

## جداسازی و شناسایی باکتری هایی با قابلیت پاکسازی زیستی املاح سلنیتی از منابع محیطی

مهسا اهرابی<sup>۱</sup>، فرزانه حسینی\*<sup>۱</sup>، عباس اخوان سپهری<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup> دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، گروه میکروبیولوژی، تهران، ایران

### چکیده

**مقدمه:** سلنیوم دارای چرخه کامل زیستی است و در تراکم ناچیز نانوگرم در میلی لیتر بر زندگی موجودات زنده اثر گذار است. اغلب موجودات زنده به ویژه میکروارگانیسم ها به شکلی در دگرگونی های بیوژئوشیمیایی این عنصر دخالت دارند. **مواد و روش ها:** در این تحقیق سویه هایی از باسیل های گرم مثبت و گرم منفی با قابلیت تجزیه بیولوژیکی و احیای سلنیت از کارخانه شیشه و بلور و لجن فعال پساب قیطره جدا گردید. با استفاده از روش های رنگ سنجی و تکنیک طیف سنجی جذب اتمی میزان مقاومت نسبت به سلنیت سدیم و احیای آن مشخص گردید. از طریق توالی یابی *۱۶SrRNA* سویه های مقاوم جدا شده تعیین هویت گردیدند. **نتایج:** نتایج حاصل از تعیین MIC نشان داد که سویه *Bacillus licheniformis* جدا شده از کارخانه شیشه و بلور مقاومت بالاتری نسبت به *Pseudomonas aeruginosa* جدا شده از پساب قیطره دارد و همچنین توانایی احیای کامل سلنیت به سلنیوم عنصری را دارد. خصوصیات ویژه ی این باکتری های مقاوم در پاکسازی بیولوژیکی سلنیت نوید دهنده کاربرد آن در بهسازی آلودگی های محیطی به به این اکسی آنیون می باشد. میزان احیای سلنیت سدیم با استفاده از روش های رنگ سنجی و تکنیک طیف سنجی جذب اتمی مشخص گردید. **بحث:** خصوصیات ویژه ی این باکتری های مقاوم در پاکسازی بیولوژیکی سلنیت نوید دهنده کاربرد آن در بهسازی آلودگی های محیطی به این اکسی آنیون می باشد.

**کلمات کلیدی:** سلنیوم، *Bacillus licheniformis*، *Pseudomonas aeruginosa*، تجزیه بیولوژیکی

### مقدمه

سمی سلنیت از عناصر سمی است که به طرق مختلف وارد محیط زیست شده و انباشت آن در محیط می تواند خطرناک باشد (۸). سلنیوم در ترکیب لاستیک، رنگ سلاح، کاتالیت های شیمیایی، شامپو های ضد شوره و ترکیب کود های کشاورزی در خاک های نواحی فقیر از سلنیوم به مصرف می رسد. در افرادی که روزانه مقدار نزدیک به ۵ میلی گرم سلنیوم مصرف می کنند مسمومیت سلنیومی مزمن بروز می کند. مصرف بالای سلنیوم در زنجیره ی غذایی موجب اختلالات گوارشی و زردی پوست ناشی از بد کاری کبد می گردد (۲۳). اکسایش میکربی سلنیوم عنصری به سلنیت توسط یک گروه از باکتری های اتوتروف ناشناخته نخستین بار توسط لیپمن و واگسمن گزارش شده است (۱۸). تورما در سال ۱۹۷۲ اکسایش سلنید مس II به سلنیوم عنصری را توسط *Thiobacillus ferrooxidans* شرح داد که انرژی حاصل از آن معادل تنها ۲۵ درصد از انرژی بود که

به هنگام استخراج فلزهای مختلف پساب های آلوده موجبات آلودگی زیست محیطی را فراهم می سازند. انباشت این عناصر و نفوذ آنها به منابع آب های زیر زمینی می تواند بسیار خطرناک باشد و لزوم حذف این سموم از محیط زیست ثابت شده است (۱۰). نقش موثر میکروارگانیسم ها با سازو کارهای مختلف و متنوع در پاک سازی زیستی (Bioremediation) این ترکیبات نشان داده شده است (۳۲). توانایی جذب فلزات سنگین و سمی توسط میکروارگانیسم ها منجر به توجه خاص پژوهشگران به مطالعه انواع قارچ ها، مخمر ها، جلبک ها و باکتری های مختلف در جهت حذف آنها شده است (۲۰). اکسی آنیون

آدرس نویسنده مسئول: دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، گروه میکروبیولوژی

Email: hosseinimicrobiology@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۹۱/۱/۱

تاریخ پذیرش: ۹۲/۶/۱۳

می رسد. در این بررسی از منابع مختلف محیطی باکتری هایی با قابلیت احیا ترکیبات سلینیوم جداسازی شدند و بعد از تعیین قابلیت تجزیه بیولوژیکی، این باکتری ها از طریق روش های مولکولی تعیین هویت شدند.

## مواد و روش ها

**جدا سازی و کشت:** نمونه برداری از لجن فعال پساب (آب و فاضلاب منطقه قیطره) و کارخانه شیشه و بلور واقع در قزوین با استفاده از ظروف مخصوص نمونه برداری ۲۵۰ میلی لیتری استریل صورت گرفت و دقت شد که حدود چند سانتی متر از بالای بطری خالی بماند تا هم زدن به آسانی انجام گیرد و نمونه یکنواخت شود. در هر نمونه تاریخ برداشت، دمای محل ، pH محل نمونه برداری و نوع نمونه روی برچسب ثبت گردید و در اسرع وقت به آزمایشگاه منتقل شد. برای جدا سازی میکروارگانیسم ها از روش پورپلیت با ۱۰۱ لوله حاوی ۱۰ ml آب مقطر استریل ستفاده گردید (۲۴). سپس از هر رقت نمونه در محیط BHI آگار تلقیح شدند و در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد به مدت ۷۲ ساعت گرماگذاری شدند. برای شناسایی اولیه سویه های جدا شده طبق روش های باکتریولوژیک سیستماتیک Bergeys آزمون های حرکت، کاتالاز، اوره آز ، اکسیداز، احیای نیترات ، متیل رد و وژر پرسکوئر انجام گرفت (۵).

### بررسی مقاومت به اکسی آنیون سلنیت :

برای سنجش پایین ترین تراکم از اکسی آنیون سلنیت MIC (**Minimum Inhibitory Concentration Test**) که مانع رشد سویه های جدا شده می گردد غلظت های ۰/۱ تا ۶۰۰ میلی مولار سلنیت سدیم با روش تهیه رقت در آگار (Agar Dilution method) در محیط نوترینت آگار ۷ pH تهیه گردید .

### رسم منحنی رشد باکتری

بدین منظور ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری مورد نظر معادل با کدورت نیم مک فارلند (  $1 \times 10^8$  CFU/ml ) به محیط کشت نوترینت برات حاوی ۲۰ میلی لیتر سلنیت سدیم و فاقد آن افزوده و جذب نوری (۶۰۰nm ) در زمان های مختلف

طی اکسایش ترکیب گوگردی مشابه حاصل می شد (۳۱). به طور کلی متیل دار شدن سلینیوم مشتمل بر مرحله احیای اکسی آنیون و افزوده شدن متیل در مرحله بعد است، ولی ترتیب دقیق انجام این واکنش ها مورد تردید است. میکروارگانیسم ها تقریباً به همان طریق که گوگرد را به ترکیبات مختلف تبدیل می نمایند، قادر به تبدیل و تغییر سلینیوم می باشند. پردازش میکروبی سلینیوم از طریق واکنش های احیا اکسایش، متیل دار کردن و متیل زدایی انجام می گیرد. واکنش احیای اکسی آنیون سلینیوم بر حسب وجود اکسیژن و محصول نهایی واکنش انجام گرفته توسط میکروارگانیسم به دو دسته احیای جذبی و غیر جذبی تقسیم می گردد (۲۶). در مطالعات انجام یافته از خاک های رسی غنی از سلینیوم سویه ای از جنس سودوموناس ها با توانایی مصرف *TMSe* (تری متیل سلنید)، دو سویه با توانایی متیل زدایی از *DMSe* (دمتیل سلیون سلنید)، و سویه هایی از جنس های کورینه باکتریوم و زانتوموناس با توانایی رشد در محیط واجد *DMDSe* به عنوان تنها منبع کربن جدا شده است (۲۵). در بررسی دیگری مشخص شده که یک متیلوتروف اجباری *Methylococoides methylutens* تحت شرایط بی هوازی در رسوبات فاقد اکسیژن قادر به متیل زدایی از *DMSe* می باشد (۲۴). مشخص شده است که تشکیل *DMSe* در قارچ ها حاصل متیل دار شدن و احیای پیاپی آن ها است. دی متیل سلنید و آنالوگ گوگردی آن (دی متیل سولفید) در محیط های آبی و خاکی تحت واکنش های زیستی متیل زدایی قرار می گیرند (۳). احیای سلنیت به سلینیوم عنصری تحت شرایط هوازی توسط سویه های *Salmonella heidelberg* ، *E. faecalis* ، *E. faecium* ، *Colstridium pasteuciaum* و *Thouera slenatis* را در شرایط بی هوازی مورد بررسی قرار دادند (۲۷ و ۱۳). گستردگی واکنش های متیل زدایی در محیط های غنی از سلینیوم هنوز نامعلوم است و باید فوق العاده مورد توجه قرار گیرد؛ زیرا در صورتی که در یک ناحیه، فرار سازی سلینیوم به عنوان فن آوری اصلی سلینیوم زدایی بکار گرفته شود متیل زدایی اثرات احیاکنندگی زیان آوری بر جای خواهد گذاشت و مهار آن ضروری خواهد بود (۹). بنابراین نیاز به گسترش واکنش های احیا کنندگی در محیط های آلوده توسط میکروارگانیسم های مقاوم به ترکیبات آلوده کننده مانند سلنیت ها ضروری بنظر

## نتایج:

از بین تعداد ۲۰ سویه باکتریایی مقاوم جدا شده از لجن فعال و کارخانه شیشه و بلور تنها دو سویه با ایجاد رنگ قرمز در محیط کشت اکسی آنیون سلنیت سدیم مقاومت قابل توجهی را نشان دادند و رشد نمودند. نتایج حاصل از بررسی های فنوتیپی، بیوشیمیایی و توالی یابی ۱۶srRNA نشان داد که سویه های جدا شده از محوطه ای در کارخانه شیشه و بلور و لجن فعال بترتیب ۹۹٪ همخوانی با *Bacillus licheniformis* و *Pseudomonas aeruginosa* داشته است. نتایج حاصل از ارزیابی MIC سویه های جدا شده در رقت های مختلف سلنیت در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می شود بالاترین میزان مقاومت مربوط به باسیل گرم مثبت *Bacillus licheniformis* بوده است.

جدول ۱. نتایج حاصل از MIC رقت های مختلف سلنیت (میلی مولار) در باکتری های جدا شده از منابع طبیعی

<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bacteria
		selenite
+	+	10
+	+	25
+	-	200
+	-	300
+	-	400
+	-	450

در جدول ۱ نشان داده شده است که باکتری سودوموناس آیروزینوزا توانایی رشد در غلظت های بالای ۲۵ میلی مولار سلنیت را ندارد ولی باکتری باسیلوس لیکنی فورمیس می تواند غلظت ۴۵۰ میلی مولار سلنیت سدیم را تحمل نماید و غلظت های بالاتر از ۴۵۰ میلی مولار سلنیت مانع رشد این باکتری می گردد. بررسی تغییرات شکلی و منحنی رشد باکتری *B. licheniformis* در مجاورت با سلنیت نشان داد که سلول ها در ساعات اولیه یعنی قبل از شروع فاز سکون در مجاورت با سلنیت تولید گرانول هایی بر سطح خود می نمایند و در انتهای فاز سکون محتوای درون سلولی از یک انتها بیرون می آید و یک ساختمان شبیه به پروتوپلاست را تشکیل می دهند (شکل ۱).

قرائت گردیده و منحنی رشد باکتری ترسیم شد. همچنین اشکال باکتری در زمانهای مختلف در حضور سلنیت در زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت. تعیین هویت سویه های باکتریایی مقاوم جدا شده از طریق توالی یابی ۱۶srRNA انجام پذیرفت (۱۷). بعد از تخلیص ژنوم و انجام PCR با پرایمر های یونیورسال محصول جهت توالی یابی به جهاد دانشگاهی شهید بهشتی ارسال گردید.

PA: 5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG  
PH: 5'AAGGAGGTGATCCAGCCGCA

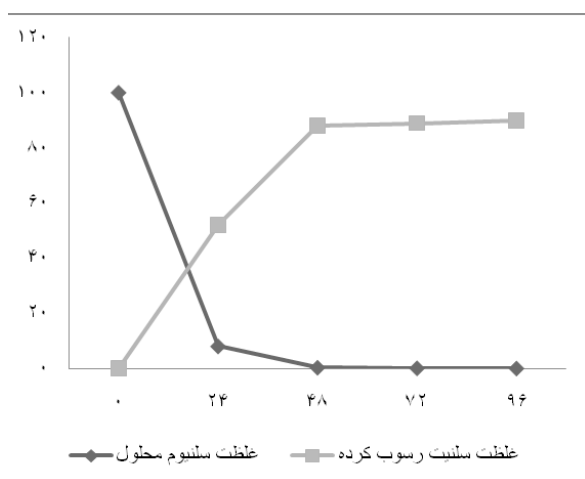
برای ارزیابی میزان احیا سلنیت سدیم به سلنیوم با روش ۳ و ۳ دی آمینو بنزیدین (DAB) (۱۸) ۲۰ میلی لیتر از محیط کشت نوترینت برات حاوی ۱ میلی لیتر سوسپانسیون سویه باکتری جدا شده ( معادل نیم مک فارلند) و ۴۸ میکروگرم سلنیت سدیم، در زمان های ۲۴ و ۴۸ ساعت به طور استریل، برداشته و توده سلولی آن از طریق سانتریفوژ نمودن ( دور rpm ۱۵۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه ) جدا گردید. سپس به مایع رویی جدا شده ۷ ml اسید کلریدریک غلیظ M۶ و محلول ۳ و ۳ دی آمینو بنزیدین ۰/۵٪ اضافه گردید. محلول حاصل را به کیف جدا کننده حاوی تولوئن منتقل نموده و میزان جذب آن در طول موج ۴۲۰ nm قرائت گردید. سنجش احیای سلنیت سدیم با استفاده از تکنیک جذب اتمی Atomic Absorption Spectroscopy ( AAS ) : بعد از تنظیم pH در حدود ۷ محیط کشت نوترینت برات حاوی ۱ میلی مولار سلنیت سدیم، توده سلولی را از طریق سانتریفوژ کردن ( دور rpm ۱۴۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه) جدا نموده و محلول رویی حاوی سلنیوم به روش Hydride Generation Atomic Absorption Sector (Photometry) طیف سنجی جذب اتمی در مرکز پژوهش های کاربردی سازمان زمین شناسی اندازه گیری گردید. به رسوبات حاصل از سانتریفوژ ۵ml HNO<sub>3</sub> غلیظ اضافه شد و نمونه به مدت ۵ دقیقه جوشانده شد. مقدار کل سلنیوم موجود در محلول حاصل از هضم اسیدی توسط دستگاه HG ASS مورد سنجش قرار گرفت.

جدول ۲. جذب نوری قرائت شده محیط کشت حاوی ۴۸ میکروگرم

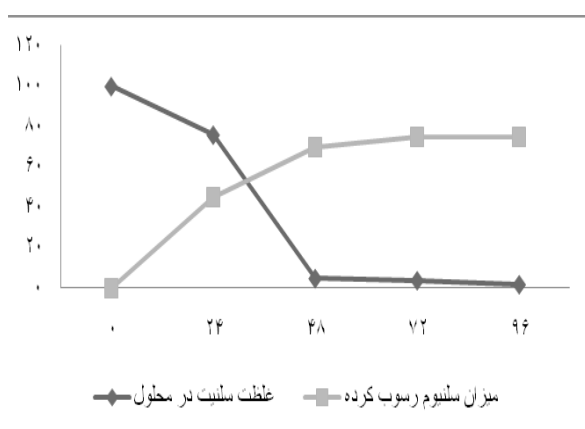
سلنیت (۴۲۰ نانومتر)

جذب نوری محلول پس از ۴۸ ساعت	جذب نوری محلول پس از ۲۴ ساعت	سویه باکتریایی
0/01	0/1	<i>Bacillus licheniformis</i>
0/08	0/15	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

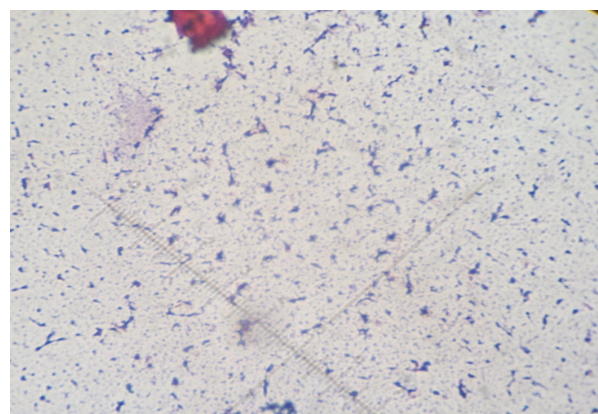
بررسی های دقیق تر با استفاده از تکنیک جذب اتمی نشان داد که باکتری باسیلوس لیکنی فورمیس در مدت زمان ۲۴ ساعت بیش از ۵۰٪ سلنیت را در محیط احیا کرده است اما باکتری سودوموناس در طی ۴۸ ساعت توانست به این نتیجه برسد. (اشکال ۳ و ۴).



شکل ۳. نمودار احیای ۱ میلی مولار سلنیت توسط باکتری باسیلوس لیکنی فورمیس

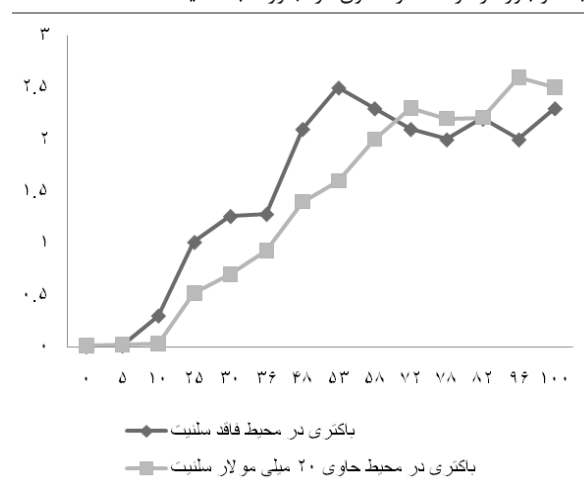


شکل ۴. نمودار احیای ۱ میلی مولار سلنیت توسط باکتری سودوموناس آیروزینوزا



شکل ۱: تغییرات شکلی ایجاد شده در باسیلوس های جدا شده از کارخانه

شیشه و بلور در مرحله فاز سکون درمجاورت با سلنیت



شکل ۲. مقایسه منحنی رشد باکتری *Bacillus licheniformis* در محیط کشت حاوی و فاقد سلنیت

همانطور که در شکل شماره ۲ نشان داده شده است در حضور سلنیت مدت زمان فاز تاخیری (Lag) افزایش یافته و در غلظت های بالای سلنیت این زمان به چند روز می رسد اما بعد از شروع فاز لگاریتمی سرعت رشد باکتری ها در حضور و فقدان سلنیت تا حدودی یکسان است. بطور کلی همزمان با آغاز رشد لگاریتمی باکتری ها فرآیند احیای سلنیت نیز افزایش می یابد. مقایسه نمودار منحنی استاندارد با میزان جذب نوری محیط کشت باکتریایی *Bacillus licheniformis* حاوی ۴۸ میکروگرم سلنیت نشان داد که بعد از ۴۸ ساعت تنها ۷ میکروگرم سلنیت باقی مانده است. سویه های *Pseudomonas aeruginosa* در همین مدت ۳۲ میکروگرم سلنیت سدیم را از محیط حاوی اکسی آنیون سلنیت حذف نمودند (جدول ۲).

## بحث:

دیگر سویه ی ویبریو متحرک بی هوازی اجباری را موسوم به سویه SE S<sub>3</sub> جدا کردند که می توانست با استفاده از لاکتان به عنوان دهنده الکترون، از سلنات به عنوان پذیرنده نهایی الکترون استفاده نماید (۲۶). گاریسیو و همکارانش در سال ۱۹۹۵ نشان دادند که از فراوانترین باکتری های خاک سویه های *Pseudomonas fluorescens* و *Bacillus subtilis* می توانند از طریق یک ساز و کار مستقل از سم زدایی نیتريت و سولفیت، اکسی آنیون سلنیت را به سلنیوم عنصری احیا کنند (۱۲). در این بررسی میزان حذف اکسی انیون سمی سلنیت در محیط کشت باکتریایی *Bacillus licheniformis* با استفاده از روش (DAB) ۳ و ۳ دی آمینو بنزیدین مورد ارزیابی قرار گرفت که در مقایسه با سایر روش ها مقرون بصره بوده است (۴) و مشخص نمود که سویه های جدا شده بیش از ۵۰٪ سلنیت موجود در محیط را طی ۴۸ ساعت از محیط حذف نمودند. نتایج حاصل از این روش در مقایسه با روش اسپکتروسکوپی جذب اتمی (AAS) برای ارزیابی دقیق تر میزان پاکسازی زیستی سویه های نشان داد اختلاف کمی را نشان داد. سمیت بالای سلنیت مسئول کاهش میزان احیای سلنیت در غلظت های بالای آن است. در حالیکه سویه های سودوموناس جدا شده در مدت مشابه توانستند تنها ۳۰٪ سلنیت مشابه موجود در محیط کشت را احیا نمایند. Jiang و همکارانش برای بررسی میزان حذف سلنیت در محیط کشت سویه های *Pseudomonas fluorescens* K۲۷ از روش DAB استفاده نمود. میزان احیای سلنیت توسط این سویه ها را در غلظت ۱۰ میلی مولار بعد از ۲۴۰ ساعت ۵/۹٪ گزارش نمود (۱۴). صعودی و همکارانش از روش Hydride generation atomic absorption spectroscopy ارزیابی میزان احیای سلنیت سدیم به سلنیوم عنصری توسط سویه های *Bacillus* sp. STG-۸۳ استفاده نمود. این سویه ها توانایی تحمل ۶۴۰ میلی مولار سلنیت سدیم را داشتند و ۸۰ میلی گرم بر لیتر سلنیت را طی ۹۶ ساعت به سلنیوم عنصری تبدیل نمایند (۳۱). در مطالعه دیگری ارزیابی میزان احیا سلنیت و سلنات به سلنیوم عنصری توسط باکتری *Pseudomonas stutzeri* سویه NT-۱ جدا شده از پساب صنعتی از روش جذب اتمی استفاده شد و مشخص گردید که این باکتری توانایی احیای ۹ میلی مولار سلنیت را دارد و طی ۲۰ ساعت ۹۵٪

در این بررسی برای جداسازی سویه های باکتریایی مقاوم به سلنیت از منابع محیطی استفاده گردید و از طریق توالی یابی srRNA ۱۶ تعیین هویت شدند. سویه های *Bacillus licheniformis* و *Pseudomonas aeruginosa* جدا شده مقاومت بالایی را نسبت به سلنیت سدیم در بین مجموع باکتری های گرم منفی و مثبت جدا شده از خود نشان دادند. در مطالعات قبلی از سویه های مقاوم جدا شده از خاک مناطق شور، مجتمع مس سرچشمه و باکتر های هالوفیل استفاده شده بود (۲۱ و ۲۲). سویه های باسیلوس جدا شده در این بررسی MIC ۴۵۰ میلی مولاری نسبت به اکسی آنیون سلنیت نشان دادند که ۴ برابر میزان MIC گزارش شده توسط کینکل و همکارانش در مورد *Rhizobium fredii* و *Rhizobium meliloti* بوده (۱۵) و MIC ۲۵ میلی مولاری سودوموناس آروژینوزا جدا شده از لجن فعال ۵ برابر میزان MIC گزارش شده توسط و همکارانش در مورد *Pseudomonas stutzeri* می باشد (۱). در تحقیقاتی که بر روی باکتری های گرم مثبت و گرم منفی جدا شده از مناطق آلوده به سلنیت انجام گرفته MIC سویه های *Bacillus pasteurii* ۴۰۰ میلی مولار، *Pseudomonas saccharophila* ۱۰۰ میلی مولار و *Staphylococcus epidemidis* ۲۰۰ میلی مولار نسبت به اکسی آنیون سلنیت تعیین گردیده است (۲۸). مشاهدات نشان داده است که سویه های باسیلوس مقاوم به سلنیت توانایی احیای نیترات را نیز دارند و ممکن است دارای آنزیم های ردوکتازی اختصاصی جهت احیای سلنیت باشند. در این سویه ها به دلیل شباهت ساختاری سلنواکسی آنیون ها با نیترات، نیترات ردوکتاز موجود در آنها قادر به احیای این اکسی آنیون است (۲۹). *Enterobacter cloacae* سلنات را تنها در حضور نیترات به سلنیوم عنصری تبدیل می کند زیرا در این باکتری القای آنزیم سلنات ردوکتاز نیازمند نیترات است (۱۹). اورملند و همکارانش در سال ۱۹۸۹ نظریه ای ارائه داده اند مبنی بر اینکه باکتری های متیلوتروف نقش متیل زدایی از مشتقات متیل دار سلنیوم را بر عهده دارند و در این حال؛ برخی باکتری های متانوژن ممکن است در متیل دار کردن احیایی عناصر نقش داشته باشند (۷). سپس در مشاهده ای

از ۰/۹ میلی مولار سلنیت موجود در محیط کشت خود را به سلنیوم عنصری تبدیل نماید (۱۶). تحقیق انجام شده بر روی سویه های ۸۳- *Bacillus sp. STG* نشان داد که این باکتری طی ۳۲ ساعت توانایی احیای کامل سلنیت سدیم در غلظت ۱ میلی مولار را داشته است. در این تحقیق از مقدار سلنیوم عنصری موجود در رسوبات حاصل از احیای سلنیت سدیم به روش آنالیز پرتو X توسط دستگاه Proton Induced X-ray Emission مورد سنجش قرار گرفت با بدام اندازی گاز اتمسفری کشت ها و بررسی آن در دستگاه Hydride Generation Atomic Absorption Spectrophotometry نشان داده شد که این سویه قادر به تولید ترکیبات فرار سلنیوم است (۳۱). تغییرات مرفولوژیکی سلولی (Roud bodies) مشاهده شده سویه های باکتریایی جدا شده در این بررسی در حین رشد مشابه نتایج به دست آمده توسط گاریسو و همکارانش بوده است (۱۱). این تغییرات ساختمانی القا شده توسط سلنیت به دلیل افزایش در مقدار تیوردوکسین و آنزیم سم زدای موجود در سیستم دی تیول می باشد و احیای سلنیت ارتباط نزدیکی با کینتیک رشد دارد و احیا زمانی اتفاق می افتد که سلول بین فاز رشد و رکود باشد. با توجه به مقاومت بالا همراه با احیای اکسی آنیون سلنیت می توان اذعان نمود که سویه *Bacillus licheniformis* جدا شده در این پژوهش انتخاب مناسبی جهت پاک سازی زیستی پساب های صنعتی از اکسی آنیون سلنیت می باشد.

1. Anna M, Zawadzka, Ronald L. Crawford, Andrzej J. Paszczynski. Pyridine-2,6-Bis(Thiocarboxylic Acid) Produced by *Pseudomonas stutzeri* KC Reduces and Precipitates Selenium and Tellurium Oxyanions. *Environ Microbiol*, May 2006; 72(5): 3119-312
2. Bautista E M, Alexander M. (1972) Reduction of inorganic compound by soil microorganisms. *soil Sci Soc Am j*. 1972; 36:918-920.
3. Challenger F. Biological methylation. *Chem Rev*, 1945; 36:315-361.
4. Cheng K L. Determination of traces of selenium 3\_3 diamino\_benzidine as selenium organic reagent. *Anal hem*. 1956; 28:1738-1742.
5. DAVID H, BERGEY E G D, MURRAY, ROBERT S, BREED A, PARKER HITCHENS. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. The Williams & Wilkins Company, Baltimore, Md, 1939; (5<sup>th</sup> Edition).
6. Doran J W, Alexander M. Microbial transformation of selenium. *Environ Microbiol*, 1977; 33:70-73.
7. Dowdle PR, Oremland R S. Microbial oxidation of elemental selenium in soil slurries and bacterial cultures. *Environ Sci Technol*, 1998; 32:3749-3755.
8. Frankenberger W T, Benson S. *Selenium in the Environment*. Marcel Dekker, 1994; ISBN:0 824 8993 8.
9. Frankenberger W T, Dungan R S. Microbial Transformation of selenium and the Bioremediation of seleniferous Environments. *Bioremed j*, 1999; 3, 171-188.
10. Gadd GM. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiol*, 2010; 156 (3), 609 - 643.
11. Garbisu C, Carlson D, Adamkiewicz M, Yee B C, Wong J H, Resto E, Buchana B B. Morphological and biochemical responses of *Bacillus subtilis* to selenite stress. *Biofactors*, 1999; 10:311-319.
12. Garbisu C, Ishii T, Leighton T, Buchanan BB. Bacterial reduction of selenite to elemental selenium. *Chem Geol* 1996; 132:199-204.
13. Hughes MN, poole RK. *Metal and microorganisms*. Chapman and Hall, 1998; ISBN:0 412 24400 4.
14. Jiang W. Delineating the Distribution of Selenium in Bacterial Cultures That Reduce and Methylate Oxyanions of This Toxic Metalloid. Master of Science (Chemistry), December, 1993, Sam Houston State University, Huntsville, Texas.
15. Kinkle B K, Sadowsky M J, Johnson K, Koshinen W C. Tellurium and selenium Resistance in *Rhizobium* and its Potential use for Direct isolation of *Rhizobium meliloti* from Soil. *Environ Microbiol*, 1994; 60:1674-1677.
16. Kuroda M, Notaguchi E, Sato A, Yoshioka M, Hasegawa A, Kagami T, Narita T, Yamashita M, Sei K, Soda S, Ike M. Characterization of *Pseudomonas stutzeri* NT-I capable of removing soluble selenium from the aqueous phase under aerobic conditions. *Journal of Bioscience and Bioengineering* vol. 112 issue, 3 September, 2011; 259-264.
17. Lane D J, Pace B, Olsen G J, Stahl D A, Sogin M L, Pace N R. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceeding of the national academy of the sciences of United States of America* 1985; 82:6955-6959.
18. Lipman J G, Waxman S A. The oxidation of selenium by a new group of autotrophic microorganisms. 1923; *Science* 57:60-61.
19. Losi M E, Frankenberger W T. Reduction of selenium Oxyanions by *Enterobacter cloacae* SLD 1A-1: Isolation and growth of bacterium and Its Expulsion of Selenium Particles. *APPL Environ Microbiol*, 1997; 63:3079-3084.
20. McCready R G L, Campbell J N, Payne J I. Selenite reduction by *Salmonella heidelberg*. *Canad J Microbiol*, 1996; 12, 703-714.
21. Marandi R. Bacterial Leaching of Anodic Slime Based on Bioextraction of Selenium - A Case Study 9<sup>th</sup> Congress of IMWA- Oviedo Spain, 2005.
22. Motesharrei Z S. 1386. Effect of different oxyanions on tellurite resistance in halophilic and non-alophilic bacteria. Tehran university.
23. Nelson A A, Fitzhugh O G, Calvery H O. Liver Tumors Following Cirrhosis Caused by Selenium in Rats. *Cancer Res*, 1943; 3, 230-236.
24. Oremland R S, Blum J S, Bindi A B, Dowdele P R, Herbel M, Stolz J F. simultaneous reduction of nitrate and selenate by cell suspension of selenium respiring bacteria. *Environ Microbiol*, 1999; 65:4385-4392.
25. Oremland R S, Hollibaugh J T, Maest A S, Presser T S, Miller L G, Culbertson C W. Selenate reduction to elemental selenium by anaerobic bacteria in sediments and culture: biogeochemical significance of a novel sulfate-independent respiration. *Appl Environ Microbiol*, 1989; 55, 2333-2343.
26. Oremland R S, Switzer J B, Culbertson C W, Visscher P T, Laurence G, Miller L G, Dowdle P, Frances E. Isolation, Growth, and Metabolism of an Obligately Anaerobic, Selenate-Respiring Bacterium, Strain SES-3. *Strohmaier Appl Environ Microbiol*, August 1994; 60(8): 3011-3019.
27. Rech S A, Macy J M. The terminal reductases for selenate and Nitrate Respiration in *Thauera selenatis* Are Two Distinct Enzymes. *J Bacteriol*, 1992; 174:7316-7320.
28. Riadi L, Barford J P. Biological transformations of selenium by microorganisms. *As. Pac. J. Mol. Biol. & Biotech*, Dec 1999; 7(1): 1-12
29. Sabaty M, Avazeri C, Pignol D, Vermeglio A. Characterization of the Reduction of Selenate and Tellurite by Nitrate Reductases. *Appl Environ Microbiol*, 2001; 67:5122-5126.
30. Soudi M R, Tajer Mohammad Ghazvini P, Khajeh KH, Gharavi S. Bioprocessing of seleno-oxyanions and tellurite in a novel *Bacillus* sp. strain STG-83: A solution to removal of toxic oxyanions in presence of nitrate. *Journal of Hazardous Materials* volum 165, Issues 1-3, 15 June 2009; Pages 71-77.
31. Torma A E, Walden C C, Duncan D W, Branion R M R. *Biotechnol Bioeng*, 1972; 14: 777.
32. White C, Sharman AK, Gadd G M. An integrated microbial process for the bioremediation of soil contaminated with toxic metals. *Nat Biotechnol*, 1998; 16, 572-575.