

مطالعه تغییرات بیان ژن *Zrt1* در مخمر ساکارومایسس سرویزیه تحت تاثیر غلظت های مختلف روی در محیط

فروغ سرائی^۱، کیومرث امینی^{۲*}، اعظم حدادی^۱ و محدثه لاری پور^۳

^۱ ایران، کرج، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، دپارتمان میکروبیولوژی

^۲ ایران، ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه، دانشکده علوم، دپارتمان میکروبیولوژی

^۳ ایران، تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، دانشکده علوم زیستی، دپارتمان میکروبیولوژی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۲/۰۹

چکیده

مخمر ساکارومایسس سرویزیه (*Saccharomyces cerevisiae*)، اثر مهمی در جذب فلزات سمی دارد و پروتئین ناقل روی *Zrt1* به جذب روی خارج سلولی توسط مخمر کمک می‌کند. بنابراین، تغییرات بیان ژن *Zrt1* مخمر *S. cerevisiae* به عنوان یک سویه مهم صنعتی، تحت تاثیر غلظت های مختلف روی در مطالعه حاضر مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا از نمونه حاصل از پسماند کارخانه تولید الکل، مخمر *S. cerevisiae* با استفاده از روش PCR و تعیین توالی DNA و رسم درخت فیلوژنی شناسایی شد. سپس، میزان رشد این مخمر در حضور روی و در فواصل ۲۴ ساعته با استفاده از روش جذب نوری بررسی شد. از روش qRT-PCR نیز برای تعیین میزان بیان ژن *Zrt1* در مخمر تحت تاثیر غلظت های مختلف روی موجود در محیط کشت، استفاده شد. در نهایت، با STRING و نرم افزار بیوانفورماتیکی Cytoscape شبکه پروتئینی مربوط به ژن *Zrt1* ترسیم و آنالیز شد. در شرایطی که غلظت روی در محیط به مقدار ۲۵ $\mu\text{g/ml}$ مدت گرماگذاری ۲۴ ساعت بود، *S. cerevisiae* حداکثر سرعت رشد و میزان بیان ژن *Zrt1* را به عنوان ناقل روی نشان داد. با آنالیز شبکه پروتئینی نیز *Zrt1* به عنوان مهمترین پروتئین موجود در این شبکه در مسیر سیگنالدهی درون سلولی در جذب روی شناخته شد. ژن *Zrt1* اهمیت زیادی در جذب روی توسط مخمر *S. cerevisiae* به ویژه در شرایط کمبود روی در محیط دارد و نیز می‌توان از پساب های صنعتی برای بدست آوردن میکروارگانسیم هایی با توانایی جذب فلزات در پاکسازی محیط زیست و حتی تولید توده زیستی غنی شده با این فلزات استفاده کرد.

واژگان کلیدی: مخمر ساکارومایسس سرویزیه، فلز روی، جذب زیستی، ژن *Zrt1*

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۸۶۴۲۴۳۳۳۴۲، پست الکترونیکی: kumarssaminia@gmail.com

مقدمه

با سرعت گرفتن رشد صنعت در جهان، کیفیت آب، غذا، خوراک و آب و هوا نیز تحت تاثیر قرار گرفته است، که این امر در نتیجه رها شدن مقادیر بالایی از آلاینده ها، حاصل از صنایع مختلف به محیط زیست می باشد. در این میان، فلزات سنگین به عنوان نوع اصلی این آلاینده ها به دلیل تجمع در آب و غذا و در نتیجه تاثیر بر اندام ها و بافت های انسانی، بطور قابل توجهی ایمنی غذا را تهدید می کنند (۱۳، ۱۸).

از میان فلزات سنگین که به سه دسته فلزات سمی، فلزات گرانبها و رادیونوکلیدها طبقه بندی می شوند، فلز روی (Zinc) از جمله فلزات سمی به شمار می رود که نقش مهمی در آلودگی آب دارد (۲۵). از آنجا که این فلز

سطح مولکولی می‌باشد و همچنین توانایی تولید بیومس فراوان دارد، از دیدگاه تولید مواد زیستی مورد توجه قرار گرفته است (۲۶).

مخمرها می‌توانند محصولات فرعی آلی صنعتی ارزان قیمت و در دسترس را به پروتئین و لیپیدهای با کیفیت بالا تبدیل کنند، که در خوراک دام و مصرف انسانی کارآمد هستند (۲۴). بعلاوه، به دلیل توانایی مخمر در اتصال به یون‌های فلزی موجود در محیط کشت، می‌توان از آنها به عنوان منبع تولید پروتئین غنی شده با مواد معدنی استفاده کرد، تا به راحتی توسط انسان قابل مصرف باشند (۱). در مطالعه حاضر با استفاده از مخمر *S. cerevisiae* به عنوان یک سویه مهم صنعتی، به دست آمده از فاضلاب کارخانه تولید الکل، به بررسی بیان ژن *Zrt1* که نقش اصلی را در جذب روی توسط این مخمر دارد، می‌پردازیم. در این مطالعه تغییرات بیان این ژن در مخمر مورد نظر تحت تاثیر غلظت‌های مختلف روی موجود در محیط کشت بررسی می‌شود.

مواد و روشها

جمع آوری نمونه و کشت مخمرهای جداسازی شده: نمونه‌های به دست آمده از فاضلاب صنعتی کارخانه تولید الکل سیمین تاک (قزوین، ایران) در ظروف شیشه‌ای استریل جمع‌آوری و درب ظروف محکم بسته شد و برای بررسی‌های بیشتر به آزمایشگاه منتقل شد. بمنظور جداسازی میکروارگانیسم‌ها ابتدا نمونه‌های پساب با عبور از کاغذ فیلتر با اندازه منافذ ۰/۴۵ میکرومتر فیلتر شدند. سپس کاغذهای فیلتر که اکنون حاوی میکروارگانیسم‌های پساب بودند، به محیط کشت مایع (Sabouraud SDB) Dextrose Broth که محیط مایع مخصوص رشد قارچ هاست و حاوی پپتون قارچی و دکستروز می‌باشد، انتقال داده شدند. محیط کشت SDB پس از آماده‌سازی، به کمک اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه استریل گردید. این محیط کشت به منظور رشد

به عنوان عنصری اساسی در بخش‌های صنعتی متعددی مورد استفاده است، مقادیر زیادی از این فلز سنگین در پساب‌های صنعتی تخلیه می‌شود. فلز روی از نظر زیستی نیز دارای اهمیت بسیاری است. این فلز به عنوان یون اصلی در ساختار موتیف‌های پروتئینی، عامل کاتالیزی در بسیاری از آنزیم‌ها و عامل ساختاری و عملکردی در اسیدنوکلئیک‌ها و پروتئین‌ها ایفای نقش می‌کند. فلز روی همچنین در بیان بسیاری از ژن‌ها و نیز توسعه سیستم ایمنی بدن دخالت دارد. بنابراین، کمبود روی به اختلال در عملکرد ایمنی ذاتی و عملکرد سلول‌های کشنده طبیعی منجر می‌شود (۹، ۲۸، ۳).

میکروارگانیسم‌ها نیز همانند انسان، برای واکنش‌های حیاتی خود به سطح مناسب روی وابسته‌اند. به طوری که تحقیقات نشان می‌دهد حدود ۴۰۰ ژن دخیل در رشد میکروارگانیسم وابسته به روی است. تحقیقات متعددی به طور عمده در مخمر ساکارومایسس سرویزیه (*Saccharomyces cerevisiae*) انجام شده است، که بیانگر نیاز به هموستاز روی در رشد و متابولیسم این مخمر است (۱۷، ۳). به طور کلی دو گروه اصلی ناقصین روی یوکاریوتی در *S. cerevisiae* وجود دارد، شامل: گروه پروتئین‌های ZIP (*Zrt1*، *Zrt2* و *Zrt3*) و گروه تسهیل‌کننده انتشار کاتیونی (*Cot1*، *Zrc1*، *Msc2* و *Zrg1*). در شرایط محدودیت شدید روی، جذب روی خارج سلولی در *S. cerevisiae* با واسطه پروتئین *Zrt1* با تمایل بالا به جذب روی صورت می‌گیرد، که در این شرایط بیان ژن *Zrt1* تا ۳۰ برابر نیز افزایش می‌یابد (۲۹، ۷، ۳۰).

با وجود ظرفیت متوسط، *S. cerevisiae* یک میکروارگانیسم منحصر به فرد در جذب فلزات سنگین است، که در سال‌های اخیر بمنظور حل مشکل آلودگی فلزات سنگین و در نتیجه اصلاح محیط زیست، مورد توجه محققان قرار گرفته است (۲). از آنجا که این مخمر دارای قابلیت کشت آسان در مقیاس بزرگ و دستکاری در

شناسایی مخمر *S. cerevisiae* از میان نمونه‌های کشت داده شده: بمنظور شناسایی و جداسازی مخمر *S. cerevisiae* از بررسی‌های مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و ملکولی استفاده شد.

بررسی مورفولوژیکی مخمر. شناسایی مخمرها براساس استاندارد مرجع شناسایی مخمرها یعنی چاپ پنجم کتاب 'The Yeasts, A Taxonomic Study' انجام شد (۱۰). در بررسی مورفولوژیکی کلنی، ویژگی‌هایی چون رنگ و شکل کلنی، بافت و حاشیه کلنی و همچنین شکل سلول مخمر مشخص گردد. برای بررسی مورفولوژیکی کلنی مخمر، مخمرها بر روی محیط YPD جامد کشت داده شدند و سپس ویژگی‌های ظاهری کلنی‌ها در پلیت بررسی شدند. همچنین برای بررسی شکل سلول مخمر، مخمر توسط رنگ آمیزی ساده کریستال و یوله رنگ آمیزی شد و از لحاظ مورفولوژی سلول بررسی گردید.

بررسی بیوشیمیایی مخمر. از آنجا که مخمرها در توانایی تخمیر قندها با هم متفاوتند، در شناسایی بیوشیمیایی مخمر *S. cerevisiae* قابلیت تخمیر قندها مورد بررسی قرار گرفت. تخمیر قندها به وسیله تولید گاز دی‌اکسید کربن و تجمع آن در داخل لوله دورهام اندازه‌گیری شد. به این ترتیب که ابتدا جهت تهیه سوسپانسیون، یک لوله آزمایش محتوی محیط YPD مایع آماده و یک کلنی از YPD جامد در آن تلقیح گردید. سپس در داخل انکوباتور به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد تا رشد کند و به عنوان محیط تلقیح مورد استفاده قرار گیرد. تهیه لوله‌های آزمایش محتوی محیط کشت YEP حاوی قند‌های مختلف جهت بررسی تخمیر قندها به این صورت انجام شد که ابتدا به تعداد قندهای مورد بررسی، لوله‌های آزمایش فراهم شد و ۲ گرم از قندهای مورد آزمایش، شامل:

D- مالتوز، L- آرابینوز، D- گالاکتوز، سوکروز، D- زایلوز، D- مانیتول، لاکتوز و D- سلیبوز و D- رافینوز

مخمر و عدم رشد باکتری‌ها و جداسازی نمونه‌ها تهیه شد. پس از قرار دادن فیلتر در این محیط کشت، محیط در دمای ۳۵ درجه سلسیوس به مدت ۳ روز گرماگذاری گردید (تصاویر مربوط به نمونه‌های فاضلاب جداسازی شده و کشت داده شده در شکل آمده است). در مرحله بعد، مخمرها که به کمک محیط کشت SDB جداسازی و رشد داده شده بودند، در پلیت‌های حاوی محیط کشت (Yeast Extract Peptone Dextrose Medium) YPD حاوی کلرامفنیکل، گلوکز، پپتون سویا، استروپتومايسن سولفات و عصاره مخمر کشت داده شدند. محیط کشت YPD محیطی مغذی برای رشد مخمرها می‌باشد که به علت وجود کلرامفنیکل مانع از رشد ارگانسیم‌ها به جز قارچ‌ها (از جمله مخمرها) می‌شود. محیط کشت جامد ساخته شد و در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و به مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو استریل گردید. پس از کشت نمونه‌ها در این محیط، محیط کشت در دمای ۳۵ درجه سلسیوس و به مدت ۳ روز انکوبه گردید.



شکل ۱- نمونه‌های فاضلاب جداسازی شده و کشت داده شده. A: نمونه فاضلاب جداسازی شده، به رنگ کدر و قهوه‌ای مشخص است؛ B جداسازی مخمرها از نمونه فاضلاب به روش فیلتراسیون، C: قرار دادن فیلتر در محیط SDB جهت رشد مخمرهای موجود در فاضلاب

گردید (۱۴). ترکیبات ویال واکنش PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر آماده شد که شامل ۲۵ میکرولیتر از ماستر میکس فیوژن x۲، ۱ میکرولیتر از DNA نمونه و ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای ITS1 و ITS4 و ۲۲ میکرولیتر آب DEPC بود.

پس از آماده‌سازی ترکیب، میکروتیوب‌های آماده شده در دستگاه (Eppendorf AG22331) برای انجام واکنش PCR قرار گرفت. مراحل واکنش برای تکثیر ژن 18srRNA در شرایط فعال‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، در ۳۵ سیکل (شامل واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمرها در دمای ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و بسط در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۲ دقیقه) و در نهایت بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه تنظیم شد. برای مشاهده محصول PCR، ابتدا ۰/۲ گرم از پودر آگارز (Merck, Germany) در ۲۰ میلی لیتر از محلول 5x TBE حل شد و پس از حرارت و انحلال کامل، با کاهش دمای ژل، ۱ میلی لیتر از محلول DNA Safe Stain به منظور مشاهده باندها در مقابل اشعه فراء بنفش به ژل افزوده شد. به این ترتیب ژل آگارز ۱٪ تهیه و نمونه‌ها بر روی این ژل به کمک تانک الکتروفورز لود شدند. در نهایت نتیجه با دستگاه Gel-Documentation مورد بررسی قرار گرفت. پس از مشاهده باندها مورد نظر، محصول PCR برای تعیین توالی به شرکت Bioneer در کشور کره ارسال شد. توالی خوانش شده از طریق بانک اطلاعاتی (National Center for Biotechnology Information) با NCBI با سایر ژن‌های موجود مقایسه شد و توالی مشابه یافت شد و برای رسم درخت فیلوژنی مخمرهای شناسایی شده به عنوان *S. cerevisiae* نیز از نرم افزار MEGA7.0 براساس روش Neighbour-joining استفاده شد (۵).

بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف فلز روی بر میزان رشد

(به جز رافینوز که ۴g می باشد، چون برخی سویه‌ها فقط قسمتی از این مولکول را مصرف می کنند) به همراه ۱ گرم از عصاره مخمر و ۲ گرم پیتون در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد و توسط فیلتر استریل گردید. سپس لوله‌های دورهام کوچک به صورت وارونه در داخل محیط قرار گرفت و در دمای ۱۱۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه اتوکلاو شد، تا لوله‌های دورهام به پایین بروند و در ته قرار بگیرند. به لوله‌های محتوی محیط قندی به میزان ۱٪ از محیط کشت YPD مایع که حاوی سویه‌های کشت داده شده بود، تلقیح گردید. لوله‌ها در دمای ۲۵ درجه سلسیوس برای مدت زمان ۲۸ روز انکوبه شدند و در این مدت کدورت محیط و لوله‌های دورهام از نظر تجمع گاز داخل آنها بررسی شدند. سپس نتایج به صورتی که در ادامه آمده است، خوانده شدند (۱۰):

- مثبت قوی: لوله دورهام پر شده از گاز تا ۷ روز
 - مثبت تاخیری: لوله دورهام پر شده از گاز به صورت سریع پس از ۷ روز
 - مثبت کم: لوله دورهام پر شده از گاز به آرامی پس از ۷ روز
 - مثبت ضعیف: کمتر از ۱/۳ لوله دورهام با گاز پر شده
 - منفی: لوله دورهام بدون پر شدن گاز
 - متغیر: برخی سویه‌ها + و برخی دیگر - هستند
- بررسی ملکولی مخمر. برای شناسایی دقیق تر مخمر *S. cerevisiae* از روش شناسایی ملکولی مخمر و رسم درخت فیلوژنی استفاده شد. به این ترتیب که ابتدا DNA مخمرها توسط کیت اختصاصی استخراج DNA قارچ و مخمر با نام تجاری (PGA No. PF230-050) PGA Yeast and Fungi DNA Extraction kit طبق مراحل گفته شد در کیت، استخراج شد. سپس از روش متداول واکنش PCR به کمک پرایمرهای ITS1 و ITS4 (تهیه شده از شرکت سیناکلون) برای تکثیر ژن 18srRNA مخمر استفاده

سلسیوس تا رسیدن به وزن ثابت نگهداری شدند (۱۲). در پایان توده زیستی خشک وزن شد و بعنوان وزن خشک سلول (Cell Dry Weight: CDW) در نظر گرفته شد. بازده توده زیستی سلول‌های مخمر براساس گرم وزن خشک در لیتر محیط کشت گزارش می‌شود (ما نیز نتایج را بر اساس ۲۰۰ میلی لیتر محیط کشت گزارش کردیم). بدین ترتیب تاثیر غلظت‌های مختلف فلز روی بر میزان رشد مخمر مورد ارزیابی قرار گرفت.

بررسی تاثیر روی جذب شده بر بیان ژن Zrt1 در مخمر با استفاده از روش qRT-PCR

استخراج RNA. در این مرحله برای بررسی تاثیر روی جذب شده بر میزان بیان ژن Zrt1 در مخمر ابتدا استخراج RNA از مخمرهای هر گروه با استفاده از کیت استخراج RNA فارچی با نام تجاری EZ-10 Spin Column Fungal RNA Mini-Preps Kit (Bio Basic, BS91915) برطبق مراحل ذکر شده در کیت، انجام شد.

ارزیابی کمی RNA و ساخت cDNA. برای اندازه‌گیری کمی RNA به دست آمده از دستگاه نانودراپ با نام تجاری Denovix استفاده شد. این دستگاه میزان جذب نوری پروتئین، اسید نوکلئیک و فنول را بترتیب در طول موج‌های ۲۸۰، ۲۶۰ و ۲۳۰ نانومتر نشان می‌دهد. از نسبت طول موج‌های ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۶۰/۲۳۰ برای بررسی میزان خلوص هر نمونه استفاده می‌شود. ۱/۵ میکرولیتر از RNA بدست آمده توسط این دستگاه مورد ارزیابی قرار گرفت و با توجه به اینکه نسبت جذب در ۲۶۰ به جذب در ۲۸۰ نانومتر برای نمونه‌ها در محدوده تقریبی ۱/۸ تا ۲/۱ بود، از خلوص RNA استخراج شده اطمینان حاصل شد. سپس برای ساخت cDNA از Tetro cDNA Synthesis Kit (BIO-65042 Bioline) استفاده شد. به این ترتیب که ۳ میکرولیتر از RNA با افزودن ۱۷ میکرولیتر آب DEPC به حجم ۲۰ میکرولیتر رسانده شد و سپس محلول حاصل به میکروتیوب موجود در کیت که حاوی دیگر مواد لازم

مخمر: پس از شناسایی مخمر مورد نظر، تاثیر غلظت‌های مختلف روی بر میزان جذب روی توسط مخمر و همچنین میزان بهره‌وری از آن در جهت تولید توده زیستی از مخمر در حال رشد، مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا محلول $ZnSO_4$ ، با استفاده از محلول استوک استریل سولفات هپتاهیدرات روی (Merck, Germany) تهیه شده با غلظت ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر، آماده‌سازی شد. سپس از استوک آماده شده رقت‌های مختلفی به ارلن‌های حاوی ۲۰۰ میلی لیتر محیط کشت SDB، اضافه شد. بطوریکه غلظت روی در ارلن‌های مختلف شامل ۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر در محیط کشت تنظیم گردید. سپس ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون مخمر حاوی مقدار تقریبی $10^7 \times 1/5$ سلول بر میلی لیتر به این محیط‌های کشت حاوی روی تلقیح شدند. محتوای کلیه ارلن‌ها (کنترل و آزمایش) در شیکر انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سلسیوس و سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه برای مدت ۷۲ ساعت گرماگذاری شدند. pH پایه محیط نیز بر روی ۵/۸ تنظیم شده بود.

در طول کشت مخمر با حضور روی، رشد مخمر در فواصل ۲۴ ساعته (۰، ۲۴، ۴۸ و ۷۲) مورد سنجش قرار گرفت. چگالی نوری (Optical Density: OD) سوسپانسیون هر ارلن (ترکیبی از محیط کشت SDB حاوی روی به همراه مخمر) با استفاده از روش طیف‌سنجی در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. همچنین ۱۰ میلی لیتر از این سوسپانسیون در دمای ۲۰ درجه سلسیوس با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس محلول روئی دور ریخته شد و رسوب باقیمانده سه مرتبه با آب دوبار تقطیر شستشو داده شد تا باقیمانده محیط کشت و روی باند شده به سطح سلول، حذف شود. پس از آن، برای تعیین وزن بیومس خشک، از یک روش خشک کردن دو مرحله‌ای استفاده گردید. بدین ترتیب که ابتدا نمونه‌ها به مدت ۲ ساعت تحت دمای ۶۰ درجه سلسیوس قرار گرفتند و سپس در دمای ۱۰۵ درجه

به منظور بررسی عملکرد اختصاصی پرایمرها برای تولید محصول مورد نظر و همچنین عدم شکل‌گیری پرایمر-دایمر در نظر گرفته شد. تمام واکنش‌ها بصورت سه بار تکرار انجام شد و نتایج براساس مقادیر سیکل آستانه (Ct) تجزیه و تحلیل شد. محتویات ویال مورد استفاده در واکنش qRT-PCR شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس سایبرگرین، ۲ میکرولیتر نمونه cDNA، ۸/۵ میکرولیتر آب DEPC، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای Forward و Reverse بود.

رسم شبکه پروتئینی برای شناسایی ژن‌های مرتبط با ژن Zrt1: برای بررسی بیشتر ژن Zrt1 در مخمر *S. cerevisiae* در مرحله آخر به کمک نرم افزارهای بیوانفورماتیک، شبکه پروتئینی مربوط به *S. cerevisiae* که در آن ژن کدکننده پروتئین Zrt1 به همراه پروتئین‌های دیگر که نزدیک‌ترین رابطه همکاری در واکنش‌های سیگنالدهی سلولی را با پروتئین Zrt1 دارند، شناسایی شد. سپس آنالیزهای نهایی بر روی این شبکه انجام گرفت.

رسم شبکه پروتئینی: برای بدست آوردن شبکه پروتئینی از پایگاه داده STRING (<http://string-db.org>) استفاده شد. به این ترتیب که ابتدا صفحه مورد نظر بر روی بخش شناسایی تک پروتئین تنظیم شد، سپس اسم پروتئین مورد نظر یعنی پروتئین Zrt1 در بخش مربوطه نوشته شد و قسمت انتخاب ارگانیزم بر روی *S. cerevisiae* تنظیم شد. پس از این مرحله و شناسایی پروتئین مورد نظر توسط پایگاه داده در انتها شبکه پروتئینی مربوط به Zrt1 به دست آمد. شکل مربوط به شبکه ذخیره شد. همچنین فایل مربوط به آنالیز شبکه با فرمت tsv ذخیره شد تا برای آنالیزهای بعدی استفاده گردد.

آنالیز شبکه: فایل tsv به دست آمده از مرحله قبل در نرم افزار Cytoscape v3.7.0 (<http://cytoscape.org/>) قرار داده شد تا به کمک برنامه‌های متنوع موجود در آن آنالیز شبکه صورت گیرد. در این بخش، برنامه Network

جهت سنتز cDNA بود، افزوده شد. با چندین مرتبه پیپت کردن، محتویات میکروتیوب به خوبی با هم مخلوط شد و سپس ترکیب حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد. پس از این مدت میکروتیوب در دستگاه Palm-Cycler که بر روی دمای ۴۵ درجه سلسیوس و مدت زمان ۶۰ دقیقه تنظیم شده بود، قرار داده شد. cDNA سنتز شده در مرحله qRT-PCR مورد استفاده قرار گرفت (۲۰).

واکنش qRT-PCR برای بررسی میزان بیان ژن Zrt1. بررسی بیان ژن Zrt1 به کمک واکنش qRT-PCR انجام شد. جفت پرایمر:

Forward: 5' AAATGCACTAGAACATGGCG 3'

Reverse: 5' TTCATGACTATTTAAATGCCTT 3'

به عنوان پرایمرهای اختصاصی ژن Zrt1 به کار برده شد. همچنین از جفت پرایمر:

Forward: 5' AAACGGCTACCACATCCAAG 3'

Reverse: 5' CCCATCCCAAGGTTCAACTA 3'

برای تکثیر ژن 18SrRNA بعنوان ژن کنترل داخلی در واکنش qRT-PCR استفاده شد. در واقع کنترل داخلی ژنی است که به دلیل پایداری و میزان بیان ثابتی که دارد، برای نرمال کردن داده‌ها مناسب است. محتویات میکروتیوب جهت انجام واکنش qRT-PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر آماده شد. میکروتیوب‌های آماده شده در دستگاه Corbett Rotor-Gene (6000 HRM) برای انجام واکنش qRT-PCR قرار گرفت. مراحل واکنش برای تکثیر ژن Zrt1 در شرایط فعال سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه، در ۴۰ سیکل (شامل واسرشت سازی در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ ثانیه، اتصال پرایمرها در دمای ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و بسط در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ ثانیه) و در نهایت بازه دمایی ۶۰ تا ۹۵ درجه سلسیوس جهت تشکیل منحنی ذوب تنظیم شد. در انتها، آنالیز منحنی ذوب

S. cerevisiae: از فاضلاب کارخانه الکل سازی سیمین تاک در سه نوبت نمونه برداری شد تا بدین ترتیب خطای در نمونه‌گیری کمتر و اماکن جمع‌آوری مخمر مورد نظر بیشتر باشد. نمونه فاضلاب جمع‌آوری شده که مراحل جداسازی، فیلتراسیون و کشت بر روی دو محیط YPD و SDB را طی کرده بودند، برای جداسازی و بررسی مورفولوژیکی و بیوشیمیایی مخمر *S. cerevisiae* استفاده شدند. کلنی‌های مخمرها از نظر سطح و شکل ظاهری مورد توجه قرار گرفتند، همچنین پس از رنگ‌آمیزی با کریستال ویوله، در زیر میکروسکوپ نیز تصویر مخمرها مشاهده شد. در بررسی بیوشیمیایی مخمرها نیز، قابلیت تخمیر قندهای گلوکز، آرابینوز، مالتوز، رافینوز، گالاکتوز و سوکروز و همچنین عدم تخمیر قندهای لاکتوز، مانیتول، زایلوز و سلیبوز مورد توجه قرار گرفت و نتایج براساس اطلاعات موجود در کتاب تاکسونومی مخمرها بررسی شد (۱۰). سپس برای تایید بیشتر نمونه‌ها از بررسی ملکولی استفاده شد.

پس از بررسی مورفولوژیکی و بیوشیمیایی مخمر برای شناسایی دقیق‌تر مخمر *S. cerevisiae*، روش شناسایی ملکولی مخمر و رسم درخت فیلوژنی بکار گرفته شد. ابتدا واکنش PCR به کمک پرایمرهای ITS1 و ITS4 برای تکثیر ژن 18srRNA مخمر استفاده شد. نتایج نشان داد که ۳ مخمر شناسایی شده در بررسی مورفولوژیکی و بیوشیمیایی بعنوان مخمر *S. cerevisiae* الگوی باند مربوط به ژن 18srRNA را نشان دادند (باند مورد نظر در محدوده 500-1000 bp مشاهده شد). محصول PCR این ۳ مخمر توسط شرکت Bioneer در کشور کره توالی‌یابی شد و توالی خوانده شده در بخش بلاست پایگاه اطلاعاتی NCBI مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج نشان داد که توالی قطعه 18srRNA در ۲ نمونه از این ۳ مخمر بیشترین مشابهت را با مخمر *S. cerevisiae* دارند و این ۲ نمونه مخمر، هر دو سویه یکسانی از مخمر *S. cerevisiae*

Analyzer که یک برنامه بارگذاری شده در نرم افزار Cytoscape می‌باشد، برای آنالیز شبکه به کار برده شد. به این ترتیب که ابتدا در قسمت بالای صفحه در بخش tools برنامه Network Analyzer را انتخاب کرده و با روشن کردن گزینه Analyze Network و سپس انتخاب گزینه treat the network as undirected نتایج آنالیز شبکه براساس پارامترهای مختلف ارائه می‌شود، که معمولاً از دو پارامتر اصلی Degree و Betweenness centrality برای بررسی نتایج استفاده می‌گردد.

خوشه بندی شبکه. برای خوشه بندی شبکه مورد نظر از Clusterviz که یکی دیگر از برنامه‌های بارگذاری شده در نرم افزار Cytoscape می‌باشد، استفاده شد. این نرم افزار براساس الگوریتم MCODE موجود در Cytoscape شبکه را به خوشه‌های کوچکتری تقسیم می‌کند تا پروتئین‌های مهم موجود در شبکه با دقت بیشتری تعیین شود. بعد از آنالیز شبکه با این روش عموماً خوشه‌های موجود در شبکه به همراه پروتئینی که نقش هسته اصلی را در خوشه مورد نظر دارد، براساس پارامترهای تعریف شده در الگوریتم نشان داده می‌شود.

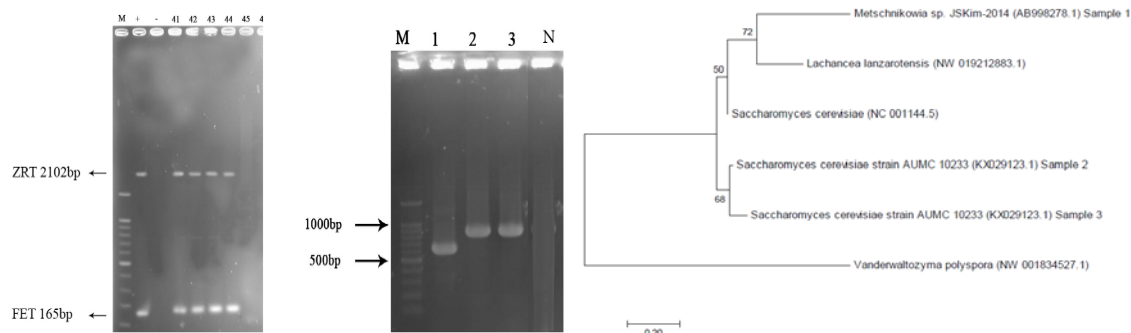
آنالیز آماری: در مطالعه حاضر، تمام اندازه‌گیری‌ها سه بار انجام شد و نتایج بدست آمده میانگین این سه تکرار بوده است. برای تجزیه و تحلیل اولیه داده‌های Ct از نرم افزار REST 2009 استفاده شد. همچنین نرم افزار GraphPad Prism 8 برای آنالیز جامع داده‌ها بکار برده شد. آنالیز داده‌ها با روش ANOVA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و داده‌های عددی به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش شد. همچنین مقادیر معناداری p بصورت زیر نمایش داده شدند:

$$*p < 0.05, **p < 0.01, \text{ and } ***p < 0.001$$

نتایج

شناسایی مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و ملکولی مخمر

cerevisiae انجام شد (شکل ۲).



شکل ۲- A الگوی باند ژن 18srRNA بر روی ژل آگارز. M: مارکر، ۱-۳: شماره نمونه های مخمر که همگی الگوی باند مورد نظر را نشان دادند B. تصویر درخت فیلوژنی از ۳ نمونه مخمر تعیین توالی شده. نمونه ۲ و ۳ به عنوان سویه ای از مخمر *S. cerevisiae* شناسایی شدند

و در مدت زمان ۲۴ ساعت گرماگذاری پس از تلقیح مخمر اتفاق افتاده است. در واقع نتایج گویای این مطلب بود که رشد مخمر *S. cerevisiae* در محیط کشت حاوی غلظت های مختلف روی در طی مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری، پس از تلقیح مخمر به محیط کشت، به صورت تدریجی افزایش یافت. اما پس از عبور از زمان ۲۴ ساعت روند رشد به صورت یکنواخت باقی ماند و افزایش زمان گرما گذاری بر میزان رشد مخمر تاثیرگذار نبود. این در حالی بود که بیشترین میزان رشد در زمان ۲۴ ساعت گرماگذاری پس از تلقیح مخمر و در حضور ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر روی در محیط مشاهده شد. نتایج نشان داد که بیشترین میزان وزن مرطوب و خشک مربوط به نمونه تیمار شده با ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر از غلظت روی در زمان ۲۴ ساعت گرماگذاری پس از تلقیح مخمر بوده است و این مشاهده نتایج طیف سنجی را تایید کرد.

بدین ترتیب با استفاده از طیف سنجی و اندازه گیری بازده وزنی توده زیستی، تاثیر غلظت های مختلف فلز روی بر میزان رشد *S. cerevisiae* مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۱).

بررسی تغییرات بیان ژن Zrt1 در مخمر *S. cerevisiae* تحت تاثیر روی جذب شده: از آنجا که برآورد نرخ رشد و سنجش محتوای توده زیستی خشک، در طی رشد در

بودند، لذا ادامه مراحل کار بر روی این سویه از مخمر *S.*

بررسی میزان رشد مخمر *S. cerevisiae* تحت تاثیر غلظت های مختلف فلز روی: مخمرهای بدست آمده از پساب کارخانه تولید الکل که با بررسی مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی به عنوان سویه ای از *S. cerevisiae* شناخته شدند، در بررسی اثر غلظت های مختلف روی بر میزان رشد و تولید بیومس مخمر *S. cerevisiae*، مورد مطالعه قرار گرفتند.

به محیط های کشت SDB که با غلظت های مختلف $ZnSO_4$ شامل ۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تیمار شده بودند، سوسپانسیون *S. cerevisiae* حاوی مقدار تقریبی $10^7 \times 1/5$ سلول در میلی لیتر (مخمرها در این مرحله در فاز لگاریتمی از رشد خود قرار داشتند) تلقیح شدند. در حالی که کلیه محیط های کشت در شیکر انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سلسیوس و سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه برای مدت ۷۲ ساعت گرماگذاری شده بودند، رشد مخمر در فواصل ۲۴ ساعته (۰، ۲۴، ۴۸ و ۷۲) تخمین زده شد. OD سوسپانسیون هر محیط کشت (ترکیبی از محیط کشت SDB حاوی روی به همراه مخمر) با استفاده از روش طیف سنجی در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه گیری شد، تا میزان رشد مخمر در زمان معین مشخص شود. نتایج نشان داد که بیشترین رشد در محیط کشت تیمار شده با ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر از غلظت $ZnSO_4$

غلظت‌های مختلف روی موجود در محیط کشت، نشان

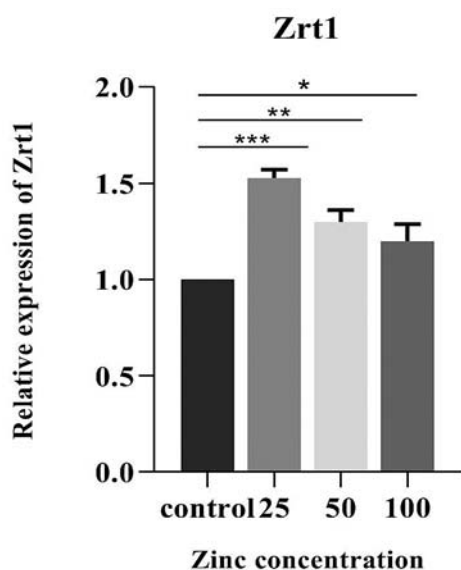
داد که بیشترین میزان رشد مخمر در مدت ۲۴ ساعت

جدول ۱- OD بدست آمده از غلظت‌های مختلف فلز روی در طول موج ۶۰۰ نانومتر و بازده وزنی *S. cerevisiae* در حجم ۲۰۰ میلی لیتر از

محیط کشت در غلظت‌های مختلف روی

بازده وزنی <i>S. cerevisiae</i> در غلظت‌های مختلف روی							OD بدست آمده از غلظت‌های مختلف فلز روی							
۷۲ ساعت			۴۸ ساعت			۲۴ ساعت			ZnSO ₄	۷۲	۴۸	۲۴	۰	ZnSO ₄
وزن خشک			وزن مرطوب			وزن خشک			ساعت			ساعت		
وزن خشک			وزن مرطوب			وزن خشک			ساعت			ساعت		
۰/۰۰۵۷	۰/۳۹	۰/۰۰۵۵	۰/۳۹	۰/۰۰۵۱	۰/۳۴	۰	۱/۹۸۵	۱/۹۹۶	۱/۹۴۷	۰/۰۱۴	۰	۰	۰	
۰/۰۰۶۱	۰/۴۱	۰/۰۰۹۹	۰/۵۸	۰/۰۱۰۳	۰/۶۱	۲۵	۲/۴۴۰	۲/۴۵۰	۲/۵۲۰	۰/۰۲۰	۲۵	۲۵		
۰/۰۰۷۵	۰/۴۲	۰/۰۰۸۶	۰/۵۵	۰/۰۰۸۰	۰/۴۶	۵۰	۲/۰۷۰	۲/۰۰۰	۲/۰۰۵	۰/۰۲۴	۵۰	۵۰		
۰/۰۰۷۹	۰/۴۴	۰/۰۰۸۷	۰/۵۶	۰/۰۰۸۹	۰/۴۷	۱۰۰	۲/۰۳۵	۲/۰۱۰	۲/۰۰۵	۰/۰۳۰	۱۰۰	۱۰۰		

در زمانی اتفاق می‌افتد که محدودیت روی محیطی وجود دارد و با افزایش غلظت روی در محیط میزان بیان آن کاهش می‌یابد (شکل ۳).



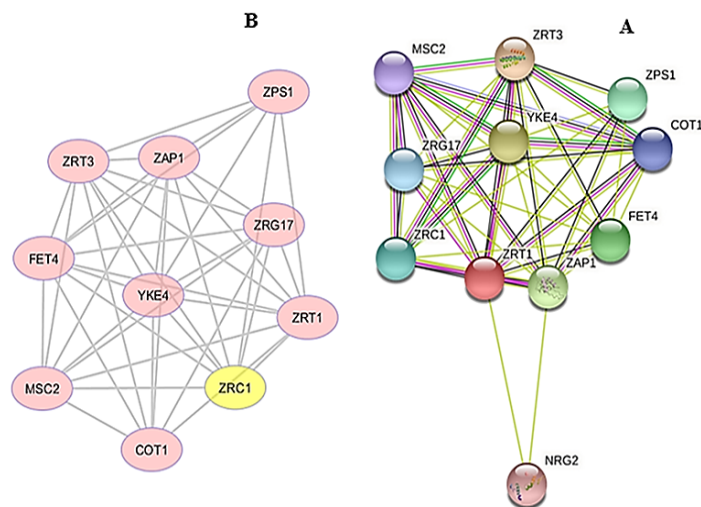
شکل ۳- تغییرات بیان ژن *Zrt1* تحت تاثیر غلظت‌های مختلف روی (۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) موجود در محیط کشت. غلظت ۰ به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شده است، $p < 0.05$ (*
 $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***)

از مجموع این مشاهدات این گونه نتیجه گرفته شد که غلظت روی موجود در محیط کشت، همان طور که بر

لذا به بررسی تغییرات بیان ژن *Zrt1* تحت تاثیر غلظت‌های مختلف روی در زمان ۲۴ ساعت گرماگذاری پس از تلقیح مخمر پرداخته شد. به این ترتیب که پس از استخراج RNA از مخمرهای هر گروه و طی کردن مراحل سنتز cDNA، تاثیر روی جذب شده بر میزان بیان ژن مورد نظر در مخمر *S. cerevisiae* با روش qRT-PCR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیان ژن *Zrt1* تحت تاثیر غلظت‌های مختلف روی موجود در محیط کشت، در مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری پس از تلقیح مخمر، در مقایسه با گروه کنترل (گروهی که غلظت روی در محیط کشت صفر بوده است به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد)، بیان متفاوتی داشته است. این تفاوت در هر ۳ گروه نسبت به گروه کنترل معنادار بوده و مقادیر p در غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به ترتیب < 0.001 ، < 0.01 و < 0.05 بود. با وجود افزایش بیان معنادار ژن *Zrt1* در هر ۳ گروه آزمایشی نسبت به گروه کنترل، بیشترین افزایش بیان این ژن در غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر مشاهده شد و با دو برابر شدن غلظت روی در محیط کشت، بیان این ژن کاهش یافت. این گونه نتیجه گرفته شد که بیشترین میزان بیان ژن *Zrt1*

بررسی شبکه پروتئینی مرتبط با ژن *Zrt1* موجود در مخمر *S. cerevisiae*: پس از اندازه‌گیری تغییرات بیان ژن *Zrt1* در مخمر *S. cerevisiae* تحت تاثیر غلظت‌های مختلف روی محیطی، برای بررسی بیشتر این ژن، مطالعه بیوانفورماتیک شبکه پروتئینی مربوط به *S. cerevisiae* در ارتباط با پروتئین *Zrt1* صورت گرفت. به این ترتیب که ابتدا شبکه پروتئینی مورد نظر از پایگاه داده STRING استخراج شد (شکل ۴) و سپس به کمک نرم افزار Cytoscape با استفاده از برنامه Network Analyzer آنالیز شبکه صورت گرفت. نتایج آنالیز شبکه براساس دو پارامتر اصلی Degree و Betweenness centrality ارائه شد. در پایان نیز برای تقسیم بندی دقیق تر ژن‌ها خوشه بندی شبکه به کمک الگوریتم MCODE صورت گرفت.

میزان نرخ رشد و بیومس به دست آمده از سلول مخمر موثر بوده است، بر میزان بیان ژن‌های مرتبط با روی از جمله *Zrt1* که از ناقلان روی در سلول مخمر می‌باشد، تاثیر گذار است. در واقع در شرایط افزایش روی محیطی بیان این ژن افزایش می‌یابد تا با تولید پروتئین ناقل، جذب روی محیطی توسط مخمر افزایش یابد. اما این افزایش کاملاً به میزان غلظت روی محیطی وابسته است و همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده شد، این افزایش بیان در محدود ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر، توسط مخمر قابل قبول بود. ولی افزایش بیشتر غلظت روی محیطی نه تنها اثر افزایشی بر بیان این ژن نداشته است، بلکه سبب کاهش بیان آن نیز شده است.



شکل ۴- A شبکه پروتئینی پیش بینی شده برای ژن *Zrt1* B. خوشه به دست آمده از شبکه پروتئینی. ژن نشان داده شده با رنگ زرد به عنوان هسته مرکزی خوشه شناسایی شده است.

بیشتری نقش دارند و هرچه تعداد یال‌های میان ژن‌ها بیشتر باشد، به معنای ارتباط تنگاتنگ میان ژن‌ها در شبکه است. خوشه بندی شبکه با استفاده از الگوریتم MCODE و براساس ۳ پارامتر (Degree Cutoff: 2, K-Core: 2, Node Score Cutoff: 0.2)، نشان داد که این شبکه پروتئینی دارای یک خوشه تشکیل شده از ۱۰ ژن (گره) می‌باشد که در میان آنها ژن *ZRC1* بعنوان هسته مرکزی

همان‌طور که در شکل ۴A نشان داده شده است، شبکه به دست آمده دارای ۱۱ ژن بود. هر گلوله در شکل نشان دهنده یک ژن و هر خط میان دو ژن نشان دهنده یک ارتباط میان این دو ژن است. در تعریف شبکه پروتئینی هر ژن یک گره و هر خط ارتباطی، یک یال نامیده می‌شود. بنابراین هرچه تعداد گره‌ها در شبکه بیشتر باشد، نشان دهنده اینست که در شبکه پروتئینی مورد بررسی ژن‌های

بحث و نتیجه‌گیری

در میان مطالعات انجام شده برای شناسایی هرچه بهتر میکروارگانسیم‌های مناسب با توانایی بالا در جذب زیستی فلزات و به دنبال آن رفع آلودگی پسماندها به منظور حفظ سلامت محیط زیست، مطالعات قابل توجهی بر روی مخمر *S. cerevisiae* صورت گرفته است، که نشان دهنده اهمیت آن برای رسیدن به این هدف می‌باشد. در مطالعه ای در سال ۱۹۸۷ نشان داده شد که این مخمر قادر به برداشت و جذب روی از محیط خارج سلولی و ذخیره و توزیع آن در ساختارهای سازمان یافته از جمله واکوئل‌ها می‌باشد. این مکانسیم عبور از غشای پلاسمایی و جداره واکوئل‌ها از طریق انتقال دهنده‌های خاص و وابسته به انرژی است و با این مکانسیم، مخمر قادر به مقاومت و کاهش سمیت روی در محیط حاوی روی نسبت به دیگر فلزات می‌باشد (۲۷). مکانسیم جذب فلز در *S. cerevisiae* از طریق یک روند پیچیده، تحت شرایط خاصی اتفاق می‌افتد. پارامترهای بسیاری بر جذب روی توسط سلول‌های مخمر تأثیر گذار است. از این میان می‌توان به فیزیولوژی سلول، خصوصیات سطح سلول و همچنین شیمی یون‌های فلزی و اثرات فیزیوشیمیایی محیط اشاره کرد (۴). مطالعه انجام شده بر روی جذب فلزات سنگین از فاضلاب صنایع چرم‌سازی، توسط مخمر *S. cerevisiae* نشان داد که این مخمر چه بصورت زنده و چه بصورت غیرزنده قادر به جذب فلزات سنگین است. همچنین مشاهده شد که پارامترهای مهمی از جمله غلظت فلزات سنگین، pH، محیط کشت، مدت زمان گرماگذاری و حتی میزان تلقیح مخمر نقش حیاتی در کارایی جذب فلزات توسط مخمر دارند (۱۹).

در یک مطالعه تأثیر سه نوع نمک روی شامل نیترات روی، سولفات روی و کلراید روی بر میزان بازده *S. cerevisiae* همچنین تفاوت جذب این سه نوع نمک توسط سلول‌های مخمر، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که

خوشه‌شناخته می‌شود (شکل ۴.B). آنالیز شبکه به کمک برنامه Network Analyzer ژن‌های موجود در شبکه را براساس پارامترهای Degree و Betweenness centrality ترتیب بندی کرد، که این ترتیب بندی‌ها نشان دهنده درجه اهمیت ژن‌ها در شبکه است. به کمک پارامتر Degree ۱۰ درصد اول ژن‌های موجود در این ترتیب بندی بعنوان Hub شناخته می‌شوند و براساس پارامتر Betweenness centrality ۱۰ درصد اول ژن‌های موجود در این ترتیب بندی بعنوان Bottleneck شناخته می‌شوند. Hub در شبکه به ژن‌هایی گفته می‌شود که بیشترین ارتباط را با ژن‌های دیگر دارند و Bottleneck به ژن‌هایی گفته می‌شود که در کوتاه کردن مسیر برای ارتباط میان سیگنالدهی‌های مختلف نقش دارند. لذا برای بررسی یک شبکه پروتئینی هر دو پارامتر در نظر گرفته می‌شود. چرا که بسته به نوع شبکه ممکن است میزان اهمیت هرکدام از این دو پارامتر متفاوت باشد. با توجه به نتایج ارائه شده در جدول ۲ براساس آنالیز به دست آمده، و نیز تعریف Hub و Bottleneck در شبکه پروتئینی، ژن Zrt1 از هر دو نظر دارای بیشترین امتیاز بود، که نشان دهنده اهمیت پروتئین آن در مسیر سیگنالدهی مربوط به انتقال روی محیطی به داخل سلول در مخمر *S. cerevisiae* می‌باشد.

جدول ۲- ترتیب بندی ژن‌های موجود در شبکه پروتئینی براساس پارامترهای اصلی

نام ژن	Degree	نام ژن	Betweenness centrality
ZRT1	۱۰	ZRT1	۰/۱۰۳۹۱۵
ZAP1	۱۰	ZAP1	۰/۱۰۳۹۱۵
YKE4	۹	YKE4	۰/۰۱۵۰۲۶
ZRT3	۹	ZRT3	۰/۰۱۵۰۲۶
FET4	۹	FET4	۰/۰۱۵۰۲۶
ZRC1	۸	MSC2	۰/۰۰۷۴۰۷
MSC2	۸	ZRG17	۰/۰۰۳۱۷۵
ZRG17	۸	ZRC1	۰/۰۰۳۱۷۵
COT1	۷	COT1	۰
ZPS1	۶	ZPS1	۰
NRG2	۲	NRG2	۰

غلظت‌های ۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰ میلی گرم از هر سه نوع نمک روی مذکور، میزان بازده توده زیستی مخمر را تغییر نمی‌دهد و میزان توده زیستس بدست آمده ۰/۹۹ - ۱/۱۹ گرم توده زیستی خشک مخمر در ۱۰۰ میلی لیتر محیط YPD بود. در این تحقیق همچنین نشان داده شد که غلظت‌های بالای روی در حدود ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم منجر به مرگ سلول‌های مخمر می‌شود (۲۱). آزاد و همکارانش در سال ۲۰۱۴، موفق به تولید توده زیستی *S. cerevisiae* غنی شده با روی جهت استفاده بعنوان مکمل غذایی برای انسان و حیوانات شدند. مشاهدات آنها نشان داد که غلظت سولفات روی افزوده شده به محیط رشد مخمر بطور مشخصی می‌تواند بر میزان تجمع روی در سلول‌ها و همچنین رشد سلول مخمر تاثیر بگذارد (۴).

در مطالعه حاضر، ما از غلظت‌های مختلف فلز روی (۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) در محیط کشت SDB استفاده کردیم، تا غلظت اپتیمم روی را برای رسیدن به میزان بالایی از توده زیستی مخمر و جذب روی، بدست آوریم. بطور همزمان، اثر زمان گرماگذاری نیز بر رشد مخمر مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که افزایش زمان گرماگذاری بیش از ۲۴ ساعت، تأثیر مثبتی بر جذب روی ندارد (جدول ۱). حداکثر میزان توده زیستی خشک و همچنین بیشترین سرعت رشد مخمر نیز در غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر روی در محیط SDB و بعد از ۲۴ ساعت گرماگذاری مشاهده شد (جدول ۱). بنابراین، این گونه نتیجه گرفته شد که مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری در حضور روی محیطی با غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر زمان مناسب و غلظت اپتیمم روی برای رشد *S. cerevisiae* می‌باشد.

جذب روی به داخل سلول‌ها و انتقال آن به داخل و خارج اندامک‌های داخل سلولی نیاز به ناقلان پروتئینی دارد که به غشاهای این اندامک‌ها برای تسهیل در حرکت روی کمک می‌کنند. در مطالعه ای که بر روی جزئیات

تنظیم مولکولی برداشت فلز روی در مخمر *S. cerevisiae* صورت گرفت، مشاهده شد که برداشت روی در مخمر وابسته به دو ژن *Zrt1* و *Zrt2* است، که هر دو متعلق به خانواده ZIP می‌باشند. همچنین مشاهده شد که *Zrt1* در هنگام کمبود روی فعال می‌شود، ولی فعال شدن *Zrt2* هنگامی صورت می‌گیرد که میزان روی در محیط نرمال باشد. در این مطالعه تنظیمات مختلف این دو ژن در مقادیر مختلف روی نیز مورد بررسی قرار گرفت (۲۷). در سال ۲۰۰۸ آزمایشات Tamura و همکارانش نشان داد که حذف ژن *Zrt1* به شدت رشد مخمر *S. cerevisiae* را در محیط کشت مهار می‌کند و این نقص را می‌توان با دو برابر کردن مقدار یون فلز روی در محیط برطرف کرد. آنها پیشنهاد کردند که فلز روی می‌تواند فاکتور محدود کننده رشد در جهش یافته‌های *zrt1Δ* و *zrt1Δzrt2Δ* باشد. همچنین این تحقیق نشان داد که Al^{3+} موجب افزایش تجمع فلز روی در موتانت *zrt1Δ* می‌شود و در فقدان Al^{3+} اضافی، کمبود روی در مخمر مشاهده می‌گردد (۲۳).

ما نیز در مطالعه خود به بررسی تغییرات سطح بیان *Zrt1* بعنوان ناقل مهم روی، در پاسخ به غلظت روی محیطی و مدت زمان گرماگذاری ۲۴ ساعته *S. cerevisiae* در محیط SDB، در مقایسه با محیط شاهد (محیط SDB فاقد روی) پرداختیم. نتایج بدست آمده نشان داد که حداکثر میزان بیان ژن *Zrt1* نسبت به گروه‌های دیگر در غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر روی اتفاق می‌افتد. در واقع بیشترین میزان بیان ژن *Zrt1* در زمانی اتفاق می‌افتد که محدودیت روی محیطی وجود دارد و با افزایش غلظت روی در محیط، میزان بیان آن کاهش می‌یابد (شکل ۳). از این رو، مشاهدات ما مطابق با مطالعه قبلی است که بیان می‌کند، جذب روی خارج سلولی توسط *S. cerevisiae* در محدودیت شدید روی، با استفاده از ناقل روی با افینیتی بالا، یعنی *Zrt1* صورت می‌گیرد (۶).

علاوه بر توانایی و قابلیت میکروارگانیسم‌ها در جذب فلزات، تولید پروتئین تک‌یاخته توسط این میکروارگانیسم‌ها نیز توجه محققان را به خود جلب کرده است. در مطالعه‌ای که بر روی پساب حاوی نشاسته صورت گرفت، مشخص شد که می‌توان سویه‌های مخمر *S. cerevisiae* را از آن جداسازی کرد و این مخمر قادر به مصرف نشاسته محلول و خام است و می‌تواند از آنها برای تولید پروتئین تک‌یاخته استفاده کند (۱۶). در مطالعه دیگری که به منظور استفاده از مخمرها در جهت تولید پروتئین تک‌یاخته از امعاء و احشاء ماهیان صورت گرفت، مشخص شد که مخمر *S. cerevisiae* موجود در باقیمانده امعاء و احشاء ماهیان می‌تواند جهت تولید پروتئین تک‌یاخته استفاده شود. الگوی کشت مورد استفاده در این تحقیق از نوع هوازی بود که در شرایط بسته و در دو مقیاس آزمایشگاهی و تخمیری انجام شد. نتایج نشان داد که شرایط مطلوب رشد مخمرها، همچنین استفاده از فرمانتور مناسب، سبب تولید درصد بالایی از پروتئین تک‌یاخته حاصل از پساب ضایعات ماهی می‌شود که به‌عنوان مکمل غذایی در غذای دام، طیور و آبزیان قابل استفاده است (۲۲).

میکروارگانیسم‌ها به‌عنوان جاذب‌های زیستی به راحتی در دسترس هستند و برای جذب فلزات سنگین در غلظت‌های بسیار کم نیز کاملاً کارآمد می‌باشند. منطبق با استفاده از میکروارگانیسم‌ها برای جذب فلزات سنگین اینست که آنها توده زیستی هستند که بطور گسترده قسمت زیادی از کره زمین را تشکیل می‌دهند، در حالی که از نظر اندازه بسیار کوچکند. همچنین میکروارگانیسم‌ها قابلیت رشد در شرایط کنترل شده را دارند و در مقابل تغییرات محیطی قابل انعطافند (۱۵). همه این ویژگی‌ها در کنار توانایی میکروارگانیسم‌ها به‌ویژه مخمرها در استفاده از فلزات جذب شده توسط آنها در جهت تولید توده زیستی کارآمد که می‌تواند علاوه بر سم‌زدایی از پسماندها و پاکسازی محیط به‌عنوان بیومسی غنی از فلزات در جهت غنی‌سازی هدفمند غذای انسان‌ها و خوراک دیگر جانوران

در سال ۲۰۱۳ مطالعه‌ای بر روی Zrt1 به‌عنوان یکی از ژن‌های موثر در برداشت روی انجام شد. این مطالعه فراوانی و پلی‌مورفیسم غیرمتراصف انواع ژن‌های دیگر موثر در برداشت روی و ایجاد تعادل در میزان روی در *S. cerevisiae* را نیز مورد بررسی قرار داد. نتایج نشان داد که در ایجاد تعادل درون سلولی، همچنین برداشت و انباشت فلز روی بیش از ۵ ژن دخالت دارند، که به‌موجب آنها پلی‌مورفیسم‌های بسیاری در برداشت روی در این مخمر دخیل هستند. این ژن‌ها شامل Zrt1، Zrt2، Fet4، Pho84، Cot1 و چندین ژن دیگر می‌باشند. در نهایت نتیجه گرفته شد که میزان فلز روی موجود در محیط، عاملی بالقوه در تخمین فراوانی انتخاب مثبت در بیان این ژن‌های مخمر می‌باشد (۸). همچنین در تحقیق دیگری مشاهده شد که همانند دیگر ناقلان، Zrt1 هنگامی که *S. cerevisiae* در معرض غلظت بالای روی محیطی قرار می‌گیرد، از غشای پلاسمایی حذف می‌شود (۲۰). در مطالعه حاضر ما نیز به کمک رسم شبکه پروتئینی توانستیم ژن‌های موجود در *S. cerevisiae* که نزدیک‌ترین رابطه را با پروتئین Zrt1 داشتند و در مسیرهای سیگنالدهی درون سلولی این مخمر از جمله مسیرهای موجود جهت انتقال روی محیطی به داخل سلول شرکت داشتند، شناسایی کنیم (شکل ۴.۴). نتایج آنالیز این شبکه پروتئینی نشان داد که Zrt1 دارای بیشترین درجه از لحاظ اهمیت و تقابل با دیگر پروتئین‌های موجود در شبکه بوده است. قابل ذکر است که Fet4 و Cot1 که در مطالعه انجام شده در سال ۲۰۱۳ به‌عنوان ناقلان روی در *S. cerevisiae* گزارش شده بودند نیز در شبکه گفته شده مشاهده شدند. لذا پیشنهاد می‌شود تا در مطالعات بعدی جهت بررسی دقیق‌تر شرایط اپتیمم برای جذب روی به‌عنوان یکی از فلزات سنگین موجود در پسماندهای صنعتی، سایر ژن‌های این شبکه به‌ویژه Fet4 و Cot1 و نیز Zrc1 که به‌عنوان هسته اصلی در خوشه بندی از شبکه شناسایی شد (شکل ۴.۴)، پرداخته شود.

در مطالعات بعدی مواردی نظیر: بررسی دیگر فاکتورهای موثر بر رشد مخمر و جذب روی توسط مخمر، مقایسه تاثیر شرایط هوازی و بی‌هوازی بر رشد مخمر و در نتیجه میزان تولید توده زیستی، بررسی تاثیر فاکتورهای مختلف بر بیان دیگر ژن‌های موثر در جذب روی از جمله Zrt2 و Pho84 و تاثیر آنها بر رشد مخمر، تهیه پروتئین تک‌یاخته غنی شده با روی و آهن توسط مخمر *S. cerevisiae* و بررسی کارایی مخمر *S. cerevisiae* برای جذب روی در فاضلاب حاوی عناصر مختلف، مورد توجه قرار گیرد.

استفاده شود (۱۱)، اهمیت مطالعاتی نظیر مطالعه حاضر را برای دست‌یابی به شرایط بهینه برای تولید بهینه چنین میکروارگانیسم‌هایی نشان می‌دهد. مطالعه حاضر بر روی مخمر *S. cerevisiae* بدست آمده از پساب کارخانه تولید الکل بمنظور بررسی شرایط بهینه رشد این مخمر در حضور فلز روی و با تاکید بر نقش پروتئین Zrt1 که یک پروتئین ناقل روی در شرایط کمبود روی می‌باشد، متمرکز شده بود. نتایج حاصل از مطالعه، قابلیت و اهمیت این پروتئین را در جذب روی به ویژه در شرایط کمبود روی محیطی نشان داد. پیشنهاد می‌شود برای نتیجه‌گیری بهتر

منابع

- ۱- شیخی، رستمی، آذین، اسداللهی، ابراهیمی. بهبود تولید و مقاومت به اتانل در مخمر ساکارومایسس سرویزیه با راهبرد مهندسی تکاملی با استفاده از تنش ۱-بوتانل. پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران). ۲۰۲۱.
- ۲- فرامرزی، انزابی، یونس، مالمیری ج، هدا. اثر تغییرات مقدار ملاس و سلنیوم بر رشد مخمر ساکارومایسس سرویزیه و میزان بیواتانول تولیدی. پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران). ۲۰۲۰، ۳۳(۴): ۶۲۶-۳۹.
- 3- Andreini C, Banci L, Bertini I, Rosato A. Zinc through the three domains of life. Journal of proteome research. 2006;5(11):3173-8.
- 4- Azad SK, Shariatmadari F, Torshizi MK. Production of zinc-enriched biomass of *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Elementology. 2014;19(2)
- 5- Cerezer VG, Bando SY, Pasternak J, Franzolin MR, Moreira-Filho CA. Phylogenetic analysis of *Stenotrophomonas* spp. isolates contributes to the identification of nosocomial and community-acquired infections. BioMed research international. 2014;2014.
- 6- Eide DJ. Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research. 2006;1763(7):711-22.
- 7- Ellis CD, MacDiarmid CW, Eide DJ. Heteromeric protein complexes mediate zinc transport into the secretory pathway of eukaryotic cells. Journal of Biological Chemistry. 2005;280(31):28811-8.
- 8- Engle EK, Fay JC. ZRT1 harbors an excess of nonsynonymous polymorphism and shows evidence of balancing selection in *Saccharomyces cerevisiae*. G3: Genes, Genomes, Genetics. 2013;3(4):665-73.
- 9- Gerwien F, Skrahina V, Kasper L, Hube B, Brunke S. Metals in fungal virulence. FEMS microbiology reviews. 2018;42(1): fux050.
- 10- Kurtzman C, Fell JW, Boekhout T. The yeasts: a taxonomic study: Elsevier; 2011.
- 11- Lavens P, Sorgeloos P. The history, present status and prospects of the availability of *Artemia* cysts for aquaculture. Aquaculture. 2000;181(3-4):397-403.
- 12- Li E, Mira de Orduña R. A rapid method for the determination of microbial biomass by dry weight using a moisture analyser with an infrared heating source and an analytical balance. Letters in applied microbiology. 2010;50(3):283-8.
- 13- Massoud R, Hadiani MR, Hamzehlou P, Khosravi-Darani K. Bioremediation of heavy metals in food industry: Application of *Saccharomyces cerevisiae*. Electronic Journal of Biotechnology. 2019.۶۰-۳۷.۵۶;
- 14- Mello A, Napoli C, Murat C, Morin E, Marceddu G, Bonfante P. ITS-1 versus ITS-2 pyrosequencing: a comparison of fungal populations in truffle grounds. Mycologia. 2011;103(6):1184-93.

- 15- Mishra V. Biosorption of zinc ion: a deep comprehension. *Applied Water Science*. 2014;4(4):311-32.
- 16- Nahvi I, Shafiei R. Single cell protein production from raw starch in fed_batch culture by coculture of *Cryptococcus aerius* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Pajouhesh And Sazandegi*. 2008.
- 17- North M, Steffen J, Loguinov AV, Zimmerman GR, Vulpe CD, Eide DJ. Genome-wide functional profiling identifies genes and processes important for zinc-limited growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet*. 2012;8(6): e1002699.
- 18- Owolabi J, Hekeu M. Heavy metal resistance and antibiotic susceptibility pattern of bacteria isolated from selected polluted soils in Lagos and Ota, Nigeria. *International Journal of Basic & Applied Sciences*. 2014;14(6):6-12.
- 19- Porwal H, Mane A, Velhal S. Biodegradation of dairy effluent by using microbial isolates obtained from activated sludge. *Water Resources and Industry*. 2015;9:1-15.
- 20- Schothorst J, Zeebroeck GV, Thevelein JM. Identification of Ftr1 and Zrt1 as iron and zinc micronutrient transceptors for activation of the PKA pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell*. 2017;4(3):74.
- 21- Sillerová S, Lavová B, Urminská D, Poláková A, Vollmannová A, Harangozo L. Preparation of zinc enriched yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) by cultivation with different zinc salts. *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 2012;1:689-95.
- 22- Suman G, Nupur M, Anuradha S, Pradeep B. Single cell protein production: a review. *Int J Curr Microbiol App Sci*. 2015;4(9):251-62.
- 23- Tamura S, Yoshimura E. Promotion of Zn²⁺ Uptake by Al³⁺ in a *Saccharomyces Cerevisiae* Mutant that Lacks the ZRT1 Gene Encoding a High-Affinity Zn Transporter. *Biological trace element research*. 2008;124(3):262.
- 24- Ugalde U, Castrillo J. Single cell proteins from fungi and yeasts. *Applied mycology and biotechnology*. 2: Elsevier; 2002. p. 123-49.
- 25- Wang J, Chen C. Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnology advances*. 2009;27(2):195-226.
- 26- Wang J, Chen C. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: a review. *Biotechnology advances*. 2006;24(5):427-51.
- 27- WHITE C, GADD GM. The uptake and cellular distribution of zinc in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*. 1987;133(3):727-37.
- 28- Yamasaki S, Sakata-Sogawa K, Hasegawa A, Suzuki T, Kabu K, Sato E, et al. Zinc is a novel intracellular second messenger. *The Journal of cell biology*. 2007;177(4):637-45.
- 29- Zhao H, Eide D. The yeast ZRT1 gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996;93(6):2454-8.
- 30- Zhao H, Eide D. The ZRT2 gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*. 1996;271(38):23203-10

In search of Zrt1 gene expression changes in *Saccharomyces cerevisiae* under different concentrations of zinc in medium

Saraei F.¹, Amin i K.², Haddadi A.¹ and Larypoor M.³

¹ Dept. of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, I.R. of Iran

² Dept. of Microbiology, Faculty of Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, I.R. of Iran

³ Dept. of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Tehran North Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R. of Iran.

Abstract

Background: The *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) is a unique microorganism in toxic metals biosorption. The extracellular uptake of zinc in *S. cerevisiae* is mediated by the high-affinity Zrt1 protein as zinc transporter. The aim of current study was to examination of Zrt1 gene expression level in the presence of zinc metal, in *S. cerevisiae* as an industrially important yeast strain. **Methods:** Yeast isolates, obtained from alcohol factory's effluent were filtered and grown in YPD (yeast extract-peptone-dextrose) medium as a specific medium for yeast growth. The PCR method and DNA sequencing was employed to identify *S. cerevisiae* yeasts strains. Then, growth rate of this yeast in present of different concentration of Zn²⁺, was examined at 24-hour intervals (0, 24, 48, and 72 h), using spectrophotometry. The qRT-PCR technique was carried out to quantified expression level of Zrt1 in yeast cells under these conditions. Also, the protein-protein interaction (PPI) network of Zrt1 and its closely interacting genes, obtained from STRING database were analyzed using Network Analyzer (plugged in Cytoscape v3.7.0) to identify the most potentially effective genes. **Results:** In optimum conditions of 25 µg/ml of zinc after 24 h incubation, *S. cerevisiae* showed the maximum growth rate and expression level of Zrt1 as Zn transporter. Also, bioinformatics analyses identified Zrt1 as crucial gene in cell signaling pathway for zinc absorption by *S. cerevisiae*. **Discussion:** our study demonstrated that *S. cerevisiae*, obtained from industrial effluents, can be used to produce Zn-enriched biomass.

Key words: *S. cerevisiae*, Zinc, Zrt1, Biosorption