- اثر تغییر سطح هر یک از متغیرهای واکنش بر روند حذف سلنیت توسط مخمر *Trichosporon*

جدول ۲-ارزیابی اثر اینترکشن بین جفت فاکتورهای آزمایش روی حذف سلنیت توسط مخمر *Trichosporon*

تأثیر جفت فاکتور	درصد شدت تأثیر متقابل	شرایط بهینه (سطح)
بیومس × pH	۵۹/۸	(۲ و ۲)
دور همزن× NaCl	۳۳/۹۷	(۱ و ۱)
NaCl × pH	۲۵/۲۶	(۲ و ۲)
بیومس ×NaCl	۲۰/۵۸	(۲ و ۳)
دور همزن × pH	۱۹/۹۸	(۱ و ۱)
دور همزن×سلنیت	۱۵/۹۶	(۱ و ۱)
دور همزن×بیومس	۱۴/۱۷	(۱ و ۲)
pH ×سلنیت	۱/۹۲	(۱ و ۱)
بیومس×سلنیت	۱/۷۷	(۲ و ۱)
NaCl ×سلنیت	۱/۰۱	(۱ و ۱)

آزمایش‌ها به کمک روش آماری تاگوچی می‌توان اینترکشن بین جفت متغیرهای واکنش را بررسی کرد که نتایج در جدول (۲) آورده شده است. همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود درمجموع ده اینترکشن مشاهده‌شده که بالاترین درصد شدت تأثیر متقابل یعنی ۵۹/۸ بین بیومس و pH مشاهده‌شده است. این در حالی است که کمترین درصد اینترکشن معادل ۱/۰۱ درصد بین کلرید سدیم و سلنیت مشاهده می‌شود. در حقیقت با بررسی اینترکشن بین جفت فاکتورهای واکنش می‌توان نتیجه گرفت که تأثیر یک عامل روی فرآیند بهینه‌سازی کاملاً وابسته به شرایط فاکتورهای دیگر دارد (۱۶).

در ارتباط با آزمایش بالا، به دنبال تکنیک Pooling و حذف متغیر pH که دارای کم‌ترین تأثیرپذیری (فاصله اطمینان ۷۱/۲۳ درصد) بود، فاصله اطمینان برای فاکتورهای سلنیت، دور شیکر، نمک کلرید سدیم و بیومس سلول به ترتیب به ۹۹/۹۹، ۹۹/۹۷، ۹۸/۲۲ و ۹۷/۸۴ درصد افزایش‌یافته است. ستون آخر جدول ANOVA سهم نسبی هر فاکتور در فرآیند بهینه‌سازی حذف سلنیت را نشان می‌دهد. فاکتور غلظت سلنیت اولیه مؤثرترین عامل و پس‌ازآن دور شیکر و غلظت کلرید سدیم بیشترین تأثیرپذیری را داشتند. این در حالی است که غلظت بیومس سلول کمترین تأثیرپذیری را در بهینه‌سازی فرآیند حذف میکروبی سلنیت داشته است (جدول ۳). در جدول (۳) تحلیل واریانس نتایج حاصل از حذف میکروبی سلنیت با ۹۵ درصد اطمینان و پس از تکنیک Pooling در قالب جدول ANOVA ارائه‌شده است.

به‌منظور تخمین ترکیب سطح بهینه فاکتورهای استفاده‌شده در فرآیند حذف سلنیت توسط مخمر *Trichosporon* از روش آماری «هرچه بزرگ‌تر بهتر (Bigger to Bigger Analysis)» پیشنهادشده توسط نرم‌افزار Qualitek-4 استفاده شد. سطح و مقدار بهینه فاکتورها، میزان سهم هر فاکتور در بهبود فرآیند حذف و همچنین بیش‌ترین میزان حذف سلنیت پیش‌بینی‌شده تحت شرایط بهینه در جدول (۴) نشان داده‌شده است.

جدول ۳. نتایج آنالیز واریانس مربوط به حذف میکروبی سلنیت توسط سلول‌های در حال استراحت مخمر بومی Trichosporon با ۹۵ درصد اطمینان و پس از عمل POOLING

فاکتور	درجه آزادی (DOF)	مجموع مربعات Sum of) (Squares	واریانس (Variance)	نسبت واریانس (F- Ratio)	مجموع مربعات خالص (S′ pure sum)	درصد تأثیر هر فاکتور (Percent ٪)
یون سلنیت	۲	۱۸۹۲/۵۸۷	۹۴۶/۲۹۳	۵۱/۴۱۴	۱۸۵۵/۷۷۷	۵۴/۶۶۲
بیومس سلول	۲	۲۱۹/۵۷۴	۱۰۹/۷۸۷	۵/۹۵۶	۱۸۲/۷۶۴	۵/۳۸۳
کلرید سدیم	۲	۲۳۶/۲۴۸	۱۱۸/۱۲۴	۶/۴۱۸	۱۹۹/۴۳۸	۵/۸۷۴
دور همزن	۲	۸۶۳/۳۷۸	۴۳۱/۶۸۹	۲۳/۴۵۴	۸۲۶/۵۶۸	۲۴/۳۴۶
pH	(۲)	(۵۴/۳۳۸)		POOLED	CL=٪۷۱/۲۳	
اثر عوامل دیگر (خطا)	۹	۱۸۳/۱۷۳	۲۰/۳۵۲			۹/۷۳۵
مجموع	۱۷	۳۳۹۴/۹۶۲				٪۱۰۰

جدول ۴- شرایط بهینه پیش‌بینی‌شده توسط نرم‌افزار Qualitek برای بهبود عملکرد مخمر بومی *Trichosporon* در حذف سلنیت

فاکتور	سطح مطلوب آزمایش	مقدار بهینه فاکتور	درصد سهم فاکتور در بهبود حذف سلنیت
یون سلنیت	۱	۸ گرم در لیتر	۱۱/۵۴۴
بیومس سلول (وزن تر)	۳	۴۰ گرم در لیتر	۴/۳۶۱
نمک کلرید سدیم	۲	۲/۵ درصد	۴/۹۶۱
دور همزن	۱	۸۰ rpm	۹/۷۹۴
درصد حذف سلنیت پیش‌بینی‌شده در شرایط بهینه			۹۳/۷
درصد حذف سلنیت مشاهده‌شده در شرایط بهینه			۹۲/۱

همان‌گونه که در جدول (۴) مشاهده می‌شود برمبنای شرایط پیش‌بینی‌شده توسط روش تاگوچی انتظار می‌رود که میزان پاسخ پیش‌بینی‌شده (درصد حذف زیستی سلنیت) بر اساس ترکیب بهینه متغیرهای مورد آزمایش ۹۳/۷ درصد باشد. برای انجام آزمایش تأییدی میزان حذف سلنیت پیش‌بینی‌شده تحت شرایط بهینه با میزان حذف سلنیت به‌دست‌آمده در شرایط آزمایش با یکدیگر مقایسه می‌شود و چنانچه در فاصله مطلوب قرار گیرد طراحی آزمایش درست و بهینه‌سازی به پایان می‌رسد. به همین علت آزمایشی با استفاده از سلول‌های در حال استراحت مخمر *Trichosporon* در محیط بافری فسفات و بر اساس ترکیب سطح بهینه متغیرهای به‌دست‌آمده در جدول (۴) انجام و درصد حذف سلنیت به‌دست‌آمده ارزیابی شد. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، درصد حذف سلنیت به‌دست‌آمده (۹۲/۱) با درصد حذف پیش‌بینی‌شده (۹۳/۷) در فاصله مطلوب قرار گرفت؛ بنابراین، سلول‌های در حال استراحت سویه مذکور ازلحاظ متابولیکی فعال بوده و توانسته است بیش از ۹۲ درصد از غلظت اولیه سلنیت را در محیط واکنش کاهش و میزان آن را از ۸ گرم در لیتر به حدود ۰/۶ گرم در لیتر برساند.

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به گسترش روزافزون صنایع و افزایش آلودگی‌های زیست‌محیطی نیاز به رفع خطرات ناشی از این آلودگی‌ها محسوس است. ازجمله این آلودگی‌ها فلزات سنگین و شبه فلزات است که از طریق دفع پساب‌ها و زباله‌ها وارد کانال‌های آب و درنتیجه زنجیره غذایی می‌گردند (۱۷). آلودگی با فلزات سنگین مسئله زیست‌محیطی جدی است؛ بنابراین شناخت توانایی میکروارگانیسم‌ها و مواد زیستی جهت حذف فلزات از مکان‌های آلوده، آن‌ها را به‌عنوان روش‌های ارزان و مناسب جهت پالایش و حذف فلزات قلمداد کرده است (۱۸)؛ بنابراین بهینه‌سازی و تعیین شرایط مناسب عوامل مؤثر در کارایی فرآیندهای زیستی در توسعه این فرآیند تأثیر بسزایی دارد. روش آماری تاگوچی یکی از پرکاربردترین روش‌های فاکتوریل جزئی است. در این روش تعدادی از ترکیب‌های ممکن بین فاکتورها انتخاب می‌شوند و پس از انجام شدن آزمایش‌ها با ارزیابی آماری پاسخ‌های به‌دست‌آمده، بهترین وضعیت که ممکن است در بین حالت‌های آزمایش‌شده نیز موجود نباشد، به‌عنوان شرایط بهینه تعیین می‌گردد. از مزیت‌های این روش بررسی تأثیر عوامل چندگانه و مستقل مؤثر در آزمایش، کاهش تعداد آزمایش‌ها در مقیاس صنعتی و آزمایشگاهی است. در این مطالعه سویه مخمری *Trichosporon* مقاوم به سلنیت از دریای خزر جدا گردید و قابلیت آن برای حذف سلنیت از محیط‌های آلوده تحت شرایط سلول‌های در حال استراحت مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور، فاکتورهای مؤثر بر رشد و حذف سلنیت توسط این جدایه بررسی شد. طراحی آزمایش و تعیین فاکتورها با استفاده از روش تاگوچی صورت گرفت. برای انجام آزمایش‌ها پنج فاکتور غلظت اولیه یون سلنیت، غلظت اولیه بیومس سلول (برحسب وزن تر سلول)، غلظت اولیه نمک کلرید، دور شیکر و pH انتخاب و از طرح آزمایش تاگوچی L18 برای مطالعه فاکتورها و اینترکشن بین آن‌ها استفاده شد. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده عوامل با تأثیر معنی‌داری بر فرآیند حذف سلنیت به ترتیب اهمیت یون سلنیت، دور شیکر، کلرید سدیم، بیومس سلول و pH تعیین شدند. تحت شرایط بهینه در سطوح انتخاب‌شده این فاکتورها، ماکزیمم حذف سلنیت در سطح معنی‌داری ۹۵ درصد، ۹۲/۱ درصد پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون تخمین زده‌شده است. نتایج نشان داد که طراحی تاگوچی ابزاری قدرتمند برای بهینه‌سازی و بهبود فرآیند حذف زیستی سلنیت در سویه مخمری موردمطالعه بوده است. تاکنون مطالعات گوناگونی در جهت حذف میکروبی سلنیت از محیط‌های آلوده و همچنین بهینه‌سازی فاکتورهای مؤثر ازجمله غلظت اولیه یون سلنیت، دما، pH، هوادهی و مدت‌زمان انکوباسیون بر فرآیند تجمع زیستی سلنیوم در توده سلول میکروبی از طریق طراحی آزمایش‌ها مختلف انجام‌شده است. در مطالعه‌ای که توسط Zhang و همکاران بر روی قارچ *Thelephora ganbajun* جهت غنی‌سازی بیومس سلول حاوی سلنیوم با تلقیح سلنیت سدیم انجام گرفت. شرایط کشت بهینه که منجر به عملکرد زیست‌توده حداکثر با استفاده از روش سطح پاسخ (RSM) به دست آمد شامل pH اولیه ۵/۸، دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد و دور شیکر ۱۷۰ دور در دقیقه بود (۱۹). در مطالعه‌ای دیگر اثر شرایط کشت (درجه حرارت، pH اولیه و حجم محیط کشت) در تجمع زیستی سلنیوم در مخمر *Saccharomyces cerevisiae* توسط روش پاسخ سطحی برمبنای طراحی باکس- بنکن موردبررسی قرار گرفت. مقادیر بهینه یعنی دمای ۲۷/۴ درجه سانتی‌گراد، pH اولیه ۵/۸ و حجم محیط کشت ۸۹/۴ میلی‌متر با دور همزن ثابت ۱۶۰rpm گزارش شد (۲۰). در مطالعه‌ای دیگر با استفاده از طراحی پلاکت- بورمن،

اثر شرایط مختلف کشت مثل دما، pH دور شیکر، دوره انکوباسیون، میزان تلقیح، غلظت اولیه سلنیت در حذف سلنیت به سلنیوم در مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* موردبررسی قرار گرفت. در این بررسی بهینه شرایط با حداکثر تجمع سلنیوم آلی عبارت بودند 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). در مطالعه‌ای دیگر حذف سلنیت و تجمع سلنیوم توسط مخمر *Candida utilis* موردبررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج این آزمایش سه عامل، غلظت سلنیت سدیم، pH اولیه و دمای انکوباسیون انتخاب شدند. برای بهینه‌سازی عوامل مختلف از روش پاسخ سطحی استفاده شد و شرایط مطلوب به شرح زیر به دست آمد: زمان انکوباسیون ۳۰ ساعت، غلظت سلنیت سدیم ۳۵ میلی‌گرم بر لیتر، pH اولیه ۶/۶، دمای انکوباسیون ۲۷ درجه سانتی‌گراد، حجم محیط ۱۵۰ میلی‌لیتر بود. در این بررسی میزان حذف سلنیت سدیم ۷۹/۱ درصد بود (۲۲). اگرچه گزارش‌های متعددی در ارتباط با بهینه‌سازی فرآیندهای زیست‌فناوری به‌وسیله روش آماری تاگوچی وجود دارد، بااین‌حال، این مطالعه نخستین گزارش از کاربرد موفقیت‌آمیز روش تاگوچی در بهینه‌سازی حذف میکروبی سلنیت تحت شرایط سلول‌های در حال استراحت مخمری به عنوان کاتالیست زیستی است. بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق، چنانچه بهینه‌سازی شرایط واکنش حذف تحت شرایط سلول‌های در حال استراحت مخمر *Trichosporon* جهت بهینه نمودن حذف میکروبی سلنیت انجام گیرد می‌توان به راندمان‌های قابل‌قبول بدون استفاده از موادی که مستلزم صرف هزینه‌های بالای اقتصادی هستند، دست‌یافت. بنابراین استفاده از روش‌های بهینه‌سازی انجام‌شده در این تحقیق را می‌توان برای زیست پالایی محیط‌های آلوده به فلزات و اکسی آنیون‌های سمی در سویه‌های مشابه پیشنهاد نمود.

تشکر و قدردانی

این مقاله پژوهشی مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی ارشد خانم راضیه ارجمند (کد رهگیری در ایران داک: ۲۲۴۱۰۳۶، تاریخ ۱۳۹۴/۷/۲۸) تحت راهنمایی دکتر مراحم آشنگرف و با حمایت مالی و معنوی دانشگاه کردستان اجراشده است که بدین‌وسیله، نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را اعلام می‌دارد.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده‌اند.

References

1. Emsley, J. Nature’s Building Blocks: An A-Z Guide to the Elements. New York: Oxford University; 2011; pp. 720.
2. Biswas KC, Barton LL, Tsui WL, Shuman K, Gillespie J, Eze CS. A novel method for the measurement of elemental selenium produced by bacterial reduction of selenite. Journal of Microbiological Methods. 2011; 86(2): 140-144.
3. Soudi MR, Ghazvini PTM, Khajeh K, Gharavi S. Bioprocessing of selenooxyanions 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. 2009; 165 (1-3): 71-77.
4. Anjaria KB, Madhvanath U. Genotoxicity of selenite in diploid yeast. Mutatation research. 1998; 204(4): 605–614.
5. Beck MA. Selenium as antiviral agent. Kluwer Academic Publishers; 2001; pp. 235-245.
6. Dungan RS, Frankenberger WT. Microbial transformations of selenium and the bioremediation of seleniferous environments. Bioremediation Journal. 1999; 3 (3): 171–188.
7. Wernick IK, Themelis NJ. Recycling metals for the environment. Annual Review of Energy and the Environment. 1998; 23: 465-497.
8. MacFarquhar JK, Broussard DL, Melstrom P, Hutchinson R, Wolkin A, Martin C et al. Acute selenium toxicity associated with a dietary supplement. Archives of Internal Medicine. 2010; 170 (3): 256–266.
9. Kotrba P, Najmanova J, Macek T, Ruml T, Mackova M. Genetically modified plants in phytoremediation of heavy metal and metalloid soil and sediment pollution. Biotechnology Advances. 2009; 27 (6): 799-810.
10. Paul D, Pandey G, Pandey J, Jain RK. Accessing microbial diversity for bioremediation and environmental restoration. Trends Biotechnology. 2005; 23 (3): 135-142.

11. Marinescu G, Stoicescu AG, Teodorof L. Industrial nutrient medium use for yeast selenium preparation. Food Technology. 2011; 35(1): 45–53.
12. Houng JY, Liao JH, Wu JY, Shen SC, Hsu HF. Enhancement of asymmetric bioreduction of ethyl 4-chloro acetoacetate by the design of composition of culture medium and reaction conditions. Process Biochemistry. 2006; 42 (1): 1- 7.
13. Ashengroph M, Arjmand R Isolation and characterization of a selenite resistant marine yeast strain and its application in selenite bioremediation. Journal of Cellular and Molecular Researches. 2016; 29 (1): 1-14. [In Persian]
14. Ashengroph M, Nahvi I, Zarkesh-Esfahani H, Momenbeik F. Candida galli strain PGO6: a novel isolated yeast strain capable of transformation of isoeugenol into vanillin and vanillic acid. Current Microbiology. 2011; 62 (3): 990-998.
15. Hurlbut JA, Burkepile RG, Geisler CA, Kijak PJ, Rummel NG. Colorimetric determination of selenium in mineral premixes. Journal of AOAC International. 1996; 80(4): 709–716.
16. Venkata Dasu V, Panda T, Chidambaram, M. Determination of significant parameters for improved griseofulvin production in a batch bioreactor by Taguchi's method. Process Biochemistry. 2003; 38 (6): 877- 880.
17. Farooq U, Kozinski JA, Khan MA, Athar, M. Biosorption of heavy metal ion s using wheat based biosorbents A review. Bioresource Technology. 2001; 101 (14): 5043 –5053.
18. Tabak HH, Lens PM, Hullebusch Van, Dejonghe W. Developments in bioremediation of soils and sediments polluted with metals and radionuclides–1. Microbial processes and mechanisms affecting bioremediation of metal contamination and influencing metal toxicity and transport. Reviews in Environmental Science and Bio-Technology. 2005; 4(3): 115-156.
19. Zhang P, Luo XY, Wu Y, Chen YM, Xu WJ, Yi XX. Optimization of submerged fermentation of Thelephora ganbajun zang. Journal of Basic Microbiology. 2014; 54(8): 866-872.
20. Yin H, Gongjian F, Zhenxin Gu. Optimization of culture parameters of selenium-enriched yeast (Saccharomyces Cerevisiae) by Response Surface Methodology (RSM). LWT - Food Science and Technology. 2010; 43 (4): 666–669.
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. Fan Z, Li X, Xiao YZ, JianHang Z. Optimization of selenium-enriched Candida utilis by response surface methodology. Journal of Agricultural Resource and Environment. 2014; 31(6): 575-582.

Original Article

Designing Matrix L18 Trials via Taguchi Model to Improve Performance of Trichosporon sp. Cas se5 in the Selenite Removal

Ashengroph M*, Arjmand R

Department of Biological Sciences, Faculty of Sciences, Kurdistan University, Sanandaj, Iran

Received: 20 Feb 2019 Accepted: 23 Jul 2019

Abstract

Background & Objectives: Low selenium level is considered as an essential nutrient for humans and animals. However, selenium, in the form of selenite, is very toxic at high concentrations and leads to acute selenium poisoning (selenosis). The current project was done using the Taguchi method as an efficient, effective method, and without the need for a large number of experiments to optimize selenite removal.

Materials & Methods: The independent variables at three levels include: initial concentrations of selenite, biomass and NaCl, initial pH, and agitation. L18 orthogonal array was designed for these variables. The experiments were repeated three times and their mean amounts were analyzed using Qualitek-4.

Results: The factors which had a significant impact on the selenite removal in order of importance were as follows: selenite ion (8 g/L), agitation (80 rpm), NaCl (2.5% w/v), biomass (40 g/L), and pH 6.8. Under optimal conditions in the selected levels of these factors, approximately 92.1% of selenite was removed after 48 h of incubation, at the 5% significance level ($p< 0/05$).

Conclusion: The current study is the first report of the successful application of the Taguchi method in the optimization of selenite removal under resting cells of Trichosporon sp. as biocatalysts. Therefore, the optimization techniques used in the present study can be proposed for the bio-remediation of contaminated environments.

Keywords: Optimization, Taguchi, Selenite removal, Trichosporon sp

***Corresponding Author: Ashengroph Morahem,** Department of Biological Sciences, Faculty of Sciences, Kurdistan University, Sanandaj, Iran
Email: m. ashengroph@uok.ac.ir
https://orcid.org/0000-0001-6821-0192