

اللهم صل على محمد  
والعائلة الطيبة



دانشکده کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی

شناسایی قارچ‌های متحمل به آلودگی ناشی از فلز مس و بررسی تغییرات بیانی ژن متالوتیونین در گونه

قارچی غالب

نگارنده: فردوس گنجی

استاد (اساتید) راهنما

دکتر شهید موجرلو

دکتر ناصر صفایی

مهر ماه ۱۴۰۰

شماره: ۱۹۶  
 تاریخ: ۱۴۰۱/۹/۹  
 ویرایش:

**پاسخ نهایی**  
 فرمهای ارزشیابی پایان نامه کارشناسی ارشد  
 مربوط به ورودی های ۹۲ تا بعد



**فرم شماره (۳) صورتجلسه نهایی دفاع از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد**

با نام و یاد خداوند متعال، ارزیابی جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد خانم فردوس گنجی با شماره دانشجویی ۹۶۳۵۲۲۴ رشته زراعت و اصلاح نباتات گرایش بیوتکنولوژی تحت عنوان شناسایی فارغ های متحمل به آلودگی ناشی از فلز مس و بررسی تغییرات بیانی ژن متاوتوپوین در گونه فارچی غالب که در تاریخ ۱۴۰۱/۰۷/۲۲ با حضور هیات محترم داوران در دانشگاه صنعتی شاهرود برگزار شد به شرح ذیل اعلام می گردد:

الف) درجه عالی: نمره ۲۰-۱۶  (ب) درجه خیلی خوب: نمره ۱۸-۱۶   
 ج) درجه خوب: نمره ۱۷-۱۶  (د) درجه متوسط: نمره ۱۵-۱۴   
 (ه) کمتر از ۱۴ غیر قابل قبول و نیاز به دفاع مجدد دارد   
 نوع تحقیق: نظری  عملی

| اعضای | مرتبه علمی | نام و نام خانوادگی         | عضو هیات داوران           |
|-------|------------|----------------------------|---------------------------|
|       | استادیار   | دکتر شیده موجروو           | ۱- استاد راهنمای اول      |
|       | دانشیار    | دکتر امیر سعیدی            | ۲- استاد راهنمای دوم      |
|       |            |                            | ۳- استاد مشاور            |
|       | استادیار   | دکتر زیبا قاسمی حق         | ۴- استاد داور اول         |
|       | استادیار   | دکتر شاهرخ قورچبک          | ۵- استاد داور دوم         |
|       | دانشیار    | دکتر احمد رجایی محقق آینده | ۶- نماینده تحصیلات تکمیلی |

تاریخ و امضاء و مهر دانشکده:

نام و نام خانوادگی رئیس دانشکده: دکتر علی درخشان شادمهری



تقدیم به خانواده عزیزم

## تشکر و قدردانی

سپاس بی کران پروردگار یکتا را که هستی مان بخشید و به طریق علم و دانش رهنمونمان شد و به همنشینی رهروان علم و دانش مفتخرمان نمود و خوشه چینی از علم و معرفت را روزیمان ساخت.

قدردان و سپاسگذار خانواده ای هستم که:

لحظات ناب باور بودن، لذت و غرور دانستن، جسارت خواستن، عظمت رسیدن و تمام تجربه های یکتا و زیبای زندگییم مدیون حضور سبز آنهاست.

و نیز بر خود واجب می دانم مراتب سپاس و تشکر صمیمانه خویش را به حضور اساتید راهنمای گرانقدرم سرکار خانم دکتر شیده موجرلو و جناب آقای دکتر ناصر صفایی که در محضرشان علاوه بر کسب علم، درس تلاش، امید، صبر و پشتکار را آموختم داشته باشم.

## تعهد نامه

اینجانب فردوس گنجی دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه "شناسایی قارچ‌های متحمل به آلودگی ناشی از فلز مس و بررسی تغییرات بیانی ژن متالوتیونین در گونه قارچی غالب" تحت راهنمایی دکتر شیده موجرلو و دکتر ناصر صفایی متعهد می‌شوم:

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است .
- در استفاده از نتایج پژوهش‌های محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است .
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است .
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می‌باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه صنعتی شاهرود » و یا « Shahrood University of Technology » به چاپ خواهد رسید .
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می‌گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه ، در مواردی که از موجود زنده ( یا بافتهای آنها ) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است .
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری ، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است .

## تاریخ

### امضای دانشجو

#### مالکیت نتایج و حق نشر

کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، کتاب، برنامه های رایانه ای، نرم افزار ها و تجهیزات ساخته شده است ) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می‌باشد. این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود .

## چکیده

زیست پالایی به کمک میکروارگانیسم‌ها از روش‌های پیشرفته حذف مشکلات آلودگی‌های زیست محیطی می‌باشند. به منظور شناسایی قارچ‌های متحمل به آلودگی ناشی از فلز مس و بررسی تغییرات بیانی ژن‌های مرتبط با تحمل فلزات سنگین در آن‌ها، نمونه برداری از خاک و پساب معدن مس سرچشمه که یکی از بزرگترین معادن روباز مس دنیا می‌باشد، انجام شد. در مجموع ۷۳ جدایه قارچی جداسازی و خالص‌سازی شد. سپس اثر بازدارندگی غلظت‌های مختلف سولفات مس بر رشد میسلیمی تمامی جدایه‌های خالص شده، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که غلظت‌های ۱۰۰۰، ۱۵۰۰، ۳۵۰۰ و ۴۰۰۰ پی‌پی‌ام اثر بازدارندگی از رشد بر جدایه‌های قارچی نداشتند و تمامی جدایه‌ها قادر به رشد در محیط‌های حاوی مس بودند و فقط غلظت ۵۵۰۰ پی‌پی‌ام سولفات مس اثر بازدارندگی از رشد میسلیمی در جدایه‌های قارچی در مقایسه با شاهد نشان داد. بر اساس نتایج آزمون‌های زیست‌سنجی سه جدایه قارچی S3-1، S3-21 و S1-7 که قابلیت رشد در محیط جامد و مایع حاوی غلظت ۵۵۰۰ پی‌پی‌ام سولفات مس را داشتند، انتخاب شدند و مورد شناسایی مولکولی قرار گرفتند. همچنین تغییرات بیان ژن لاکاز و متالوتیونین در سه جدایه منتخب مورد بررسی قرار گرفت. نتایج شناسایی مولکولی بر اساس ناحیه ITS1, 5.8S, ITS2 نشان داد که دو جدایه S3-1 و S1-7 به گونه *Pleurotus eryngii* و جدایه S3-21 به جنس *Sarocladium* تعلق دارد. در دو جدایه S3-1 و S1-7 روند مشابه تغییرات بیان ژن لاکاز مشاهده شد. بطوری‌که بیان ژن لاکاز در تیمار سولفات مس در روز هشتم در مقایسه با روز ششم کاهش یافت. اما در جدایه S3-21، روند تغییر بیان ژن لاکاز متفاوت و در روز هشتم در تیمار سولفات مس در مقایسه با روز ششم افزایش (حدود دو برابر) یافت. بیان ژن متالوتیونین در هر سه جدایه در روز هشتم در مقایسه با روز ششم افزایش یافت که نشان‌دهنده نقش این ژن در تحمل به سولفات مس در جدایه‌های مورد بررسی می‌باشد. در این تحقیق گونه *Pleurotus eryngii* و جنس *Sarocladium* برای اولین بار در ایران به عنوان قارچ‌های متحمل به فلزات سنگین معرفی شدند و بیان دو ژن مرتبط با مقاومت به فلزات سنگین از جمله مس در آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

کلمات کلیدی: زیست پالایی، سولفات مس، لاکاز، متالوتیونین، *Sarocladium sp.*، *Pleurotus eryngii*

## فهرست مطالب

### فصل ۱: مقدمه

۱-۱ - مقدمه ..... ۱

### فصل ۲: مروری بر منابع

۱-۲ - جذب زیستی ..... ۷

۲-۲ - جذب بیولوژیکی فلزات سنگین توسط زیست توده زنده و زیست توده غیر فعال ..... ۷

۳-۲ - تاثیر عوامل خارجی در جذب بیولوژیکی فلزات سنگین ..... ۹

۴-۲ - مکانیسم میکروارگانیسم‌ها برای جذب فلز ..... ۱۰

۵-۲ - انتقال مس در میکروارگانیسم‌ها ..... ۱۱

۶-۲ - بیان زیستی متالوتیونین و جذب آلودگی‌های فلزات سنگین ..... ۱۴

۱-۶-۲ - متالوتیونین ..... ۱۴

۲-۶-۲ - دسته‌بندی متالوتیونین‌ها ..... ۱۵

۳-۶-۲ - مکانیسم عمل متالوتیونین‌ها ..... ۱۶

۷-۲ - عملکرد گونه‌های قارچی در حذف فلزات ..... ۱۹

۱-۷-۲ - جنس *Sarocladium* ..... ۱۹

۲-۷-۲ - جنس *Pleurotus* ..... ۲۰

۸-۲ - نقش آنزیم لاکاز در جذب زیستی فلزات سنگین ..... ۲۱

### فصل ۳: مواد و روش‌ها

۱-۳ - نمونه‌برداری و آماده‌سازی نمونه‌ها ..... ۲۶

۲-۳ - جداسازی و خالص‌سازی جدایه‌های قارچی ..... ۲۶

۳-۳ - زیست‌سنجی جدایه‌های قارچی ..... ۲۷

۱-۳-۳ - بررسی تاثیر مس بر رشد رویشی قارچ‌ها ..... ۲۷



|         |                                                             |         |
|---------|-------------------------------------------------------------|---------|
| ۲۸..... | بررسی تاثیر مس بر رشد قارچ‌ها در محیط مایع.....             | ۲-۳-۳ - |
| ۲۸..... | بررسی تاثیر اسیدپتیه محیط بر رشد جدایه‌ها.....              | ۳-۳-۳ - |
| ۲۸..... | اندازه‌گیری میزان مس جذب‌شده توسط میسلیموم قارچ.....        | ۴-۳ -   |
| ۲۹..... | بررسی میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) جدایه‌ها.....          | ۵-۳ -   |
| ۳۰..... | بررسی ارتباط بین میزان مس موجود در خاک و جمعیت میکروبی..... | ۶-۳ -   |
| ۳۰..... | شناسایی مولکولی جدایه‌های قارچی.....                        | ۷-۳ -   |
| ۳۲..... | بررسی تغییرات بیان ژن در جدایه‌های منتخب تحت تیمار مس.....  | ۸-۳ -   |
| ۳۳..... | استخراج آر آن آکل.....                                      | ۱-۸-۳ - |
| ۳۳..... | بررسی کمیت و کیفیت RNA استخراج‌شده.....                     | ۲-۸-۳ - |
| ۳۴..... | سنتز DNA مکمل.....                                          | ۳-۸-۳ - |
| ۳۵..... | طراحی آغازگر.....                                           | ۴-۸-۳ - |
| ۳۵..... | واکنش Real time- PCR.....                                   | ۵-۸-۳ - |
| ۳۶..... | تجزیه و تحلیل داده‌های Real time- PCR.....                  | ۶-۸-۳ - |

#### فصل ۴ : نتایج و بحث

|         |                                                                        |
|---------|------------------------------------------------------------------------|
| ۳۸..... | ۱-۴ - جداسازی و خالص‌سازی جدایه‌های قارچی.....                         |
| ۳۹..... | ۲-۴ - زیست‌سنجی جدایه‌ها.....                                          |
| ۴۲..... | ۳-۴ - بررسی رشد قارچ و اثر PH بر رشد قارچ‌ها در محیط مایع.....         |
| ۴۳..... | ۴-۴ - اثر متقابل غلظت و جدایه.....                                     |
| ۴۵..... | ۵-۴ - بررسی ارتباط بین میزان مس موجود در خاک و جمعیت میکروبی.....      |
| ۴۶..... | ۶-۴ - شناسایی مولکولی جدایه‌های قارچی.....                             |
| ۴۹..... | ۷-۴ - اندازه‌گیری میزان مس جذب‌شده توسط میسلیموم قارچ.....             |
| ۵۲..... | ۸-۴ - بررسی تغییرات بیان ژن لاکاز در جدایه‌های منتخب تحت تیمار مس..... |

۹-۴ - بررسی تغییرات بیان ژن متالوتیونین در جدایه‌های منتخب تحت تیمار مس ..... ۵۹

۱۰-۴ - نتیجه گیری کلی ..... ۶۴

## فصل ۵ : منابع

### فهرست اشکال

- شکل ۱-۱ - مکانیسم جذب فلزات سنگین توسط میکروارگانیسم‌ها (Latha et al., 2012) ..... ۴
- شکل ۱-۲ - کلاهک قارچ جنس *Pleurotus* رشد یافته روی تنه درختان (<http://mycoportal.org>) ..... ۲۱
- شکل ۱-۳ - تصاویر محل جمع‌آوری نمونه خاک و پساب از اطرف معدن مس سرچشمه ..... ۲۶
- شکل ۲-۳ - نمونه‌های قارچی آماده شده برای اندازه‌گیری میزان مس جذب شده توسط قارچ ..... ۲۹
- شکل ۳-۳ - بررسی جمعیت میکروبی در نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده در این تحقیق ..... ۳۰
- شکل ۴-۳ - رشد جدایه‌های قارچی منتخب در محیط حاوی ۵۵۰۰ پی‌پی‌ام سولفات مس ..... ۳۲
- شکل ۱-۴ - اثر بازدارندگی از رشد میسلیمی جدایه‌های قارچی روی محیط کشت PDA حاوی غلظت ۵۵۰۰ پی‌پی‌ام سولفات مس در مقایسه با شاهد پس از هفت روز (در هر تصویر به ترتیب از چپ به راست شاهد و دو تکرار تیمار می‌باشد) ..... ۴۱
- شکل ۲-۴ - مقایسه میانگین درصد بازدارندگی از رشد جدایه‌های قارچ تحت تاثیر غلظت ۵۵۰۰ پی‌پی‌ام - ..... ۴۲
- ام سولفات مس ..... ۴۲
- شکل ۳-۴ - بررسی اثر PH بر رشد قارچ‌ها در محیط مایع حاوی غلظت ۵۵۰۰ پی‌پی‌ام سولفات مس. M ..... ۴۳
- جدایه *Macrophomina phaseolina* شاهد آزمایش می‌باشد. ..... ۴۳
- شکل ۴-۴ - مقایسه درصد بازدارندگی از رشد میسلیمی ۴ جدایه تحت تیمار ۵ غلظت سولفات مس ..... ۴۵
- شکل ۵-۴ - میزان مس و جمعیت میکروبی موجود در هر نمونه خاک ..... ۴۶
- شکل ۶-۴ - پرگنه جدایه‌های منتخب رشد یافته روی محیط PDA پس از پنج روز. ..... ۴۷

شکل ۴-۷ - نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌های پلیمرز با استفاده از آغازگرهای ITS1F و ITS4 روی ژل

آگارز ۱/۲ درصد (وزنی/حجمی). M نشانگر یک کیلو جفت بازی (NL-1411 VIVANTIS)، NC کنترل

منفی می‌باشد..... ۴۸

شکل ۴-۸ - رابطه فیلوژنتیکی جدایه S3-21 با استفاده از نرم افزار MRBAYS بر اساس توالی

ناحیه IT ..... ۴۸

شکل ۴-۹ - رابطه فیلوژنتیکی جدایه‌های S3-1 و S1-7 با استفاده از روش گروه‌بندی Neighbor-

Joining بر اساس توالی ناحیه ITS..... ۴۹

شکل ۴-۱۰ - تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) جدایه‌ها با بزرگنمایی  $\times 5000$ . جدایه S1-7

رشد یافته در محیط مایع حاوی ۵۵۰۰ پی‌پی‌ام سولفات مس پس از هفت روز (الف)، جدایه S1-7 رشد

یافته در محیط مایع بدون سولفات مس (ب)، جدایه S3-21 رشد یافته در محیط مایع حاوی ۵۵۰۰ پی-

پی‌ام سولفات مس پس از هفت روز (ج)، جدایه S3-21 رشد یافته در محیط مایع بدون سولفات مس

(د)..... ۵۱

شکل ۴-۱۱ - آنالیز EDS نقطه ای جدایه‌ها. جدایه S1-7 رشد یافته در محیط مایع حاوی ۵۵۰۰

پی‌پی‌ام سولفات مس پس از هفت روز (الف)، جدایه S1-7 رشد یافته در محیط مایع بدون سولفات

مس (ب)، جدایه S3-21 رشد یافته در محیط مایع حاوی ۵۵۰۰ پی‌پی‌ام سولفات مس پس از هفت

روز (ج)، جدایه S3-21 رشد یافته در محیط مایع بدون سولفات مس (د)..... ۵۲

شکل ۴-۱۲ - نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمرز DNA مکمل با استفاده از آغازگر ژن اکتین روی ژل آگارز

۱/۵ درصد (وزنی/حجمی). M نشانگر ۱۰۰ جفت بازی، لاین‌های ۱ تا ۴ مربوط نمونه DNA مکمل و لاین

N کنترل منفی شامل آب مقطر می‌باشد..... ۵۳

شکل ۴-۱۳ - تجزیه و تحلیل منحنی ذوب ژن‌های لاکاز (الف)، اکتین (ب)..... ۵۴

- شکل ۴-۱۴ - تغییرات بیان ژن لاکاز در جدایه S3-1 (الف) و S1-7 (ب) و S3-21 (ج). برای نرمال کردن داده‌ها از ژن اکتین استفاده شد. \* نشان دهنده افزایش بیان ژن لاکاز در تیمار در مقایسه با روز ششم می‌باشد. ۵۸.....
- شکل ۴-۱۵ - نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمراز DNA مکمل با استفاده از آغازگر ژن متالوتیونین روی ژل آگارز ۱/۵ درصد (وزنی/ حجمی). M نشانگر ۱۰۰ جفت بازی، لاین‌های ۱ تا ۴ مربوط نمونه DNA مکمل می‌باشد. ۵۹.....
- شکل ۴-۱۶ - تجزیه و تحلیل منحنی ذوب ژن‌های متالوتیونین (الف)، اکتین (ب). ۶۰.....
- شکل ۴-۱۷ - تغییرات بیان ژن متالوتیونین در جدایه S3-1 (الف) و S1-7 (ب) و S3-21 (ج). برای نرمال کردن داده‌ها از ژن اکتین استفاده شد. \* نشان دهنده افزایش بیان ژن متالوتیونین در تیمار در مقایسه با روز ششم می‌باشد. ۶۳.....

### فهرست جداول

- جدول ۳-۱ - فهرست و توالی آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق ..... ۳۱
- جدول ۳-۲ - ترکیبات واکنش ساخت رشته اول DNA مکمل ..... ۳۴
- جدول ۳-۳ - مشخصات آغازگرهای مورد استفاده جهت بررسی تغییرات بیان ژن ..... ۳۵
- جدول ۳-۴ - اجزاء مخلوط واکنش real-time PCR ..... ۳۶
- جدول ۳-۵ - برنامه دمایی real-time PCR ..... ۳۶
- جدول ۴-۱ - فهرست جدایه‌های قارچ جداسازی و خالص‌سازی شده در این تحقیق ..... ۳۸
- جدول ۴-۲ - تجزیه واریانس بازدارندگی از رشد جدایه‌های مختلف قارچ تحت تیمار ۵۵۰۰ پی‌پی‌ام سولفات مس ..... ۴۰
- جدول ۴-۳ - جدول تجزیه واریانس بازدارندگی از رشد ۴ جدایه تحت تیمار ۵ غلظت مختلف سولفات مس ..... ۴۴

جدول ۴-۴- مقادیر مس جذب شده در نمونه‌های تیمار شده با غلظت ۵۵۰۰ پی‌پی‌ام سولفات مس و

شاهد..... ۵۰

جدول ۴-۵- جدول تجزیه واریانس داده‌های بیان ژن لاکاز در ۳ جدایه تحت تیمار ۵۵۰۰ پی‌پی‌ام

سولفات مس در زمان‌های مختلف..... ۵۵

جدول ۴-۶- جدول تجزیه واریانس داده‌های بیان ژن متالوتیونین در ۳ جدایه تحت تیمار ۵۵۰۰ پی‌پی‌ام

سولفات مس در زمان‌های مختلف..... ۶۰

# فصل اول

## مقدمه

یکی از بزرگترین مشکلات جوامع بشری در قرن بیست و یکم آلودگی‌های محیطی است. از مهمترین این آلوده‌کننده‌ها فلزات سنگین هستند که مقدار آن‌ها در محیط با توجه به استخراج روز افزون آن‌ها در حال افزایش است. فلزات سنگین با ورود به محیط وارد چرخه‌ای می‌شوند که طی آن بین محیط و موجودات زنده مورد تبادل قرار می‌گیرند و اثرات سمی بر موجودات زنده می‌گذارند. تجمع زیستی در هر مرحله از زنجیره غذایی می‌تواند اتفاق بیفتد، این مشکل به خصوص برای انسان به عنوان مصرف کننده نهایی از اهمیت خاصی برخوردار است. اگر تجمع زیستی در یکی از اندام‌های بدن انسان اتفاق بیفتد، علائم زیان‌آور مختلفی مثل علائم گوارشی، عصبی و ایمنولوژیکی بروز پیدا می‌کنند. مواجهه طولانی مدت انسان با فلزات سنگین ممکن است منجر به آسیب به عملکرد عصب مرکزی، ریه، کبد و سایر اندام‌های حیاتی شود (González *et al.*, 2014).

از آنجا که این فلزات تجزیه پذیر نیستند، تنها راه پاکسازی آن‌ها خارج کردن آن‌ها از محیط و بازیابی و استفاده مجدد از آن‌ها در صورت امکان است (Chojnacka, 2010). فلزات سنگین اصلی شامل کادمیم (Cd)، منگنز (Mn)، آهن (Fe)، کبالت (Co)، نیکل (Ni)، کروم (Cr)، مس (Cu)، روی (Zn)، مولیبدن (Mo)، سرب (Pb)، فلزات گرانبها طلا (Au)، نقره (Ag) و شبه فلزات آرسنیک (As)، سلنیوم (Se) و آنتیموان (Sb) هستند. در طبیعت این فلزات اغلب در محلول‌های آبی به اشکال کاتیونی یا آنیون‌های اکسید شده، وجود دارند و یا به صورت نمک‌ها یا اکسیدها به شکل کریستالی یا بی‌شکل در رسوبات نامحلول دیده می‌شوند (Ehrlich, 1997).

فلزات سنگین (<sup>1</sup>HM) اصطلاحی عمومی است برای گروه ناهماهنگی از عناصر از جمله فلزات و شبه فلزات و فلزات غیر آهنی که در غلظت‌های بالا برای تمام اجزای زیستی یک اکوسیستم مضر شناخته شده‌است. ویژگی مشترک میان این عناصر داشتن وزن مخصوص بیش از ۵ gcm<sup>-3</sup> یا عدد اتمی بزرگتر از ۲۰ می‌باشد

---

<sup>1</sup> Heavy metals (HM)

(Malavolta, 1994). بعضی از عناصر مانند سزیم (Ce)، توریم (Th)، سرب (Pb)، پلاتینیوم (Pt) و اورانیوم (U) نیز رادیو اکتیو هستند که خطر آلودگی و شدت آسیب را افزایش می دهند (Galvão & Corey, 1987).

فلزات سنگین سمی هستند به خصوص وقتی که به دلیل فعالیت‌های انسانی مانند متالوژی و استخراج به محیط وارد می‌شوند (Peligro *et al.*, 2016). حذف این آلاینده‌ها به یک نگرانی در سراسر جهان تبدیل شده است، زیرا نمی‌توان آن‌ها را به اشکال غیر سمی تقلیل داد چرا که باعث اثرات گسترده‌ای در اکوسیستم‌ها می‌شود (Dixit *et al.*, 2015). سمیت فلزات سنگین با تجمع زیستی آن‌ها ارتباط دارد. فلزات سنگین علیرغم اهمیت فیزیولوژیکی در غلظت‌های مشخصی مورد نیاز هستند و در غلظت‌های بالاتر از آن حالت سمی به خود می‌گیرند. به صورت یون‌های فلزی که عملکرد فیزیولوژیکی ندارند، نیز در غلظت‌های فراتر از حد تحمل میکروب‌ها حالت سمی به خود می‌گیرند. فلزاتی مانند سرب، کادمیم و جیوه ممکن است از طریق جایگزینی فلزات عملکردی به طور غیر مستقیم موجب القای تنش اکسیداتیو شوند (Avery, 2001).

این فلزات نقش‌های مختلفی در فرآیندهای زیستی میکروارگانیسم‌ها ایفا می‌کنند. بعضی فلزات مثل کلسیم، کبالت، کروم، مس، آهن، پتاسیم، منیزیم، منگنز، سدیم، نیکل و روی ضروری بوده و ریز مغذی محسوب می‌شوند. همچنین این فلزات در فرآیندهای اکسایش- کاهش در پایدارسازی مولکول‌ها از طریق برهمکنش- های الکتروستاتیک در ساختمان آنزیم‌های مختلف و در تنظیم فشار اسمزی نقش دارند. برخی فلزات دیگر مانند نقره، آلومینیوم، کادمیوم، طلا، سرب و جیوه نقش زیستی خاصی ندارند و عناصری غیرضروری هستند و می‌توانند برای میکروب‌ها مضر باشند (Bruins *et al.*, 2000). فلزات سنگین به طرق مختلفی عمل می‌کنند، اتصال آن‌ها به انواع ترکیبات آلی می‌تواند سبب دگرساختی<sup>1</sup> پروتئین‌ها، بهم‌ریختن غشاهای سلولی و تجزیه متابولیت‌های ضروری شود. بسیاری از آن‌ها هم‌قادرند به‌عنوان آنتی‌متابولیت در مقابل برخی ترکیبات غذایی ضروری عمل کنند. از عوامل دیگر موثر بر سمیت یک فلز سنگین وجود آنیون و کاتیون‌های دیگر می‌باشد. کاتیون‌های دو ظرفیتی مانند کلسیم با رقابت در سیستم‌های جذب فلزات و آنیون‌ها با تشکیل کمپلکس‌هایی

---

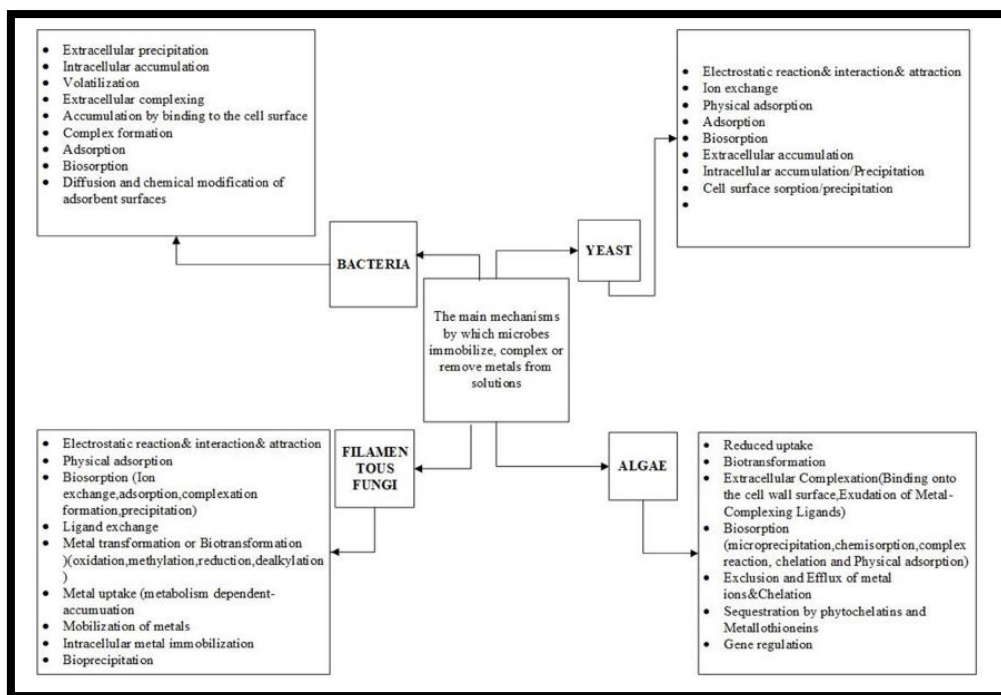
<sup>1</sup> Denaturation



مانند کلرید و یا تشکیل ترکیبات نامحلول مانند سولفیدها، کربنات‌ها و فسفات‌ها عمل می‌کنند (Gadd, 2010).

اکثر فلزات برای ایفای نقش سمی یا زیستی خود نیازمند ورود به سلول هستند. در نظر اول فلزات سنگین دو ظرفیتی ساختاری شبیه به هم دارند. کاتیون‌های دو ظرفیتی مثل  $Mn^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  و  $Zn^{2+}$  همگی دارای دو بار مثبت هستند. اکسی آنیون‌هایی مثل کرومات و سولفات که هر یک ۴ اتم اکسیژن در اطراف خود دارند و دارای دو بار منفی هستند نیز به یکدیگر بسیار شبیه هستند. بنابراین سیستم‌های دریافت یون در میکروارگانیسم‌ها باید به گونه‌ی اختصاصی و محکم به این یون‌ها متصل شوند تا بتوانند یون اختصاصی مورد نظر را جذب کنند (حسنی، ۱۳۹۰).

در طی سالیان گذشته روش‌های مختلف فیزیکی و شیمیایی مانند اسمز معکوس، دیالیز، اشعه گاما، اولترا فیلتراسیون، رسوب لخته‌ای، استخراج حلال، اکسیداسیون (توسط ازن و پراکسید هیدروژن)، هیدرولیز، الکترولیز، تیمار کروم و کروماتوگرافی برای پاکسازی فلزات سنگین مورد بررسی و آزمایش قرار گرفته‌اند، اما اکثر آن‌ها مشکل، پر خطر، پیچیده، ناکامل، گران و انرژی‌بر هستند (González *et al.*, 2014). بنابراین جستجو برای یافتن تکنولوژی جدید و کارآمد برای حذف فلزات سنگین به سمت یک رویکرد بیولوژیکی با استفاده از میکروارگانیسم‌ها هدایت شده‌است (Das *et al.*, 2008). میکروارگانیسم‌ها دارای ظرفیت‌های ژنتیکی و بیوشیمیایی برای اصلاح طبیعی آلودگی‌های ایجاد شده توسط فلزات سنگین، از طریق جذب، تجمع و تبدیل فلزات سنگین، می‌باشند (Dixit *et al.*, 2015). میکروارگانیسم‌ها توانایی رشد در شرایط تنش‌زا مانند بالا و پایین بودن درجه حرارت و pH، محدود بودن دسترسی به مواد مغذی، خشکسالی، آلاینده‌های شیمیایی و غیره را دارند. از میکروارگانیسم‌هایی مانند جلبک‌ها، باکتری‌ها، مخمرها، قارچ‌ها به‌طور گسترده برای حذف فلزات سنگین استفاده شده‌است (Edris *et al.*, 2014). این میکروارگانیسم‌ها برای مقابله با عواقب زیان بار مواجه با فلزات/ متالوئیدها استراتژی‌های کاملاً موثری ارائه داده‌اند (شکل ۱-۱).



شکل ۱-۱ - مکانیسم جذب فلزات سنگین توسط میکروارگانیسم‌ها (Latha et al., 2012)

برخی از قارچ‌های مقاوم در برابر مس، اغزلات تولید می‌کنند و فلز را به شکل کریستال‌های اغزلات مس رسوب می‌دهند (Zhao et al., 2020). تشکیل  $H_2S$  در مخمرها همچنین می‌تواند منجر به رسوب مس در دیواره سلول و اطراف آن شود (Sun et al., 2020). در مورد اهمیت تشکیل  $H_2S$  به عنوان یک مکانیسم مقاومتی در مقابل مس تردید وجود دارد. تحمل مس در مخمرها با افزایش مقدار سوپراکسید دیسموتاز، آنزیمی که از مس به عنوان یک کوفاکتور غیرآلی استفاده می‌کند، ارتباط دارد. این یافته‌ها با مشاهده افزایش سطح mRNA سوپراکسید دیسموتاز در تیمارهای حاوی مس ثابت شد (Montllor-Albalade et al., 2019). مقاومت در برابر مس در *Phycomyces blakesleeanus* با تغییر میزان تنفس و تغییرات ریخت‌شناسی و قابلیت زنده‌مانی اسپورها همراه بود. این تفسیر توسط دانشمندان با بررسی *Neurospora crassa* (Subramanyam & Gupta, 1986) و *Cunninghamella blakesleana* (Venkateswerlu & Stotzky, 1986) تایید شد که نشان‌دهنده آسیب میتوکندری پس از کشت سلول‌ها در محلول‌های سمی مس است (Arнау et al., 1990). مطالعات در زمینه‌ی مولکولی سمیت فلزات و متالوئیدها در یوکاریوت‌ها تا حد زیادی

از تجزیه و تحلیل گسترده ژنوم، ترانسکریپتوم، پروتئوم، اینتراکتوم و متابولوم، مخمر نان ناشی می‌شود. مخمر نان، *Saccharomyces cerevisiae*، یک میکروارگانیسم مدل عالی برای پرداختن به سوالات مهم زیست-شناسی است، زیرا ابزارهای بیولوژیکی، ژنتیکی و بیوانفورماتیک موجود، ابزارهای فوق‌العاده پیچیده برای این *Saccharomycetes* هستند (Tamás *et al.*, 2005).

مطالعات نشان داد که در رسوبات ساحلی به شدت آلوده، جمعیت میکروبی باکتریایی اعماق دریا به طور قابل توجهی با غلظت فلزات سنگین ارتباط دارد (Quero *et al.*, 2015)، که این نشان از ارتباط تنگاتنگ عملکرد پروکاریوت‌ها و نوع و غلظت فلزات سنگین است. در محیط‌های آلوده به فلزات سنگین، جمعیت میکروبی با غلظت‌های سمی فلزات سنگین سازگار و مقاوم می‌شوند. لذا آن‌ها منبع خوبی برای جداسازی می‌باشند (Khan *et al.*, 2019; Tu *et al.*, 2018; Yan & Viraraghavan, 2003). اگرچه قارچ‌ها توده زیستی زنده و غالب خاک می‌باشند (Hoshino & Morimoto, 2008)، اما بطور گسترده برای زیست پالایی آلودگی‌های ناشی از فلزات در محیط خاک مورد مطالعه قرار نگرفته‌اند (Harms *et al.*, 2011). قارچ‌ها نسبت به باکتری‌ها برای زیست پالایی خاک‌های آلوده برتری دارند که به دلیل توده زیستی آن‌ها، شبکه هیفی و چرخه زندگی آن‌ها می‌باشد. همچنین قارچ‌های متحمل به فلزات می‌توانند با باکتری‌های موجود در شرایط آنتاگونیستی رقابت کنند (Sun *et al.*, 2012). قابلیت متابولیسم وسیع‌تر قارچ‌ها، کاربرد گسترده آن‌ها در زیست پالایی آلودگی‌های مختلف را فراهم می‌نماید (Singh *et al.*, 2015). با توجه به اهمیت قارچ‌ها به عنوان میکروارگانیسم غالب خاک و اینکه در ارتباط با قارچ‌های خاکزی متحمل به آلودگی‌های ناشی از فلزات به منظور استفاده در زیست پالایی تحقیق گسترده صورت نگرفته‌است، لذا تحقیق حاضر با اهداف زیر انجام گردید؛

- شناسایی قارچ‌های خاکزی سازگار یافته با شرایط آلودگی محیط به یون مس
- تعیین غلظت قابل تحمل مس در قارچ‌های غالب جداسازی شده
- بررسی تغییرات بیان برخی از ژن‌های دخیل در سازگاری قارچ با محیط حاوی فلز مس

## فصل دوم

### بررسی منابع

اصطلاح جذب زیستی در برگیرنده فرآیندهای جذب<sup>۲</sup> (جذب یون‌های با بار مثبت به لیگاندهایی با بار منفی در ترکیبات سلولی) می‌باشد. بطور کلی پدیده جذب شامل کشش‌های الکتریکی، جاذبه‌های واندروالسی یا جاذبه شیمیایی محلول به فاز جذب شونده است. کشش‌های الکتریکی به تبادل یونی مربوط است و اغلب جذب تبادلی نامیده می‌شود که به طور وسیعی در توده‌های سلولی انجام می‌شود. جذب به وسیله نیروهای واندروالسی اغلب جذب ایده‌آل یا فیزیکی نامیده می‌شود. در این نوع جذب، مولکول جذب شده می‌تواند حرکتی آزادانه داشته باشد. جاذبه شیمیایی بین ماده جذب شده و فاز جذب‌کننده، جذب شیمیایی یا فعال نامیده می‌شود. البته تمایز میان جذب فیزیکی و شیمیایی مشکل است و عمدتاً پدیده جذب، ترکیبی در نظر گرفته می‌شود. بنابراین برای برطرف شدن مشکل در تعریف، محققین اصطلاح جذب زیستی را به کار می‌برند (Gaur et al., 2014).

## ۲-۲- جذب بیولوژیکی فلزات سنگین توسط زیست توده زنده و زیست توده غیر فعال

در سال‌های اخیر جذب بیولوژیکی فلزات سنگین توسط زیست توده قارچی مورد توجه ویژه قرار گرفته‌است. چندین گزارش نشان داده‌است میسلیموم جنس‌هایی مانند *Mucor*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Piriformospora*, *Trichoderma*, *Penicillium* و غیره ظرفیت جذب بیولوژیکی حذف فلزات سنگین را دارند (Viraraghavan & Srinivasan, 2011; Yaghoubian et al., 2019).

مکانیسم‌های بیولوژیکی که در بقای قارچ نقش دارند شامل؛ رسوب خارج سلولی، پیچیدگی و تبلور، تبدیل فلزات، جذب بیولوژیکی به دیواره سلولی و رنگدانه‌ها، کاهش تبادل یا نفوذ ناپذیری، محفظه داخل سلولی است (Wahab et al., 2017). بررسی‌ها نشان داده‌است که دیواره هیف‌ها محل اصلی تجمع فلزات سنگین است. همچنین گزارش شده‌است که سازگاری قارچ‌ها با فلزات سنگین منجر به تغییراتی در سطح سلول هیف‌ها می‌شود (Ge et al., 2011). تجمع را می‌توان به گروه‌های شیمیایی مختلف مانند گروه استامید از

<sup>1</sup> Biosorption

<sup>2</sup> Absorption

کیتین، گروه‌های آمینو و فسفات در اسید نوکلئیک‌ها، آمین و آمید و گروه‌های سولفیدریل و کربوکسیل در پروتئین‌ها و هیدروکسیل در پلی ساکاریدها نسبت داد. این گروه‌ها می‌توانند یون‌های فلزی را جذب کنند (Baik *et al.*, 2002). برخی از قارچ‌های رشته‌ای برای حذف فلزات سنگین از زیست توده غیرفعال شده، استفاده می‌کنند. جذب بیولوژیکی با استفاده از زیست توده میکروبی مرده فقط یک فرآیند جذب غیرفعال محدود در سطح است، اما این مزیت را دارد که پس از بدست آوردن زیست توده نیازی به نگهداری و تغذیه نیست. از طرف دیگر، استفاده از سلول‌های زنده نیز می‌تواند سودمند باشد چراکه دارای متابولیسم داخلی مقاومت به فلز هستند. مکانیسم‌هایی مانند سم‌زدایی فلز و تجمع زیستی با رشد پایدار سلول می‌تواند جذب فلز را افزایش دهد (Chen & Cutright, 2003; Malik, 2004). گزارش‌های زیادی در مورد استفاده از زیست توده زنده و غیرفعال وجود دارد. در تحقیقی از گونه *Mucor rouxii* برای حذف Pb (II) استفاده شد و نتایج نشان داد که زیست توده زنده قادر به حذف ۳۵/۶۹ درصد از فلز است و زیست توده غیرفعال ۲۵/۲۲ درصد از فلز را حذف می‌نماید. همچنین Zn (II) نیز توسط زیست توده غیرفعال و فعال این گونه قارچی به ترتیب به میزان ۱۶/۶۲ درصد و ۱۱/۰۹ درصد حذف شد (Yan & Viraraghavan, 2003).

رفیوآفولو و همکاران (۲۰۰۶) از قارچ *Aspergillus niger* برای حذف Pb (II) استفاده کردند و توانستند ۷۹/۴ درصد از فلز را با زیست توده زنده و ۲۸/۹ درصد را با زیست توده غیرفعال حذف کنند (Awofolu *et al.*, 2006). این نشان می‌دهد که حذف فلزات سنگین توسط زیست توده زنده یا غیرفعال بسته به نوع فلز مورد نظر متفاوت است. یافته‌ها محققین را تشویق کرد تا زیست توده زنده و غیرفعال را مورد آزمایش بیشتری قرار دهند و داده‌های کافی برای استفاده بهینه طی فرآیند جذب، بدست آورند. با این وجود حتی بسیاری از مطالعاتی که در مورد استفاده از زیست توده قارچ انجام شده است هنوز در سطح پایه است و چشم اندازهای کاربردی محدود است (Gomes *et al.*, 2014).

## ۲-۳- تاثیر عوامل خارجی در جذب بیولوژیکی فلزات سنگین

تاثیر عوامل خارجی بر رشد بهینه میکروبی و بازیابی<sup>۱</sup> فلزات با استفاده از زیست توده زنده موضوع مهمی است که به منظور افزایش جذب زیستی فلز مورد توجه قرار می گیرد (Contreras-Cortés *et al.*, 2020). pH به عنوان یکی از مهمترین شاخص ها برای اهداف جذب بیولوژیکی فلزات سنگین شناسایی شده است و به طور مستقیم با توانایی رقابت یون های هیدروژن در فعال کردن محل ها برای جذب سطحی مرتبط می شود (Lodeiro *et al.*, 2006). در یک بررسی در ارتباط با یون مس مشخص شد، pH اسیدی باعث افزایش محل های فعال می شود و میزان جذب را افزایش می دهد و منجر به افزایش جذب زیستی  $Cu^{2+}$  می شود (Chia *et al.*, 2010).

دما در فرآیند جذب تاثیر بی نظیری دارد و می تواند باعث یونیزاسیون بخش های شیمیایی شود و بر پایداری و شکل دیواره سلول تاثیر گذارد. مکان های اتصال در قارچ های جدا شده ممکن است به طور همزمان تحت تاثیر دما قرار بگیرند و باعث کاهش حذف فلزات سنگین به ویژه هنگام کار با زیست توده زنده شوند. بنابراین این شاخص باید هنگام برنامه ریزی فرآیند جذب ارزیابی شود تا بهترین دما برای میکروارگانیسم های مورد استفاده، انتخاب شود. از طرف دیگر با استفاده از زیست توده غیر فعال فرآیند حذف فلزات سنگین عمدتاً از نظر فیزیکی و شیمیایی انجام می شود که در این حالت تاثیر دما بر مکانیسم های وابسته به انرژی بسیار ناچیز است (Bayramoğlu *et al.*, 2003).

در تحقیقی قارچ های بومی متحمل به فلز مس از رسوبات رودخانه San Pedro در کشور مکزیک جداسازی و توانایی آن ها برای حذف مس مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق ظرفیت جذب بیولوژیکی با استفاده از زیست توده زنده و مرده قارچ در محیط جامد بررسی شد. شرایط بهینه دما و pH برای هر دو نوع رشد قارچ و حداکثر جذب مس مورد مطالعه قرار گرفت (Gomes *et al.*, 2014). تجزیه و تحلیل زنده مانگی و اجزای سلولی توسط میکروسکوپ فلورسانس پس از قرار گرفتن در معرض  $Cu^{2+}$ ، حضور سلول های زنده در تمام تیمارها را نشان داد. با این حال، مقدار بالاتری از سلول های غیرزنده در غلظت ۲۵۰ پی پی ام از  $Cu^{2+}$  تشخیص داده شد،

<sup>1</sup> Recovery

که نشان می‌دهد غلظت زیاد مس مانع زنده ماندن قارچ و در نتیجه توانایی آن در حذف مس می‌شود (Contreras-Cortés *et al.*, 2020).

مطالعات نشان داده‌است که مس به طور مستقیم در متابولیسم میکروبی شرکت می‌کند و به عنوان یک فلز ضروری برای فعالیت چندین آنزیم دخیل در تنش اکسیداتیو از جمله کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز عمل می‌کند. مس را می‌توان در زمره بسیاری از متالوآنزیم‌ها و متابولیسم کربوهیدرات‌ها گنجانید (Cervantes & Gutierrez-Corona, 1994). اضافه‌شدن مس می‌تواند منجر به افزایش متابولیسم قارچ‌ها شود تا آن‌ها در غلظت‌های خاصی از  $\text{CuSO}_4$  زنده بمانند (Contreras-Cortés *et al.*, 2020). برخی محققین طیف تحمل مس را در حدود ۱۰ تا ۳۰۰ پی‌پی‌ام برای قارچ‌های *Aspergillus sp.*، *Phanerochaeta chrysosporium* و *Funalia trogii* گزارش کرده‌اند (Kahraman *et al.*, 2005; Sing & Yu, 1998).

وانگ و همکاران (۲۰۱۸) از چندین جدایه قارچی شامل جنس‌های *Xylaria* و *Nigrospora*، *Diaporthe* استفاده کردند و میزان تحمل یون  $\text{Cu}^{2+}$  را در حدود ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام گزارش کردند. همچنین نتایج این محققین نشان‌داد که تحمل فلزات سنگین در گونه‌های مختلف، متفاوت است و به گونه مورد استفاده بستگی دارد (Wong *et al.*, 2018). مطالعات نشان‌داد که سازگاری قارچ *Aspergillus australensis* به مس ( $\text{CuSO}_4$ ) می‌تواند توسط ژن مسوول تولید پروتئین متالوتیونین که مسوول اتصال فلزات مختلف است، کنترل شود (Dameron & Harrison, 1998). علاوه بر متالوتیونین‌ها سایر اجزا مانند فیتوکلانتین<sup>۱</sup> و سوپر اکسید دیسموتاز نیز می‌توانند در اتصال فلزات شرکت کنند (Price *et al.*, 2001).

#### ۲-۴- مکانیسم میکروارگانیس‌ها برای جذب فلز

دو مکانیسم اصلی بدن‌بال جذب فلز وجود دارد که عبارتند از: جذب بیولوژیکی که یک فرآیند فیزیوشیمیایی می‌باشد و در آن یون‌های فلزی در سطح دیواره قارچ‌ها ثابت می‌شوند و با گروه‌های عملکردی تعامل برقرار می‌کند (Akinkunmi *et al.*, 2016). اتصال یون‌های فلزی به سطح خارجی سلول با مکانیسم‌هایی مانند

---

<sup>1</sup> Phytochelatin



تبادل یونی و انتقال بیولوژیکی از طریق تجمعات و رسوب یون‌های فلزی امکانپذیر است (Farooq *et al.*, 2010). جذب زیستی بستگی زیادی به حالت شیمیایی دیواره سلول، حالت یونیزاسیون یون‌های فلزی و پیوستگی یون‌های فلزی و گروه‌های شیمیایی موجود در دیواره سلول دارد (Baltazar *et al.*, 2019). دومین مکانیسمی که می‌تواند رخ دهد، تجمع زیستی است که فقط توسط سلول‌های زنده انجام می‌شود. این فرآیند در مرحله اول شامل فرآیند جذب انرژی است و پس از آن یون‌های فلزی به غشای سلول نفوذ می‌کنند و وقتی که در داخل سلول قرار گیرد در اندامک‌ها تجمع می‌یابد. این فرآیند کاملاً به متابولیسم سلول وابسته است و مربوط به انتقال و انباشته‌شدن فلز است (Abbas *et al.*, 2014). در این حالت pH، باعث افزایش محل‌های فعال می‌شود و میزان جذب را افزایش می‌دهد (Chia-Chay *et al.*, 2010).

## ۲-۵- انتقال مس در میکروارگانیسم‌ها

باتوجه به نقش دو گانه مس (ضروری بودن / سمیت)، میکروارگانیسم‌ها باید مکانیسم‌های حساسی برای نگهداری مس درون سلول در چنین سطح محدودی را داشته باشند که با هموستازی فلز طبیعی تداخل نداشته‌باشد و خطر سمیت نیز ایجاد نکند. اطلاعات کمی در مورد انتقال مس در میکروارگانیسم‌ها گزارش شده‌است که تا حدی به دلیل نداشتن رادیوایزوتوپ مناسب از فلز است (Cervantes & Gutierrez-Corona, 1994). مس و ترکیبات حاوی مس به طور گسترده به عنوان باکتری کش (Cooksey, 1990)، قارچ کش، افزودنی‌های غذایی دامپزشکی، مواد ضد باکتری گیاهی و محافظت کننده مواد طبیعی و ساخته شده توسط بشر استفاده می‌شود. مقادیر بالای مس به‌طور کلی یک فشار خاص بر میکروارگانیسم‌ها وارد می‌کند که ممکن است منجر به پیدایش انواع مقاوم با منشا ژنتیکی مقاومت به مس گردد (Ashida, 1965; Trevors, 1987). مسمومیت مس عمدتاً به دلیل فعل و انفعالات آن با اسید نوکلئیک، تغییر مکان‌های فعال آنزیم و اکسیداسیون اجزای غشا است (Lippert, 1992)، همچنین فرآیندهایی که می‌توانند به توانایی مس در تولید مواد آزاد سمی هیدروکسیل مرتبط باشند (Kobayashi *et al.*, 1990; Simpson *et al.*, 1988). از طرف دیگر کمپلکس مس به صورت ارگانیک برای میکروارگانیسم‌ها نسبتاً غیرسمی است (Zevenhuizen *et al.*, 1979).

وجود غلظت‌های بالای یون مس در محیط باعث افزایش انتخاب میکروارگانیسم‌های دارای شاخص‌های ژنتیکی برای مقاومت در برابر مس می‌شود. چندین نمونه از کروموزوم و پلاسمید در باکتری‌ها گزارش شده‌است و مکانیسم‌های مولکولی شناسایی شده‌اند. مکانیسم‌های باکتریایی مقاومت به مس مربوط به کاهش انتقال و جابجایی مس، افزایش جریان یون‌های فلزی یا کمپلکس مس یا تجمع مس توسط اجزای سلول می‌شود (Cervantes & Gutierrez-Corona, 1994). بررسی‌ها نشان داد، وقتی کشت در حضور مس انجام‌شود در دیواره‌های سلولی قارچ‌های *Penicillium italicum* (Somers, 1963)، *P. ochro-chloron* (Fukami et al., 1983)، *Neurospora crassa* (Somers, 1963; Subramanyam et al., 1983)، *Aureobasidium pullulans* (Gadd, 1984) و *Mucor rouxii* فلز ذخیره می‌شود (Cervantes & Gutierrez-Corona, 1994). همچنین در جدایه‌های مقاوم به مس قارچ‌های *Rhizopus stolonifer*، *Cunninghamella blakesleeana* (Garcia-toledo et al., 1985) و *M. rouxii* مس به میزان قابل توجهی بیشتر از جدایه‌های والدی حساس به مس به توده میسلیومی متصل می‌شود (Cervantes & Gutierrez-Corona, 1994).

در تحقیقی یک جدایه‌ی مقام به مس از قارچ *Mucor rouxii* در حضور غلظت کم فلز ( $1/6 \mu\text{M}$ ) کشت شد و نتایج نشان داد که در مقایسه با جدایه والد حساس به فلز، مقدار مس ۱۰ برابر بیشتر در بخش دیواره سلول و در نقاطی از سیتوزول و غشا جمع شده‌است. در حالی که در حضور غلظت بالاتر مس ( $3/2 \mu\text{M}$ )، اختلاف در تجمع فلز به مقدار ۵۰ درصد در بخش دیواره سلول کاهش یافت. اما در سیتوزول / غشا جدایه مقاوم کاهش نداشت (Cervantes & Gutierrez-Corona, 1994)، که نشان‌دهنده نقش دیواره در ایجاد مقاومت در برابر مس است (Gadd, Chudek, et al., 1984; Garcia-toledo et al., 1985). با این حال به نظر می‌رسد که در قارچ *M. rouxii* اجزای سیتوزولی و یا ترکیبات غشایی در فرآیند تحمل فلز نیز مشارکت داشته‌باشند (Cervantes & Gutierrez-Corona, 1994).

ترکیبات دیواره سلولی قارچ‌ها مانند پلی ساکاریدهای کیتوزان و کیتین در حذف فلزات به ویژه اورانیوم مفید هستند (Galun et al., 1983; Muzzarelli, 1985). در قارچ‌هایی مانند *Cunninghamella blakesleeana*، *Mucor rouxii* و *Rhizopus stolonifer* مقدار قابل توجهی کیتوزان در لایه‌های خارجی دیواره سلول‌های

رویشی وجود دارد (Tokunaga & Bartnicki-Garcia, 1971). هنگامی که در حضور غلظت سمی مس کشت انجام می‌شود، دیواره سلولی *C. blakesleeana* حاوی مقادیر کمتری کیتوزان و کیتین و نسبت بالاتری از پروتئین غنی از هیدروکسی پرولین در مقایسه با سلول‌های شاهد است. تغییرات در دیواره سلول‌های قارچی با کشت در حضور مس ممکن است در سطح ساختاری منعکس شود (Venkateswerlu & Stotzky, 1986). برای مثال مشاهده شد که یک سویه‌ی مقاوم به مس *Trichoderma viride* هنگامی که در غلظت سمی مس کشت شود، دیواره سلولی حدود پنج برابر ضخیم‌تر می‌شود (Cervantes & Gutierrez-Corona, 1994).

جذب مس وابسته به انرژی معمولاً با سرعت کمتری نسبت به اتصال سطحی فلز انجام می‌شود، که می‌تواند توسط دمای پایین، pH اسیدی و اتصال دهنده‌های متابولیکی مهار شود (Gadd, 2008). اندازه‌گیری انتقال مس در قارچ‌های رشته‌ای با اتصال بالای فلز به دیواره‌های سلولی پیچیده است. با این حال میزان جذب مس وابسته به انرژی در پروتوپلاست قارچ‌های *Penicillium ochro-chloron* مقاوم به مس و در چند شکل از قارچ‌های *Aurcobasidium pullulans* گزارش شده است. قارچ *A. pullulans* و مخمر *Saccharomyces cerevisiae* از جنبه‌های مختلف انتقال مس شبیه به یکدیگر هستند، اما با مخمر *Candida utilis* تفاوت دارند (Ross & Parkin, 1989). در دو گونه‌ی *S. cerevisiae* و *A. pullulans* جذب مس کمتری نسبت به *Candida utilis* وجود دارد، زیرا در این مخمر فرآیند توسط کاتیون‌های دیگر مهار نمی‌شود (Ross & Parkin, 1989). مطالعات زیادی ارتباط بین تحمل مس و تغییر میزان جذب فلز را نشان دادند (Gadd, 2010). درسویه‌های مخمر مقاوم به مس، کاهش ورود مس، کادمیوم و لیتیوم به سلول مشاهده شده است (Gadd, 2010). همچنین گزارش شده است که در یک سویه مقاوم به مس از *A. pullulans* جذب مس در مقایسه با سویه حساس کاهش یافته است (Gadd & Griffiths, 1980). با استفاده از بررسی پروتوپلاست‌ها نشان دادند که کاهش جذب مس توسط یک سویه مقاوم به مس به دلیل تغییر در ویژگی تبادل غشا به جای تغییر در نفوذپذیری دیواره سلول بوده است (Gadd, Stewart, et al., 1984).

باکتری‌ها و قارچ‌ها برای زنده ماندن در حضور غلظت‌های سمی یون‌های مس، ساز و کارهای مختلف مقاومت در برابر مس را ایجاد کرده‌اند. به استثنای برخی مخمرها اصول اساسی ژنتیکی یا مولکولی برای مقاومت در

برابر مس بیشتر ناشناخته مانده است و در میان مکانیسم‌های مختلف مقاومت به مس فقط تولید متالوتیونین‌ها از طریق به‌کارگیری رویکردهای ژنتیک مولکولی بررسی شده است (Avery, 2001).

## ۶-۲- بیان زیستی متالوتیونین و جذب آلودگی‌های فلزات سنگین

### ۶-۲-۱- متالوتیونین

متالوتیونین‌ها پروتئین‌های متصل به فلز با جرم مولکولی کم ( $<10$  kDa)، غنی از سیستئین هستند که در حضور فلزات به طور القایی سنتز می‌شوند و یک مکانیسم متفاوت برای تحمل مس به شمار می‌رود (Kägi & Kojima, 1987; Karin *et al.*, 1984). به‌طور خلاصه به آن‌ها MT گفته می‌شود. متال<sup>۱</sup> به معنای فلز و پسوند تیونین<sup>۲</sup> از محتوای سیستئین (Cys) آن‌ها که دارای سولفور است، گرفته شده است (Nordberg & Nordberg, 2009; Yaghoobian *et al.*, 2019). با این‌که سیستئین اسید آمینه اصلی برای اتصال به فلز است، برخی از اشکال متالوتیونین از سولفیدها و کلریدهای غیرآلی برای اتصال به فلز استفاده می‌کنند. در برخی از متالوتیونین‌ها (بیشتر در انواع باکتریایی) اسید آمینه هیستیدین در اتصال به اتم روی (Zn) نقش دارد. فیتوکلاتین یا PC نیز یک نوع متالوتیونین دیگر است که از واحدهای گلوکاتینون به روش آنزیمی در سلول به وجود می‌آید. PC در برخی از موجودات به همراه MT و در برخی به تنهایی حضور دارد و به فراوانی در گیاهان دیده می‌شود (Nordberg & Nordberg, 2009; Yaghoobian *et al.*, 2019).

خانواده پروتئینی متالوتیونین‌ها شامل پروتئین‌هایی با وزن مولکولی بین ۳۵۰۰ تا ۱۴۰۰۰ دالتون هستند. به عنوان مثال، پروتئین متالوتیونین با وزن بین ۶/۵ تا ۱۴ کیلو دالتون از دوزیستی به نام *Pleurodeles waltl* جداسازی شده است (Mounaji *et al.*, 2002). متالوتیونین‌ها قادر به اتصال به فلزات زیستی (روی، مس و سلنیوم) و فلزات سنگین زنوبیوتیک<sup>۳</sup> که در سلول‌های زنده نقشی ندارند (مانند کادمیوم، نقره، جیوه و آرسنیک) می‌باشد. این عمل به واسطه اسید آمینه‌های سیستئین (Cys) که ۳۰ درصد واحدهایش را تشکیل

<sup>۱</sup> Metal

<sup>۲</sup> Thionein

<sup>۳</sup> Xenobiotic

می‌دهد، انجام می‌شود. نقش این پروتئین در موجودات احتمالا تنظیم فیزیولوژیکی فلزات و حفاظت در برابر تنش‌های اکسیداتیو می‌باشد. بسیاری از میکروارگانیسم‌ها ترکیباتی با قدرت بالای جذب فلز را ترشح می‌کنند که سیدروفور<sup>۱</sup> نامیده می‌شوند. این پروتئین‌ها در خارج سلول به فلزات خاصی متصل و سپس کمپلکس حاصل به داخل سلول جذب می‌شود (Nordberg & Nordberg, 2009).

## ۲-۶-۲-دسته‌بندی متالوتیونین‌ها

بعد از این‌که برای اولین بار مارگوش و والی (Margoshes & Vallee, 1957)، یک پروتئین متصل‌شونده به کادمیوم که بعدها متالوتیونین نام گرفت را از قشر کلیه اسب خالص‌سازی کردند، این پروتئین‌های جاذب فلز مورد توجه قرار گرفتند. دانشمندان کشورهای آمریکا، آلمان، ژاپن، سوئیس و انگلستان برای سال‌ها پیرامون آن تحقیق کردند و نتایج آن‌ها نشان داد که پروتئین MT به عنوان قوی‌ترین رباینده رادیکال‌های آزاد (یعنی با توانایی بیش از ۱۰ هزار برابر آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز) می‌باشد (Poladian *et al.*, 2021).

برای اولین بار فولر و همکاران (۱۹۸۷) این پروتئین‌ها را به سه کلاس طبقه‌بندی کردند. کلاس یک دارای همولوژی با MT اسب بود و کلاس دو بدون این همولوژی و کلاس سه شامل پپتیدهای غنی از سیستئین و سنتز شده آنزیمی بود که امروزه در گروه جداگانه فیتوکلاتین‌ها قرار دارد. حضور این پروتئین در گروه‌های متنوع موجودات از پروکاریوت‌ها تا انسان مشخص شده‌است. با وجودی که توالی (ساختار اول) آن تشابه عمومی در جانداران نشان نمی‌دهد، ولی وجود تشابه در درون بعضی گروه‌های تاکسونومیکی دیده شده‌است. از نظر ساختار فضایی دوم نیز ناهمگون (یعنی دارای تفاوت زیاد) هستند و ساختار فضایی سوم آن‌ها بسیار ناهمگون‌تر است (Nordberg & Nordberg, 2009).

پروتئین MT در مهره‌داران و خارپوستان و سخت‌پوستان ساختار دو قسمتی دارند و شامل دو دمین و در نتیجه دو خوشه فلزی جداگانه می‌باشد. ولی در مخمر و پروکاریوت‌ها ساختار یک بخشی (یعنی یک دمین با یک خوشه فلزی) دارد (Nordberg & Nordberg, 2015). گاهی و بینز (۲۰۰۱) با به کارگیری شاخص‌های

---

<sup>۱</sup> Sidrophore

رده‌بندی و نیز الگوی پراکندگی واحدهای سیستین در طول توالی MT این پروتئین را به ۱۵ خانواده طبقه‌بندی کردند. پانزدهمین خانواده MT‌های گیاهی بودند که به چهار نوع بسته به نحوه قرارگیری مناطق حاوی سیستین و مناطق فاقد سیستین (فاصله اندازه‌ها) دسته‌بندی شدند. امروزه مشخص شده که این منطقه میانی در پایداری و نیز تمایل به فلز نقش دارد (Singh & Hanson, 2006).

## ۲-۶-۳- مکانیسم عمل متالوتیونین‌ها

محاسبات مکانیک مولکولی<sup>۱</sup> نشان داد که متالوتیونین‌ها در هنگام جذب تدریجی یک فلز و یا از دست دادن تدریجی آن از یک ساختارهای حدواسط (با جداسازی هر عدد فلز) عبور می‌کنند، که این ساختارها توسط شبکه‌های پیوند هیدروژنی حالت پایدار دارند. به علاوه اتم‌های سولفور واحدهای سیستین با خارج کردن فلز از پروتئین، از درون دمین هسته‌ای پروتئین به سمت سطح دمین می‌چرخند که می‌تواند نشان‌دهنده یک واکنش سریع جذب فلز باشد (Duncan *et al.*, 2006).

سیستم‌های رونویسی ژن که توسط فلزات تنظیم می‌شوند، نقش مهمی در هموستاز فلزات و سم زدایی دارند (Kaegi & Schaeffer, 1988) و در موجودات یوکاریوتی بسیار گسترده هستند (Hill *et al.*, 1991). بهترین نمونه سیستم رونویسی تنظیم شده توسط فلز، ژن‌های *mt* است. در پروموتورهای *mt* از یوکاریوت‌های عالی، نسخه‌های متعددی از MRE<sup>۲</sup> توالی‌های *cis-acting* را که مسوول القای فلزات سنگین در بیان ژن *mt* هستند، تشکیل می‌دهند (Culotta & Hamer, 1989).

نقش متالوتیونین در محافظت از سمیت فلز با توانایی چندین یون فلزی، از جمله روی، مس، کادمیوم و غیره، در فعال‌سازی رونویسی ژن *mt* ارتباط دارد (Zhou & Thiele, 1991). مکانیسم‌های تنظیم فلز تاکنون برای سیستم‌های رونویسی ژن *mt* و برخی دیگر از سیستم‌های رونویسی پاسخ دهنده به فلز ارائه شده‌است. تنظیم ژن‌های *mt* از طریق یک پروتئین تنظیم کننده فلز اتفاق می‌افتد که هم به عنوان گیرنده فلز و هم به عنوان یک عامل رونویسی عمل می‌کند (Carri *et al.*, 1991).

<sup>1</sup> Molecular Dynamics

<sup>2</sup> Metal-regulatory element

مطالعات ژنتیکی در مخمر نان نشان داد که مقاومت بالای مس به جایگاه ژنی به نام *cup I* مرتبط است (Brenes-Pomales *et al.*, 1955; Welch *et al.*, 1983). همسانه‌سازی و بررسی خصوصیات مولکولی توالی DNA در سویه‌های مقاوم در مقایسه با سویه‌های حساس نشان داد که فنوتیپ مقاومت به دلیل تکثیر پشت سر هم یک قطعه DNA ژنومی دو کیلو بازی در جایگاه *cup* می‌باشد (Welch *et al.*, 1983). همچنین بین سطح مقاومت به مس و میزان تکثیر DNA ارتباط وجود دارد (Butt *et al.*, 1984). سویه‌های مقاوم به مس در مخمر نان حاوی ۲ تا ۱۴ نسخه از واحد تکراری 2 kb به صورت ردیف‌های پشت‌سرهم *cup I* (مشخص شده یا علامت دار) هستند، در حالی که سویه‌های حساس به مس فقط یک نسخه از توالی *cup I* را دارند (Fogel *et al.*, 1984). رونویسی از *cup I* با افزودن مس ۱۰ تا ۲۰ برابر القا می‌شود اما توسط کادمیوم و روی القا نمی‌شود (Gorman *et al.*, 1986).

بیان ژن *cup I* ناشی از مس همچنین مستلزم مشارکت فاکتور رونویسی ACE 1 است (به آن *cup II* نیز گفته می‌شود) که توسط ژن *cup z* کد می‌شود. تجزیه و تحلیل توالی ژن *ace I* داشتن یک پلی‌پپتید و یک انتهای N غنی از بقایای سیستئین را نشان داد (Dameron *et al.*, 1991). این سیستئین‌ها یک کمپلکس تیولات- مس را تشکیل می‌دهند، مشابه آنچه برای CU-MT مخمر توصیف شده است که ACE 1 را برای اتصال به DNA تثبیت می‌کند (Dameron *et al.*, 1991).

یک فاکتور رونویسی فعال شده توسط فلز که همسانی یا همولوژی جزئی با پروتئین ACE 1 نشان می‌دهد در مخمر *Candida glabrata* گزارش شده است (Zhou & Thiele, 1991). این فاکتور رونویسی خصوصیات ACE 1 در مخمر نان را نشان داد. جایگاه *cup I* شامل چهارچوب‌های باز خواندنی<sup>۱</sup> است که یکی از آن‌ها کد کننده پروتئین غنی از سیستئین می‌باشد که مشابه MT‌های پستانداران است. دیگری پروتئینی را کد می‌کند که عملکردی برای آن تعریف نشده است (Butt & Ecker, 1987).

---

<sup>۱</sup> ORFs

از دیگر قارچ‌هایی که پروتئین‌های غنی از سیستئین ناشی از مس در آن‌ها شناسایی شده‌است، می‌توان به *Neurospora crassa* و *Dactylim dendroides* اشاره کرد (Lerch, 1980). در تحقیقی یک سوبه بیماری‌زا از *Candida albicans* شناسایی شد که حاوی توالی‌های DNA است که قابلیت هیبرید شدن با توالی DNA ژن *cup* مخمر را دارد و پروتئین‌های القایی ناشی از مس مانند متالوتیونین مخمر را سنتز می‌کند (Butt *et al.*, 1984). مخمر بیماری‌زای *C. glabrata* پروتئین کوچکی را در پاسخ به مس تولید می‌کند، اما هیچ تشابه و همسانی با DNA ژن *cup* در مخمر نان ندارد (Butt *et al.*, 1984).

کانو-کانچولا و همکاران (۱۹۹۲) نشان دادند زیگومیست‌های *Mucor racemosus* و *M. rouxii* هر دو حاوی توالی DNA هستند که با DNA ژن *cup 1* از *S. cerevisiae* هیبرید می‌شوند. آن‌ها نشان دادند که در *M. rouxii* یک خانواده چندژنی وجود دارد. همچنین مشخص شد که متیلاسیون DNA بیان *cup* را طی رشد سلول‌های *Mucor* با استفاده از یک روش هیستوشیمیایی کنترل می‌کند (Cano-Canchola *et al.*, 1992).

سوبه‌های مقاوم به مس در قارچ *Trichoderma viride* جدا شده از یک معدن مس حاوی یک پروتئین ۲۵ کیلودالتون است که در سوبه‌های حساس به مس وجود ندارد، اما هیچ شباهتی با توالی دی‌ان‌آ *cup 1* از *S. cerevisiae* دیده نشد (Cervantes & Gutierrez-Corona, 1994). پروتئین‌های القایی مس حاوی یا فاقد سیستئین در قارچ *Dactyllum dendroides* تولید می‌شوند (Shatzman & Kosman, 1979)، اما شباهت ساختاری آن‌ها به فیتوکلانتین‌ها (پپتیدهای محرک فلز) در جلبک‌ها و گیاهان عالی (Grill *et al.*, 1986) و برخی از قارچ‌ها مشخص نشده‌است (Kondo *et al.*, 1984; Mehra & Winge, 1991). نیر و همکاران (Kneer *et al.*, 1992) گزارش کردند، *S. cerevisiae* و *N. crassa* که در حضور مس به عنوان تولید کننده MT شناخته شده‌بودند (Butt & Ecker, 1987; Mehra & Winge, 1991)، هنگامی که در معرض کادمیوم قرار گیرند، فیتوکلانتین تولید می‌کنند. جالب است که سنتز فیتوکلانتین در *S. cerevisiae* توسط مس یا روی ایجاد می‌شود (Kneer *et al.*, 1992).



### ۱-۷-۲- جنس *Sarocladium*

جنس *Acremonium* یک جنس پیچیده و بزرگ از شاخه *Ascomycota* با گونه‌های پراکنده در راسته‌های مختلف از رده *Sordariomycetes* است. اخیراً بر اساس مطالعات فیلوژنتیک مولکولی، طبقه‌بندی این جنس مورد بررسی قرار گرفت و برخی از گونه‌های بیماری‌زای حیوانی و گیاهی مهم به جنس *Sarocladium* منتقل شد. اگرچه هر دو جنس از نظر ریخت‌شناسی شبیه به هم و متعلق به راسته *Hypocreales* هستند، اما از نظر فیلوژنتیک از هم دور هستند: جنس *Acremonium* متعلق به خانواده *Bionectriaceae* است در حالی که جنس *Sarocladium* هنوز به عنوان *incertae sedis* در نظر گرفته می‌شود (Summerbell et al., 2011).

جنس *Sarocladium* را می‌توان از نظر ریخت‌شناسی از جنس *Acremonium* متمایز کرد، زیرا فیالیدهای کشیده که به تنهایی روی هیف‌های رویشی یا در کنیدیوفورهایی که به صورت پراکنده منشعب شده‌اند، تولید می‌کند که باعث ایجاد آدلو فیالیدهای فراوان و کنیدی‌های طویل می‌شود. در مقابل، در جنس *Acremonium* کنیدیوفورها عمدتاً بدون انشعاب یا دارای انشعابات کمی هستند، کنیدیوم‌ها از نظر شکل متنوع‌تر هستند و آدلو فیالیدها معمولاً وجود ندارند (Summerbell et al., 2011).

جنس *Sarocladium* در حال حاضر دارای ۱۰ گونه می‌باشد. گونه *Sarocladium oryzae*، عامل بیماری‌زای مهم گیاهی است که باعث پوسیدگی غلاف برنج (*Oryza sativa* L.) می‌شود (Ayyadurai et al., 2005). همچنین متابولیت‌های ثانویه ضد میکروبی مانند اسید هلوولیک<sup>۱</sup> و سرولنین<sup>۲</sup> تولید می‌کند (Gerald et al., 2004). گونه‌های *Sarocladium attenuatum* و *S. sinense* نیز عوامل بیماری‌زای برنج هستند (J. D. Chen et al., 1986). گونه‌ی *Sarocladium mycophilum*، که در *Cortinarius subsertipes* یافت شد، تنها گونه مایکوپارازیت این جنس است (Helfer, 1991). سامرل و همکاران (۲۰۱۱) در مطالعه فیلوژنتیک *Acremonium* و جنس‌های مرتبط بر اساس توالی rDNA، جایگاه برخی از گونه‌های *Acremonium* را تغییر

<sup>1</sup> Helvolic acid

<sup>2</sup> Cerulenin

دادند و در جنس *Sarocladium* قرار گرفتند، از جمله گونه‌های مهم بیماریزا *A. strictum* و *A. kiliense* و اندوفیت ذرت *A. zae*.

جنس *Sarocladium* همچنین به عنوان سویه‌های مخمری شناخته می‌شوند که کارایی بالایی در حذف روغن خام و تولید بیوسورفاکتانت دارند. گونه‌ی *Acremonium pinkertonie* یک قارچ میتوسپوریک است که متعلق به گروهی از قارچ‌های کمتر شناخته شده‌است که بیشتر به عنوان ساپروفیت در طیف وسیعی از زیستگاه‌ها زندگی می‌کنند و یا به‌عنوان بیمارگرهای گیاهی و حیوانی می‌باشند (Samuels, 1976). کشت گونه *A. pinkertoniae* در محیط جامد همراه با افزایش غلظت سولفات مس نشان‌داد که در مقادیر بالا فلز مس، میسلیم به رنگ آبی مشخصی ایجاد می‌شود که با تغییرات ریخت‌شناسی و تشکیل ساختارهای کریستالی در دیواره‌های سلول ضخیم شده همراه است (Blaudez et al., 2000).

## ۲-۷-۲- جنس *Pleurotus*

جنس *Pleurotus* متعلق به شاخه *Basidiomycota*، زیرشاخه *Agaricomycotina*، رده *Agaricomycetes*، راسته *Agaricales* و خانواده *Pleurotaceae* می‌باشد و به‌عنوان قارچ صدفی شناخته می‌شود (شکل ۱-۲)، که تقریباً ۴۰ گونه دارد و همه معمولاً خوراکی هستند. آن‌ها علاوه بر ارزش غذایی خود، دارای خواص دارویی و سایر اثرات مفید و اثرات تقویت کننده سلامتی هستند (Gregori et al., 2007). این جنس به طور طبیعی در جنگل‌ها یافت می‌شود و مسئول تجزیه چوب و عامل پوسیدگی سفید چوب هستند. گونه‌های *Pleurotus* منبع مواد مغذی ارزشمند و خوراکی هستند و سالهاست که توسط انسان‌ها در سراسر جهان مورد استفاده قرار می‌گیرد و به عنوان قارچ دارویی نیز شناخته می‌شود. زیرا حاوی چندین ترکیب با فعالیت‌های مهم دارویی و تغذیه‌ای است. میسلیم عامل پوسیدگی سفید به دلیل توانایی‌های زیست پالایی از جمله تجمع فلزات سنگین و هیدروکربن‌های آروماتیک کلردار مشهور است. جنس *Pleurotus* همچنین در انتقال بیولوژیک ترکیبات ترپنوئید غیر اشباع قابل استفاده است (Jedinak & Sliva, 2008; Smiderle et al., 2008).



شکل ۲-۱ - کلاهک قارچ جنس *Pleurotus* رشد یافته روی تنه درختان (<http://mycoportal.org>)

قارچ‌های مولد پوسیدگی سفید از فعال‌ترین میکروارگانیسم‌ها هستند که ایزوفرم‌های مختلفی از آنزیم‌های لیگنینولیتیک (پراکسیدازهای لیگنین، لاکازها، پراکسیدازهای منگنز) تولید می‌کنند و باعث تجزیه لیگنین می‌شوند که یک بیوپلیمر پیچیده است و نسبت به تخریب بسیار مقاوم می‌باشد (Akcil *et al.*, 2015).

## ۲-۸- نقش آنزیم لاکاز در جذب زیستی فلزات سنگین

توانایی عوامل بیولوژیک در پالایش فلزات سنگین به میزان زیادی به آنزیم‌هایی بستگی دارد که در آن‌ها تولید و تجمع می‌یابد. این بیوکاتالیست‌ها برای تخریب زیستی فلزات سنگین از طریق اکسیداسیون، احیا، حذف یون هیدروژن، پلیمریزاسیون و غیره عمل می‌کنند (Chandra & Chowdhary, 2015). در میان عوامل بیولوژیکی، لاکازها ماهیتی جهانی دارند و به‌عنوان یک گروه جذاب از آنزیم‌های اکسیدوردوکتاز می‌باشند که دارای پتانسیل فوق‌العاده‌ای در زمینه زیست‌پالایی و بیوتکنولوژی هستند (Mate *et al.*, 2010). لاکازهای قارچی (بنزندیول: اکسیدوردوکتازهای اکسیژن؛ EC 1.10.3.2) بخشی از سیستم لیگنینولیتیک هستند و همراه با آسکورات اکسیدازها، سروپلاسمین<sup>۱</sup> و دیگر آنزیم‌ها در بین اکسیدازهای مس آبی<sup>۲</sup> قرار دارند که با کاهش

<sup>1</sup> Cerulplasmin

<sup>2</sup> Blue copper oxidases

همزمان اکسیژن مولکولی به آب، اکسیداسیون یک الکترون، بسیاری از سوبستراهای آروماتیک را کاتالیز می‌کنند (Hernández-Monjaraz *et al.*, 2018).

لاکازها به شکل چند ایزوآنزیم یافت می‌شوند (Mansur *et al.*, 1998). میکروارگانیسم‌های متعدد لاکازهای خارج و یا داخل سلولی تولید می‌کنند که توانایی کاتالیز واکنش‌های اکسیداسیون ترکیبات مختلف آروماتیک و غیرآروماتیک (پلی آمین‌ها، آمینوفنول‌ها، لیگنین، پلی فنول‌ها، آریل دی‌آمین‌ها و پارادی فنول‌ها) را به همراه یون‌های غیرآلی دارند. لاکازها همچنین اسیدهای متوکسی-فنولیک و فنولیک را اکسید می‌کنند، آن‌ها را دکربوکسیله کرده و دمتیلاسیون که در دپلمیریزاسیون لیگنین نقش دارد را انجام می‌دهند. وجود چندین ژن کد کننده ایزوآنزیم‌های مختلف لاکاز در قارچ‌ها به اثبات رسیده‌است. علاوه بر این، بیان ژن لاکاز به شرایط محیط کشت بستگی دارد و سیستم‌های تنظیم شده متفاوتی برای کنترل تولید لاکاز گزارش شده‌است. در میان القاکنندگان مختلف بررسی شده، یون مس رونویسی ژن لاکاز در بسیاری از قارچ‌ها را به مقدار زیاد افزایش می‌دهد (Chandra & Chowdhary, 2015).

لاکازها حاوی ۴ اتم مس هستند و این چهار یون مس به سه دسته تقسیم می‌شوند: نوع ۱ (T1)، نوع ۲ (T2) و نوع ۳ (T3). این سه نوع را می‌توان با استفاده از UV و طیف‌سنجی تشدید پارامغناطیس الکترون (EPR)<sup>۱</sup> تشخیص داد. در حالت اکسیداسیون، نوع ۱ مس با جذب طول موج ۶۱۰ نانومتر که قابل تشخیص EPR است، رنگ آبی به پروتئین می‌دهد. نوع ۲ مس رنگ نمی‌دهد ولی قابل تشخیص EPR است و نوع ۳ مس حاوی یک جفت اتم در یک ترکیب دو هسته‌ای است که در ناحیه نزدیک UV جذب ضعیفی ایجاد می‌کند اما توسط سیگنال EPR تشخیص داده نمی‌شود (Thurston, 1994). مس نوع ۲ و ۳ یک مرکز سه هسته‌ای تشکیل می‌دهند که در مکانیزم کاتالیزوری آنزیم نقش دارد (Gianfreda *et al.*, 1999).

آنزیم‌های لیگنینولیتیک قارچی را می‌توان به سه گروه قارچ‌های پوسیدگی نرم، پوسیدگی قهوه‌ای و پوسیدگی سفید طبقه‌بندی کرد. فعالیت آنزیمی بیشتر، کارآیی و اثربخشی فرآیندهای کاتالیز شده با آنزیم را بهبود می‌بخشد. از این نظر، القای آنزیمی قارچ‌های پوسیدگی سفید بسیار مهم است، زیرا فعالیت متابولیکی و رشد

<sup>1</sup> Electronic paramagnetic resonance

آن‌ها بستگی به شرایط محیطی دارد. میکروارگانیسم‌های ساپروفیتیک (باکتری‌ها و قارچ‌ها) با اثر آنزیم‌های لیگنینولیتیک که از میسلیم به مواد کلونیزه شده ترشح می‌شوند، لیگنین را که جزء زیست توده گیاهی است تجزیه می‌کنند. توجه زیادی به عوامل موثر بر فعالیت لاکاز در کشت‌های قارچی انجام شده است (Chmelová & Ondrejovič, 2021).

لاکاز در فاز متابولیسم ثانویه رشد تولید می‌شود. بیان ژن و تولید آنزیم تحت تأثیر ترکیب محیط کشت یا افزودن القا کننده‌هایی مانند زایلیدین، فرولیک اسید، وراتریل الکل، پیروگالول و مس قرار می‌گیرد (Baldrian & Gabriel, 2002). سولفات مس به طور موثر به عنوان یک القا کننده برای افزایش تولید لاکاز مورد استفاده قرار گرفته است. مطالعات قبلی نشان داده است که مس یک القا کننده کارآمد لاکاز است که در محیط به شکل سولفات مس با افزایش رونویسی و فعالیت آنزیم همراه است (Vrsanska et al., 2016).

فلزات سنگین به طور کلی مهارکننده‌های قوی واکنش‌های آنزیمی هستند و از این نظر، غلظت آن‌ها نقش بسیار مهمی ایفا می‌کند. معمولاً فلزات در غلظت چند برابر بیشتر از مقدار مورد نیاز برای قارچ سمی می‌شوند. مس می‌تواند با ایجاد تنش اکسیداتیو باعث آسیب اکسیداتیو پروتئین‌ها شود، اما به طور همزمان به عنوان کوفاکتور در کاتالیزور عمل می‌کند (Vrsanska et al., 2016). در نتیجه، افزودن مقادیر میلی مولار Cu (II) به محیط‌های فعال در حال رشد بازیدیومیست‌ها می‌تواند یک روش آسان و موثر برای تحریک تشکیل لاکاز توسط این موجودات باشد. این می‌تواند راهی جذاب برای تحریک تولید لاکاز باشد، که کاربردهای صنعتی گسترده از جمله استفاده در صنعت خمیر کاغذ، حسگرهای زیستی یا پالایش زیستی دارد (Galhaup & Haltrich, 2001). اگرچه تأثیر مثبت افزودن مس (به شکل سولفات مس) بر فعالیت لاکاز در گذشته گزارش شده است، اما دلیل اینکه چگونه مس سنتز لاکاز را به طور موثر تحریک می‌کند، به وضوح مشخص نیست و همچنین تأثیر ساختار القا کننده مس بر فعالیت آنزیم هنوز مطالعه نشده است (Vrsanska et al., 2016). تأثیر مهم مس بر سنتز لاکاز در *Trametes versicolor* و *Pleurotus ostreatus* شرح داده شده است (Galhaup & Haltrich, 2001).

گونه *Pleurotus ostreatus* چندین ایزوآنزیم لاکاز ترشح می‌کند (Pezzella et al., 2009)، چهار مورد از آن‌ها، به نام‌های *poxc* (Giardina et al., 1996)، *poxa 1w* (Palmieri et al., 2000) و *poxa 1b* و *poxa 2* (Giardina et al., 1999)، خالص‌سازی و شناسایی شده‌اند. چهار ژن مختلف لاکاز در *P. ostreatus* و cDNA-های متناظر با آن‌ها شبیه‌سازی و توالی‌یابی شده‌اند. افزودن سولفات مس به محیط رشد *P. ostreatus* باعث افزایش چشمگیر فعالیت کل لاکاز و القای رونویسی ژن‌های *poxc* و عمدتاً *poxa1b* می‌شود (Piscitelli et al., 2005).

فصل سوم

مواد و روش

### ۱-۳- نمونه برداری و آماده سازی نمونه ها

در این پژوهش به منظور شناسایی قارچ های متحمل به آلودگی ناشی از فلز مس و بررسی تغییرات بیان ژن مرتبط با این ویژگی در گونه غالب از خاک ها و پساب های اطراف معدن مس سرچشمه و خاک های معدن مس اهر نمونه برداری انجام و نمونه ها به آزمایشگاه منتقل شد. معدن مس سرچشمه یکی از بزرگترین معادن روباز مس دنیا است که در ۱۶۰ کیلومتری جنوب غرب کرمان و ۵۰ کیلومتری رفسنجان و در ناحیه ای کوهستانی واقع شده است. ذخیره زمین شناسی معدن بالغ بر یک میلیارد و دویست میلیون تن سنگ سولفوری با عیار ۰/۷ درصد برآورد می شود. معدن مس سرچشمه از دیدگاه زمین شناسی روی کمر بند جهانی مس قرار دارد (بی نام، ۱۳۹۱). در این تحقیق پنج نمونه از خاک های اطراف معدن و دو نمونه از پساب ها جمع آوری (شکل ۱-۳) و موقعیت محل جمع آوری توسط دستگاه GPS ثبت گردید.



شکل ۱-۳- تصاویر محل جمع آوری نمونه خاک و پساب از اطراف معدن مس سرچشمه

### ۲-۳- جداسازی و خالص سازی جدایه های قارچی

به منظور جداسازی قارچ از خاک، ابتدا نمونه خاک ها در دمای آزمایشگاه در معرض هوا خشک شدند. سپس از آن ها سوسپانسیون و سریال رقت تهیه شد. بدین ترتیب که یک گرم از هر نمونه خاک در ۴۹ میلی لیتر آب مقطر سترون سوسپانسیون شد و سپس سریال رقت از نمونه اصلی بدست آمد. از هر رقت یک میلی لیتر در



محیط کشت عصاره سیبزمینی- دکستروز- آگار (PDA) کشت شد و برای هر نمونه سه تکرار در نظر گرفته شد. سپس پتری‌ها در انکوباتور با دمای  $25 \pm 2$  درجه سلسیوس به مدت ۷ روز نگهداری شدند. پرگنه‌های قارچی رشد یافته، جداسازی و به محیط PDA منتقل شدند. به منظور خالص‌سازی جدایه‌های بدست آمده، از روش نوک ریشه و تک اسپور روی محیط کشت آب آگار (WA) دو درصد و PDA استفاده شد.

به منظور جداسازی قارچ از نمونه پساب جمع آوری شده از روش طعمه گذاری با بذور کنجد، شاهدانه و ذرت استفاده شد. ابتدا بذرها با مقداری آب مقطر سترون به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شدند تا قوه نامیه آن‌ها از بین رود. سپس بذرها داخل پتری قرار داده شد و مقداری از نمونه‌های پساب به آن‌ها اضافه شد. پتری‌ها در انکوباتور در دمای  $25 \pm 2$  درجه سلسیوس نگهداری شدند. پتری‌ها بطور روزانه زیر میکروسکوپ نوری بررسی شدند و ریشه‌های رشد یافته روی بذور با سوزن سترون جدا و به محیط WA و PDA انتقال داده شد. پتری‌ها در انکوباتور نگهداری و پس از رشد پرگنه‌ها، به روش تک اسپور و نوک ریشه مانند قبل خالص گردید.

### ۳-۳- زیست‌سنجی جدایه‌های قارچی

#### ۳-۳-۱- بررسی تاثیر مس بر رشد رویشی قارچ‌ها

به منظور بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف مس بر رشد رویشی جدایه‌های قارچی بدست آمده، از روش اختلاط با محیط کشت استفاده شد. جدایه‌های خالص شده روی محیط PDA حاوی غلظت‌های مختلف ۱۰۰۰، ۱۵۰۰، ۳۵۰۰، ۴۰۰۰ و ۵۵۰۰ پی‌پی‌ام سولفات مس ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ ) کشت شدند. برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد و از محیط کشت بدون مس بعنوان شاهد استفاده شد. پتری‌ها در انکوباتور در دمای  $25 \pm 2$  سلسیوس نگهداری شدند و پس از پر شدن پتری در شاهد اندازه‌گیری متوقف شد. سپس درصد بازدارندگی از رشد میسلیمی در مقایسه با شاهد با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (Peerzada *et al.*, 2020).

$$GI = [(C-T)/C] \times 100$$

GI درصد بازدارندگی از رشد، C میزان رشد بیمارگر در شاهد، T میزان رشد بیمارگر در تیمار

پس از بررسی غلظت‌های مختلف مس، غلظت موثر انتخاب و به منظور بررسی و تایید نتایج بدست آمده تمامی جدایه‌ها دو بار روی محیط کشت حاوی غلظت مورد نظر کشت شدند و اندازه‌گیری بازدارندگی از رشد مانند آنچه گفته شد، محاسبه گردید.

### ۳-۳-۲- بررسی تاثیر مس بر رشد قارچ‌ها در محیط مایع

به منظور بررسی تاثیر مس بر رشد قارچ در محیط مایع، از غلظت بهینه مس در مرحله قبل استفاده شد. همچنین ۱۵ جدایه که در مرحله قبل از نظر میزان بازدارندگی از رشد در گروه بازدارندگی کم (کمتر از ۲۰ درصد)، متوسط (۳۰ تا ۶۰ درصد) و زیاد (۱۰۰ درصد) قرار گرفتند، انتخاب شدند. جدایه‌های انتخاب شده در محیط مایع عصاره سیب‌زمینی- دکستروز حاوی ۵۵۰۰ پی‌پی‌ام مس کشت شدند و روی شیکر در دمای  $25 \pm 2$  درجه سلسیوس، چرخش ۱۳۵ دور در دقیقه به مدت ۷ روز نگهداری شدند. برای هر جدایه سه تکرار برای تیمار و شاهد (محیط بدون مس) در نظر گرفته شد. میزان رشد پلاگ‌های قارچی در محیط مایع پس از هفت روز در مقایسه با شاهد ارزیابی شد.

### ۳-۳-۳- بررسی تاثیر اسیدیتیه محیط بر رشد جدایه‌ها

به منظور بررسی تاثیر میزان اسیدیتیه محیط بر رشد جدایه‌ها، جدایه‌های منتخب در محیط مایع حاوی مس با اسیدیتیه ۳/۵ و ۷ کشت شدند و میزان رشد در این دو محیط، با شاهد (محیط مایع بدون مس) مقایسه شد. میزان رشد پرگنه قارچ در اطراف پلاگ‌ها در محیط مایع پس از هفت روز در مقایسه با شاهد بررسی شد.

### ۳-۴- اندازه‌گیری میزان مس جذب شده توسط میسلیم قارچ

به منظور اندازه‌گیری میزان جذب مس توسط میسلیم قارچ، ابتدا یک قرص آگار از کشت ۷ روزه جدایه‌های قارچی مقاوم به فلز مس روی محیط PDA به محیط کشت مایع PDB حاوی غلظت ۵۵۰۰ پی‌پی‌ام مس منتقل شد. برای هر جدایه سه تکرار در نظر گرفته شد و از محیط کشت بدون مس به عنوان شاهد استفاده شد. نمونه‌ها به مدت ۱۰ روز در شیکر انکوباتور (۱۲۰ دور در دقیقه، دمای  $25 \pm 2$  درجه سلسیوس) نگهداری شدند. سپس توده میسلیمی به دست آمده با استفاده از کاغذ صافی جدا و با آب مقطر سترون شستشو داده

شد. وزن تر نمونه‌های تیمار (حاوی سولفات مس) و شاهد (بدون سولفات مس) اندازه‌گیری شد. سپس نمونه‌ها به آون (دمای ۴۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت) منتقل شد و وزن خشک آن‌ها اندازه‌گیری شد. نمونه‌ها درون هاون پودر شده و میزان فلز مس در نمونه‌های تیمار و شاهد و محیط کشت مایع فیلترشده آن‌ها توسط دستگاه جذب اتمی اندازه‌گیری شد (شکل ۳-۲).



شکل ۳-۲- نمونه‌های قارچی آماده شده برای اندازه‌گیری میزان مس جذب شده توسط قارچ

### ۳-۵- بررسی میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) جدایه‌ها

جهت بررسی میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، جدایه‌های منتخب در محیط مایع عصاره سیب‌زمینی- دکستروز حاوی ۵۵۰۰ پی‌پی‌ام سولفات مس کشت شدند و روی شیکر در دمای  $25 \pm 2$  درجه سلسیوس، چرخش ۱۳۵ دور در دقیقه به مدت ۷ روز نگهداری شدند. جدایه‌ها در محیط مایع بدون مس به عنوان شاهد کشت شدند. فرآیند آماده‌سازی جدایه‌ها شامل: تثبیت، آبگیری و خشک کردن به روش زیر انجام شد (Echlin, 2011).

ابتدا زیست توده قارچی رشدیافته در محیط مایع توسط کاغذ صافی جدا و در گلو تار آلدهید ۲/۵ درصد به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سلسیوس قرار گرفت. سپس جدایه‌ها با بافر فسفات ۰/۱ مولار سه بار شستشو داده

شدند. روند آبیگری با شستشوی زیست توده قارچ توسط سریال رقت اتانول (۳۰، ۵۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰، ۹۵ و ۱۰۰ درصد) انجام شد. در نهایت جدایه‌ها در دسیکاتور خشک شدند.

### ۳-۶- بررسی ارتباط بین میزان مس موجود در خاک و جمعیت میکروبی

در این آزمایش میزان مس موجود در هر نمونه خاک جمع‌آوری شده، توسط دستگاه جذب اتمی اندازه‌گیری شد. به منظور اندازه‌گیری جمعیت میکروبی، ابتدا مانند آنچه در بخش جداسازی آورده شد، سوسپانسیون و سریال رقت تهیه و در محیط کشت PDA کشت شدند (شکل ۳-۳). پتری‌ها در انکوباتور با دمای  $25 \pm 2$  درجه سلسیوس نگهداری شدند و در فواصل زمانی ۲، ۴ و ۷ روز پس از کشت جمعیت پرگنه‌های رشد یافته شمارش شدند و جمعیت میکروبی در واحد حجم (cfu/ml) محاسبه شد. برای هر نمونه سه تکرار در نظر گرفته شد و آزمایش دو بار تکرار شد.



شکل ۳-۳ - بررسی جمعیت میکروبی در نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده در این تحقیق

### ۳-۷- شناسایی مولکولی جدایه‌های قارچی

به منظور شناسایی مولکولی جدایه‌های قارچی منتخب در آزمون‌های زیست‌سنجی، استخراج دی‌ان‌اژنومی قارچ‌ها به روش صفایی و همکاران (۲۰۰۵) انجام شد. جدایه‌های قارچی ابتدا در محیط کشت مایع عصاره سیب زمینی- دکستروز (PDB) کشت شدند و روی شیکر با سرعت ۱۳۵ دور در دقیقه به مدت ۵ تا ۷ روز در

دمای اتاق قرار گرفتند. سپس توده میسلیموم به کمک کاغذ صافی سترون جداسازی و آبگیری شد. به منظور استخراج دی‌ان‌آی ژنومی، ابتدا ۴۰ تا ۵۰ گرم از توده‌ی میسلیمومی فریز شده هر یک از جدایه‌ها، درون هاون چینی قرار داده شد و پس از افزودن نیتروژن مایع، ساییده شد. سپس مقدار ۴۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (تریس ۱۰۰ میلی مولار، EDTA ۵ میلی مولار، کلرید سدیم ۱/۴ مولار) به میسلیموم پودر شده اضافه شد و محتویات میکروتیوب به خوبی مخلوط شدند. میکروتیوب‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب گرم در دمای ۶۵ درجه سلسیوس قرار داده شدند. در طول این مدت دو تا سه بار میکروتیوب‌ها به آرامی تکان داده شدند. پس از انتقال میکروتیوب‌ها روی یخ (به مدت پنج تا ده دقیقه)، محتویات میکروتیوب با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رونشین به میکروتیوب تمیز و سترون دیگری منتقل و هم حجم آن ایزوپروپانول سرد اضافه گردید. میکروتیوب به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و فاز بالایی دور ریخته شد. رسوب حاصل در معرض هوای اتاق قرار گرفت تا باقیمانده‌ی الکل تبخیر شود. سپس ۳۰ میکرولیتر آب دیونیزه سترون به رسوب دی‌ان‌آ اضافه و یک شب در یخچال نگهداری شد تا دی‌ان‌آ در آب حل گردد. برای بررسی کیفیت دی‌ان‌آ پنج میکرولیتر از محلول دی‌ان‌آ روی ژل آگارز ۰/۸ درصد الکتروفورز شد. همچنین به منظور بررسی کمیت دی‌ان‌آ استخراج شده از دستگاه نانودراپ (Implen NanoPhotometer) استفاده شد.

جهت شناسایی جنس و گونه جدایه‌ها، ناحیه ITS1-5.8s-ITS2 با استفاده از آغازگرهای ITS1 و ITS4 (White *et al.*, 1990) تکثیر و تعیین توالی شدند. توالی آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۱-۳ آورده شده است.

جدول ۱-۳ - فهرست و توالی آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق

| نام آغازگر | توالی (3' → 5')            | دمای اتصال (°C) | منبع                       |
|------------|----------------------------|-----------------|----------------------------|
| ITS1       | TCC GTA GGT GAA CCT GCG G  | ۵۶              | White <i>et al.</i> , 1990 |
| ITS4       | TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC | ۵۶              | White <i>et al.</i> , 1990 |

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل؛ ۱۰ میکرولیتر مخلوط واکنش، ۱ میکرولیتر آغازگر پیشرو، یک میکرولیتر آغازگر معکوس، ۱ میکرو لیتر دی‌ان‌اژ با غلظت ۵۰ نانوگرم در میکرولیتر و حجم باقی‌مانده آب دیونیزه انجام شد. چرخه‌های دمایی برای واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای ITS1/ITS4 شامل؛ یک چرخه واسرشت‌سازی اولیه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، ۳۵ چرخه شامل ۱ دقیقه در ۹۴ درجه سلسیوس، ۳۰ ثانیه در ۵۷ درجه سلسیوس، ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس و بسط نهایی ۱۰ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس انجام شد.

### ۳-۸- بررسی تغییرات بیان ژن در جدایه‌های منتخب تحت تیمار مس

به منظور بررسی بیان ژن دخیل در تولید آنزیم لاکاز و متالوتیونین در جدایه‌های قارچی منتخب شناسایی شده، ابتدا جدایه‌ها مانند آنچه در قسمت‌های قبل آورده شد در محیط مایع PDB حاوی ۵۵۰۰ پی‌پی‌ام سولفات مس کشت شدند و روی شیکر انکوباتور در دمای  $25 \pm 2$  درجه سلسیوس با دور ۱۲۱ در دقیقه نگهداری شدند (شکل ۳-۴). از محیط بدون مس به عنوان شاهد استفاده شد. سپس در زمان‌های ۳، ۶، ۸ روز پس از کشت نمونه‌برداری انجام شد. توده میسلیمی رشد یافته در محیط در زمان‌های مذکور از محیط خارج و توسط آب مقطر استریل شسته شد و بلافاصله به فریزر منفی ۸۰ درجه سلسیوس منتقل گردید. برای هر نمونه در هر زمان سه تکرار تیمار و شاهد در نظر گرفته شد.



شکل ۳-۴- رشد جدایه‌های قارچی منتخب در محیط حاوی ۵۵۰۰ پی‌پی‌ام سولفات مس

### ۳-۸-۱- استخراج RNA کل

استخراج RNA به کمک RNX-Plus (شرکت سیناکلون) انجام شد. ابتدا مقداری از توده میسلیمی در هاون کوچک حاوی ازت مایع کاملاً خرد شد. بافت خردشده به میکرو تیوپ ۱/۵ میلی لیتری منتقل و ۷۵۰ میکرولیتر بافر RNX-Plus به آن اضافه شد. سپس به مدت کوتاهی ورتکس شد تا همگن شود و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. در ادامه ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه شد و به مدت ۱۵ ثانیه به آرامی مخلوط شد و سپس به مدت ۵ دقیقه روی یخ قرار گرفت. در مرحله بعد، محلول حاصل به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای چهار درجه سلسیوس سانتریفیوژ گردید. سپس روشین به میکروتیوب جدید انتقال یافت و ۴۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد به آن اضافه گردید و به آرامی مخلوط شد و به مدت ۱۵ دقیقه روی یخ نگهداری شد. میکروتیوبها به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای چهار درجه سلسیوس سانتریفیوژ و روشین حذف گردید. به رسوب حاصل یک سی سی اتانول ۷۰ درصد اضافه شد و به آرامی ورتکس شد. سانتریفیوژ با سرعت ۷۵۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۸ دقیقه انجام شد و روشین حذف گردید. سپس میکروتیوبها در مجاورت هوا خشک شد و در ۵۰ میکرولیتر آب DEPC حل گردید. در نهایت داخل حمام آب گرم در دمای ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت.

### ۳-۸-۲- بررسی کمیت و کیفیت RNA استخراج شده

#### ۳-۸-۲-۱- الکتروفورز

به منظور تعیین کیفیت آران آ استخراج شده، ۵ میکرولیتر از نمونه های RNA همراه با نشانگر با اندازه مولکولی ۱۰۰ جفت باز، روی ژل آگارز ۰/۸ درصد الکتروفورز گردید. ژل با استفاده از اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و سپس با استفاده از دستگاه عکس برداری ژل، باندهای مورد نظر بررسی شدند.

### ۳-۸-۲-۲- بررسی کیفیت و کمیت RNA استخراج شده با نانودراپ

حداکثر جذب آران آ در ۲۶۰ نانومتر است و در این طول موج یک واحد جذب (OD) معادل ۴۰ میکروگرم RNA در هر میکرولیتر است. نسبت OD<sub>260</sub> به OD<sub>280</sub>، درجه خلوص RNA را مشخص می نماید که این نسبت (A<sub>260/280</sub>) تقریباً باید در محدوده ۲-۱/۸ باشد. همچنین نسبت OD<sub>260</sub> به OD<sub>230</sub> میزان آلودگی به مواد فنلی و پلی ساکارید را نشان می دهد. در این روش از رقت  $\frac{1}{25}$  نمونه RNA در آب مقطر و دستگاه نانودراپ استفاده شد.

### ۳-۸-۳- سنتز DNA مکمل

سنتز DNA مکمل با استفاده از کیت شرکت addbio کشور کره انجام شد. طبق دستورالعمل شرکت سازنده، دو میکرولیتر RNA استخراج شده، سه میکرولیتر آب تیمار شده با DEPC، دو میکرولیتر آغازگر oligo(dt)، دو میکرولیتر dNTP، ۱۰ میکرولیتر بافر و یک میکرولیتر Addscript Enzyme را در یک میکروتیوپ مخلوط (حجم نهایی ۲۰ میکرو لیتر) و تیوپها در دستگاه ترموسایکلر با چرخه های دمایی ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس، ۶۰ دقیقه در ۵۰ درجه سلسیوس و ۵ دقیقه در ۸۰ درجه سلسیوس نگهداری شد. DNA مکمل حاصل تا زمان مصرف در ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. ترکیبات، غلظت و مقادیر آنها برای ساخت DNA مکمل در هر واکنش در جدول ۳-۲ آورده شده است.

جدول ۳-۲- ترکیبات واکنش ساخت رشته اول DNA مکمل

| نام و غلظت ماده                  | مقدار برای هر واکنش (μl) |
|----------------------------------|--------------------------|
| 2x Reaction buffer               | ۱۰                       |
| 10 mM dNTP mixture (2.5 mM each) | ۲                        |
| 10x oligo dt                     | ۲                        |
| 20x AddScript Enzyme Solution    | ۱                        |



### ۳-۸-۴- طراحی آغازگر

برای طراحی آغازگر ژن اکتین به عنوان ژن کنترل داخلی و ژن متالوتیونین از نرم افزار پرایمر بلاست سایت NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) و Primer 3 (<https://primer3.ut.ee>) استفاده شد. همچنین آغازگر مربوط به ژن کدکننده آنزیم لاکاز از منابع (Goudopoulou *et al.*, 2010) انتخاب شد. توالی های طراحی شده (جدول ۳-۳)، برای سنتز به شرکت بیو مجیک ژن فرستاده شدند.

جدول ۳-۳ - مشخصات آغازگرهای مورد استفاده جهت بررسی تغییرات بیان ژن

| نام آغازگر | توالی (۵'→۳')             | دمای اتصال (°C) | طول قطعه تکثیری (bp) |
|------------|---------------------------|-----------------|----------------------|
| ACT-F      | AGAGCGGGAAATTGTGAGGG      | ۵۶              | ۲۰۹                  |
| ACT-R      | CGCCAGCTCCTTCAATACCA      | ۵۶              |                      |
| Poxa1bF    | CAACCAGATGGATTTTATCGCTCAA | ۵۶              | ۲۲۱                  |
| Poxa1bR    | GGAACGATTGGACATTGCGTAACC  | ۵۶              |                      |
| Met F      | ATTGGTCCTACTGCTGGGTC      | ۵۶              | ۱۱۵                  |
| Met R      | TCTTCTGACAACCTGGCACA      | ۵۶              |                      |

### ۳-۸-۵- واکنش real time- PCR

در این آزمایش مخلوط واکنش real time- PCR شامل ۵ میکرولیتر مخلوط واکنش، ۰/۵ میکرولیتر از هر آغازگر و ۳ میکرولیتر آب است که به هر چاهک ۱ میکرولیتر DNA مکمل اضافه شد (جدول ۳-۴). پلیت ها در دستگاه real time- PCR (StepOne ABI) قرار داده شد. برنامه دمایی واکنش در جدول ۳-۳ آورده شده است.

جدول ۳-۴ - اجزاء مخلوط واکنش real-time PCR

| ماده                                             | مقدار ( $\mu\text{l}$ ) | غلظت                  |
|--------------------------------------------------|-------------------------|-----------------------|
| مخلوط واکنش (2X) Maxima SYBR Green/high ROX qPCR | ۵                       | -                     |
| آغازگر رفت                                       | ۰/۵                     | 0.15 $\mu\text{M}$    |
| آغازگر برگشت                                     | ۰/۵                     | 0.15 $\mu\text{M}$    |
| الگو DNA                                         | ۱                       | $\leq 100 \text{ ng}$ |
| آب عاری از نوکلئاز                               | ۳                       | -                     |
| جمع                                              | ۱۰                      | -                     |

جدول ۳-۵ - برنامه دمایی real-time PCR

| مرحله واکنش                    | دمای اتصال ( $^{\circ}\text{C}$ ) | زمان     | چرخه |
|--------------------------------|-----------------------------------|----------|------|
| فعال سازی و واسرشته سازی اولیه | ۹۵                                | ۱۰ دقیقه | ۱    |
| واسرشته سازی                   | ۹۵                                | ۱۵ ثانیه | ۳۵   |
| اتصال                          | ۵۶                                | ۳۰       |      |

### ۳-۸-۶- تجزیه و تحلیل داده های Real time- PCR

نرخ بیان ژن با استفاده از روش  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  اندازه گیری شد. بیان نرمال شده ی هر ژن با استفاده از نرم افزار Rest محاسبه شد.

## فصل چهارم

### نتایج و بحث

#### ۱-۴- جداسازی و خالص‌سازی جدایه‌های قارچی

در این بررسی از پنج نمونه خاک و دو نمونه پساب جمع‌آوری شده از معدن مس سرچشمه کرمان و یک نمونه خاک جمع‌آوری شده از معدن مس اهر در مجموع ۷۳ جدایه قارچ جداسازی و خالص‌سازی شد. فهرست جدایه‌ها در جدول ۱-۴ آورده شده‌است.

جدول ۱-۴- فهرست جدایه‌های قارچ جداسازی و خالص‌سازی شده در این تحقیق

| ردیف | نمونه | کد جدایه | منبع | محل جمع‌آوری   | موقعیت جغرافیایی                                   |
|------|-------|----------|------|----------------|----------------------------------------------------|
| ۱    | S1    | S1-1     | خاک  | معدن مس سرچشمه | طول $55^{\circ}51'45''$<br>عرض $29^{\circ}56'38''$ |
| ۲    |       | S1-3     |      |                |                                                    |
| ۳    |       | S1-4     |      |                |                                                    |
| ۴    |       | S1-5     |      |                |                                                    |
| ۵    |       | S1-6     |      |                |                                                    |
| ۶    |       | S1-7     |      |                |                                                    |
| ۷    |       | S1-8     |      |                |                                                    |
| ۸    |       | S1-9     |      |                |                                                    |
| ۹    |       | S1-10    |      |                |                                                    |
| ۱۰   |       | S1-11    |      |                |                                                    |
| ۱۱   |       | S1-12    |      |                |                                                    |
| ۱۲   |       | S1-13    |      |                |                                                    |
| ۱۳   |       | S1-14    |      |                |                                                    |
| ۱۴   |       | S1-15    |      |                |                                                    |
| ۱۵   |       | S1-16    |      |                |                                                    |
| ۱۶   |       | S2       |      |                |                                                    |
| ۱۷   | S2-2  |          |      |                |                                                    |
| ۱۸   | S3    | S3-1     | خاک  | معدن مس سرچشمه | طول $55^{\circ}51'45''$<br>عرض $29^{\circ}56'39''$ |
| ۱۹   |       | S3-2     |      |                |                                                    |
| ۲۰   |       | S3-3     |      |                |                                                    |
| ۲۱   |       | S3-4     |      |                |                                                    |
| ۲۲   |       | S3-5     |      |                |                                                    |
| ۲۳   |       | S3-8     |      |                |                                                    |
| ۲۴   |       | S3-9     |      |                |                                                    |
| ۲۵   |       | S3-10    |      |                |                                                    |
| ۲۶   |       | S3-11    |      |                |                                                    |
| ۲۷   |       | S3-12    |      |                |                                                    |
| ۲۸   |       | S3-13    |      |                |                                                    |
| ۲۹   |       | S3-14    |      |                |                                                    |
| ۳۰   |       | S3-15    |      |                |                                                    |
| ۳۱   |       | S3-16    |      |                |                                                    |
| ۳۲   | S3-17 |          |      |                |                                                    |
| ۳۳   | S3-18 |          |      |                |                                                    |
| ۳۴   | S3-19 |          |      |                |                                                    |
| ۳۵   | S3-20 |          |      |                |                                                    |
| ۳۶   | S3-21 |          |      |                |                                                    |
| ۳۷   | S3-22 |          |      |                |                                                    |
| ۳۸   | S5    | S5-1     |      |                |                                                    |
| ۳۹   |       | S5-2     |      |                |                                                    |
| ۴۰   |       | S5-3     |      |                |                                                    |
| ۴۱   |       | S5-4     |      |                |                                                    |
| ۴۲   |       | S5-5     |      |                |                                                    |

|               |                |     |       |    |    |
|---------------|----------------|-----|-------|----|----|
|               |                |     | S5-6  |    | ۴۳ |
|               |                |     | S5-7  |    | ۴۴ |
|               |                |     | S5-8  |    | ۴۵ |
|               |                |     | S5-9  |    | ۴۶ |
|               |                |     | S5-10 |    | ۴۷ |
| طول ۵۵°۵۱'۴۵" | معدن مس سرچشمه | خاک | S5-11 | S5 | ۴۸ |
| عرض ۲۹°۵۶'۳۹" |                |     | S5-12 |    | ۴۹ |
|               |                |     | S5-13 |    | ۵۰ |
|               |                |     | S5-14 |    | ۵۱ |
|               |                |     | S5-15 |    | ۵۲ |
|               |                |     | S7-3  | S7 | ۵۳ |
| -             | معدن مس اهر    | خاک | S7-4  |    | ۵۴ |
|               |                |     | W1-1  |    | ۵۵ |
|               |                |     | W1-2  |    | ۵۶ |
|               |                |     | W1-3  |    | ۵۷ |
|               |                |     | W1-4  |    | ۵۸ |
| طول ۵۵°۵۱'۴۵" | معدن مس سرچشمه | آب  | W1-5  | W1 | ۵۹ |
| عرض ۲۹°۵۶'۳۸" |                |     | W1-6  |    | ۶۰ |
|               |                |     | W1-7  |    | ۶۱ |
|               |                |     | W1-8  |    | ۶۲ |
|               |                |     | W1-9  |    | ۶۳ |
|               |                |     | W1-10 |    | ۶۴ |
|               |                |     | W2-1  |    | ۶۵ |
|               |                |     | W2-2  |    | ۶۶ |
|               |                |     | W2-4  |    | ۶۷ |
| طول ۵۵°۵۱'۴۵" | معدن مس سرچشمه | آب  | W2-5  | W2 | ۶۸ |
| عرض ۲۹°۵۶'۳۹" |                |     | W2-6  |    | ۶۹ |
|               |                |     | W2-7  |    | ۷۰ |
|               |                |     | W2-8  |    | ۷۱ |
|               |                |     | W2-9  |    | ۷۲ |
|               |                |     | W2-10 |    | ۷۳ |

#### ۴-۲- زیست‌سنجی جدایه‌ها

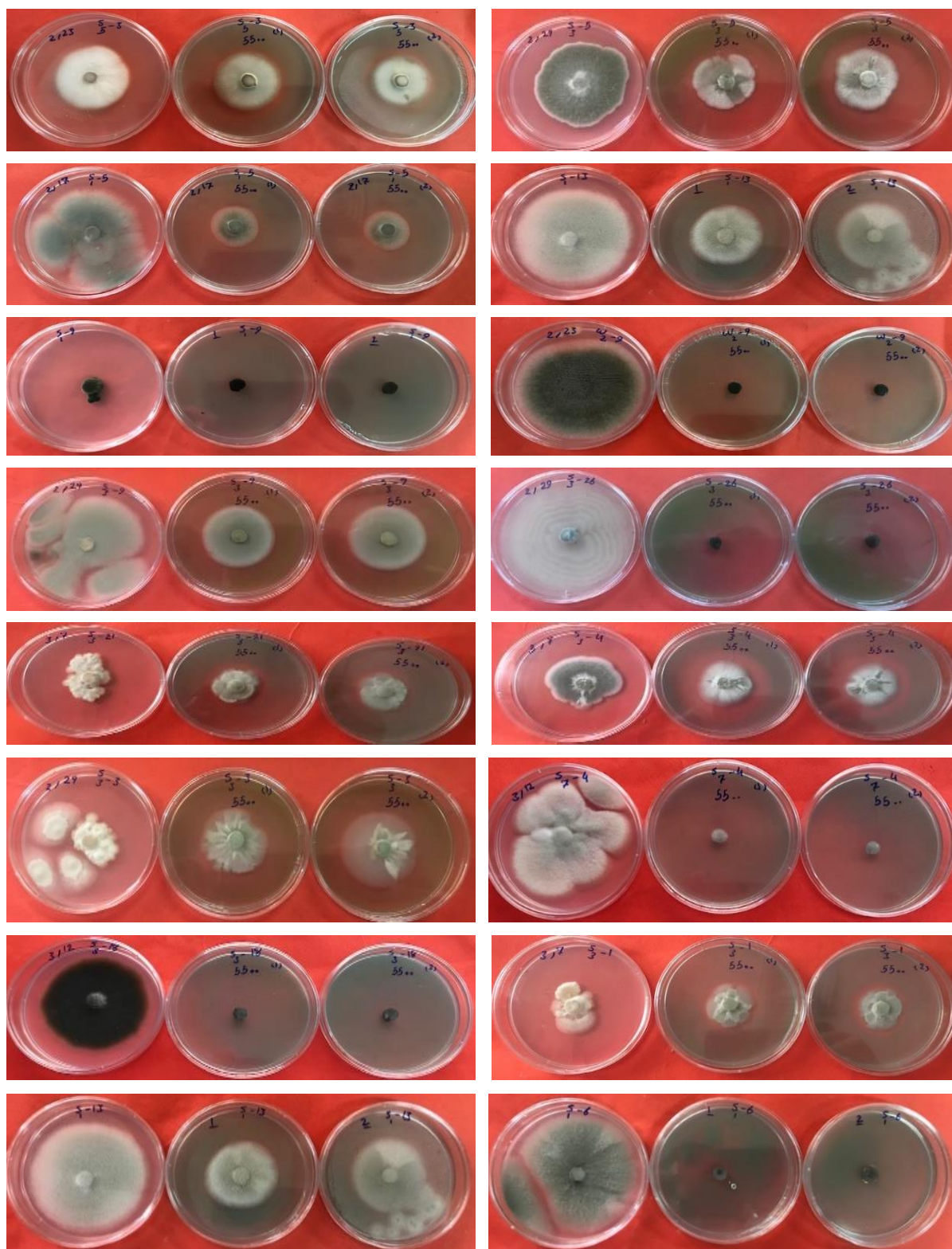
در این آزمایش اثر غلظت‌های مختلف سولفات مس (۱۰۰۰، ۱۵۰۰، ۳۵۰۰، ۴۰۰۰ و ۵۵۰۰ پی‌پی‌ام) بر رشد میسلیومی تمامی جدایه‌های خالص شده، مورد بررسی قرار گرفت. تمامی آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد و از محیط کشت بدون مس بعنوان شاهد استفاده شد. نتایج نشان داد که غلظت‌های ۱۰۰۰، ۱۵۰۰، ۳۵۰۰ و ۴۰۰۰ پی‌پی‌ام اثر بازدارندگی از رشد بر جدایه‌های قارچی نداشتند و تمامی جدایه‌ها قادر به رشد در محیط‌های حاوی مس بودند. فقط غلظت ۵۵۰۰ پی‌پی‌ام سولفات مس اثر بازدارندگی از رشد میسلیومی در جدایه‌های قارچی در مقایسه با شاهد نشان داد (شکل ۴-۱). لذا داده‌های بدست آمده در غلظت ۵۵۰۰ پی‌پی‌ام سولفات مس مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که جدایه‌های مختلف از نظر بازدارندگی رشد در سطح یک درصد با یکدیگر اختلاف معنی دار داشتند (جدول ۴-۲). همانطور که در شکل ۴-۲ نشان داده شده‌است، جدایه‌ها از نظر میزان بازدارندگی از رشد در تیمار ۵۵۰۰ پی‌پی‌ام سولفات مس در

سه گروه قرار گرفتند: گروه اول میزان بازدارندگی از رشد صد درصد داشتند (S1-1، S1-6، S1-8، S1-12، S3-2، S3-8، S3-10، S3-14، S3-17، S3-18، S3-22، W1-5، W1-6، W1-8، W2-2، W2-5، W2-6، W2-8، W2-9، S2-1، S7-3، S7-4)، گروه دوم درصد بازدارندگی بین ۶۰-۲۰ درصد داشتند (S1-4، S1-5، S1-3، S1-15، S1-13، S5-13، S1-9، S5-1، S3-15، S5-7، S5-15، S1-13، S3-20، S3-16، W2-4، S1-14، S3-5، S3-12، W1-10، S2-2، S3-13، W1-9، S3-11، S3-4، S1-7، S3-9، S5-3، S3-1) و در تعدادی از جدایه‌ها (S3-3، S5-8، S3-19، S7-1) تیمار ۵۵۰۰ پی‌پی‌ام سولفات مس اثر محرک رشد داشت. این آزمایش دو بار تکرار شد و نتایج مشابهی به دست آمد.

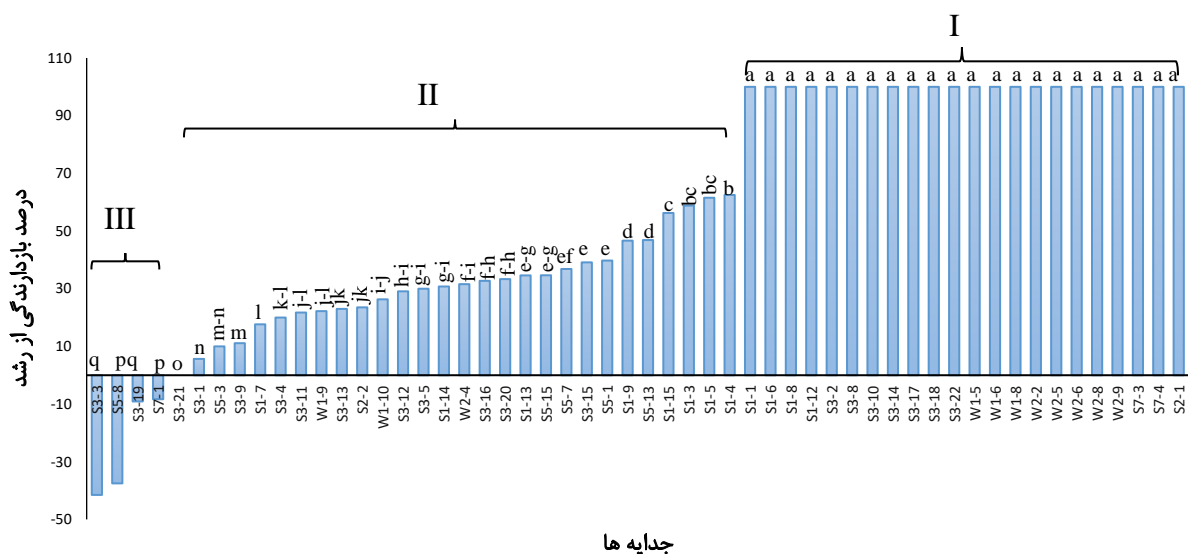
جدول ۴-۲- تجزیه واریانس بازدارندگی از رشد جدایه‌های مختلف قارچ تحت تیمار ۵۵۰۰ پی‌پی‌ام سولفات مس

| F        | میانگین مربعات | مجموع مربعات | درجه آزادی | منبع تغییرات |
|----------|----------------|--------------|------------|--------------|
| ۴۸۸/۹۲** | ۵۲۵۶/۸۹        | ۲۷۸۶۱۵       | ۵۳         | جدایه‌ها     |
|          | ۱۰/۷۵          | ۱۱۶۱         | ۱۰۸        | خطا          |
|          |                | ۲۷۹۷۷۶       | ۱۶۱        | کل           |

\*\* معنی‌دار در سطح یک درصد؛ ضریب تغییرات، ۵/۹۲



شکل ۴-۱- اثر بازدارندگی از رشد میسلیمی جدایه‌های فارچی روی محیط کشت PDA حاوی غلظت ۵۵۰۰ پی‌پی‌ام سولفات مس در مقایسه با شاهد پس از هفت روز (در هر تصویر به ترتیب از چپ به راست شاهد و دو تکرار تیمار می-باشد)



شکل ۴-۲- مقایسه میانگین درصد بازدارندگی از رشد جدایه‌های قارچ تحت تاثیر غلظت ۵۵۰۰ پی‌پی‌ام سولفات مس

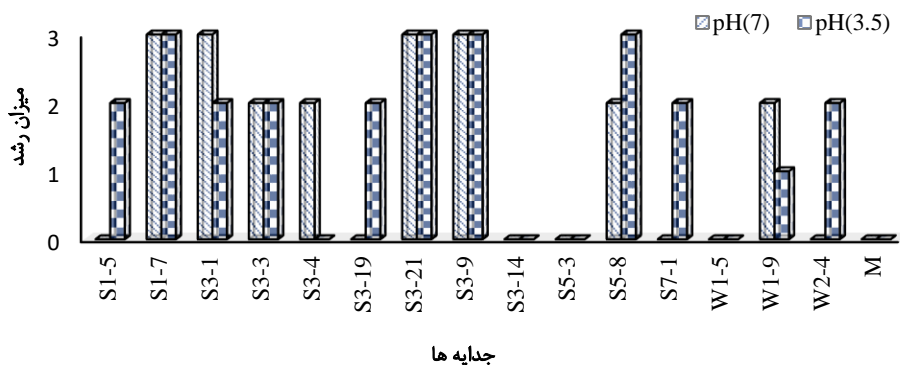
#### ۳-۴- بررسی رشد قارچ و اثر pH بر رشد قارچ‌ها در محیط مایع

در این آزمایش تاثیر غلظت ۵۵۰۰ پی‌پی‌ام سولفات مس بر رشد قارچ در محیط مایع و اثر pH اسیدی (۳/۵) و خنثی (pH = ۷) بر رشد ۱۵ جدایه منتخب از گروه‌های مختلف رشدی بررسی شد. از قارچ *Macrophomina phaseolina* به عنوان شاهد آزمایش استفاده شد. نتیجه آزمایش بصورت رشد (مثبت) و عدم رشد (منفی) جدایه‌ها در محیط مایع ارزیابی گردید و میزان رشد بصورت کم (۱)، متوسط (۲) و زیاد (۳) گروه‌بندی شد. در pH خنثی (pH = ۷): گروه اول شامل جدایه‌هایی (S7-، S5-3، S3-14، S3-19، S1-5)، گروه دوم (M و W2-4، W1-5، 1) است که قادر به رشد در محیط مایع حاوی سولفات مس نبودند، جدایه‌های S3-3، S3-4، S5-8 و W1-9 رشد متوسط (۲) داشتند و جدایه‌های S1-7، S3-1، S3-21 و S3-9 رشد زیاد (۳) در محیط مایع حاوی سولفات مس داشتند. در pH اسیدی (۳/۵)، جدایه‌هایی که قادر به رشد در محیط مایع نبودند شامل؛ S3-4، S3-14، S5-3، W1-5 و M، جدایه W1-9 رشد کم (۱)، جدایه‌هایی که رشد متوسط (۲) داشتند شامل؛ S1-5، S3-1، S3-3، S3-19، S7-1 و W2-4 و جدایه‌هایی که رشد زیاد (۳) داشتند شامل؛ S1-7، S3-21، S3-9 و S5-8 بودند. همانطور که در شکل ۴-۳ مشاهده می‌شود، تعداد جدایه‌هایی که میزان



رشد آن‌ها صفر است در pH خنثی بیشتر از pH اسیدی بوده‌است. در نتیجه میزان بازدارندگی از رشد در pH خنثی بیشتر از pH اسیدی است.

همچنین جدایه‌های S1-7، S3-21 و S3-9 در هر دو محیط با pH اسیدی و خنثی رشد زیاد (۳) داشتند. جدایه S3-1 در محیط با pH خنثی رشد زیاد و در محیط با pH اسیدی رشد متوسط داشت. جدایه‌های S1-5، S3-19، S7-1 و W2-4 فقط در محیط اسیدی قادر به رشد بودند و افزایش pH از اسیدی به خنثی باعث بازدارندگی کامل رشد این جدایه‌ها گردید. در حالی‌که، جدایه S3-4 فقط در محیط خنثی قادر به رشد بود و کاهش اسیدیته محیط منجر به توقف کامل رشد این جدایه گردید. این آزمایش دو بار تکرار شد و نتایج مشابهی داشت. در پایان سه جدایه S1-7، S3-21 و S3-1 که قادر به رشد در محیط جامد و مایع با هر دو اسیدیته بودند برای مطالعات بعدی انتخاب شدند.



شکل ۴-۳- بررسی اثر pH بر رشد قارچ‌های منتخب از گروه‌های مختلف رشدی در محیط مایع حاوی غلظت ۵۵۰۰ پی‌پی‌ام سولفات مس. M جدایه *Macrophomina phaseolina* شاهد آزمایش است.

#### ۴-۴- اثر متقابل غلظت و جدایه

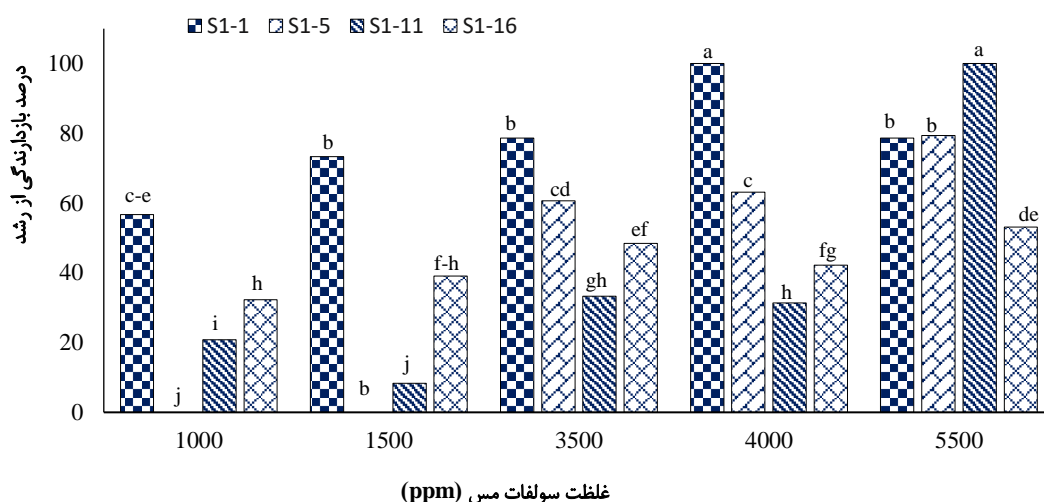
به منظور بررسی روند بازدارندگی از رشد جدایه‌ها در غلظت‌های مختلف سولفات مس، چهار جدایه (S1-1، S1-5، S1-11 و S1-16) بطور تصادفی از بین گروه‌های مختلف مشخص شده در آزمون زیست‌سنجی، انتخاب و روند تاثیر غلظت‌های مختلف (۱۰۰۰، ۱۵۰۰، ۳۵۰۰، ۴۰۰۰ و ۵۵۰۰ پی‌پی‌ام) سولفات مس بر آن‌ها ارزیابی

شد. این آزمایش بصورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. نتایج نشان داد که جدایه‌ها و غلظت‌های مختلف با یکدیگر در سطح یک درصد اختلاف معنی‌دار داشتند و همچنین اثر متقابل جدایه و غلظت نیز در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۴-۳). همانطور که در شکل ۴-۴ مشاهده می‌شود، بطور کلی با افزایش میزان غلظت فلز مس میزان بازدارندگی از رشد سه جدایه S1-16، S1-11 و S1-5 افزایش یافت، ولی با افزایش میزان غلظت مس میزان بازدارندگی در جدایه S1-1 کاهش یافته‌است. بیشترین بازدارندگی از رشد (۱۰۰ درصد) در غلظت ۴۰۰۰ پی‌پی‌ام در جدایه S1-1 و غلظت ۵۵۰۰ پی‌پی‌ام در جدایه S1-11 مشاهده شد. با توجه به یکسان بودن شرایط از جمله غلظت و اسیدیته محیط کشت در تمامی آزمایش‌ها، تفاوت جزئی در الگوی رشدی برخی از جدایه‌ها در آزمایش‌های مختلف می‌تواند ناشی از نوسانات احتمالی دما در طول دوره رشد باشد.

جدول ۴-۳ - جدول تجزیه واریانس بازدارندگی از رشد ۴ جدایه تحت تیمار ۵ غلظت مختلف سولفات مس

| F        | میانگین مربعات | مجموع مربعات | درجه آزادی | منبع تغییرات |
|----------|----------------|--------------|------------|--------------|
| ۲۸۲/۰۰** | ۵۰۸۳/۸۹        | ۱۵۲۵۱/۷      | ۳          | جدایه‌ها     |
| ۲۹۷/۱۴** | ۵۳۵۶/۷۱        | ۲۱۴۲۶/۸      | ۴          | غلظت         |
| ۶۷/۵۵**  | ۱۲۱۷/۷۲        | ۱۴۶۱۲/۶      | ۱۲         | جدایه*غلظت   |
|          | ۱۸/۰۳          | ۷۲۱/۱        | ۴۰         | خطا          |
|          |                | ۵۲۰۱۲/۳      | ۵۹         | کل           |

\*\* معنی‌دار در سطح یک درصد؛ ضریب تغییرات، ۸/۵۰



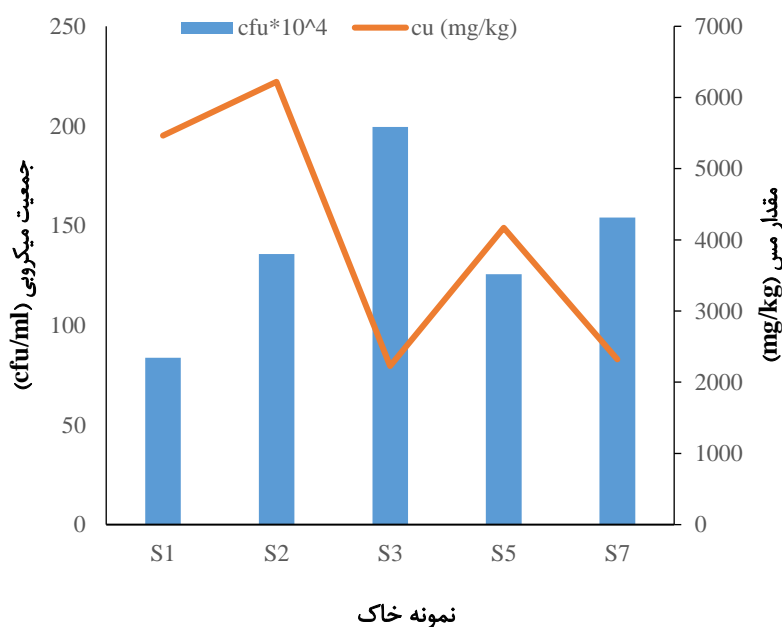
شکل ۴-۴ - مقایسه درصد بازدارندگی از رشد میسلیومی ۴ جدایه تحت تیمار ۵ غلظت سولفات مس

#### ۵-۴ - بررسی ارتباط بین میزان مس موجود در خاک و جمعیت میکروبی

در این آزمایش ابتدا میزان مس موجود در هر نمونه خاک توسط دستگاه جذب اتمی اندازه گیری شد. همچنین جمعیت میکروبی در هر نمونه با استفاده از کشت سریال رقت روی محیط کشت بر حسب واحد تشکیل دهنده کلونی در واحد حجم (cfu/ml) محاسبه شد. همانطور که در شکل ۴-۵ مشاهده می شود، در خاک های دارای مس بیشتر، جمعیت میکروبی کمتری مشاهده شده است. بیشترین جمعیت میکروبی در نمونه خاک شماره ۳ مشاهده شد که دارای کمترین مقدار مس (۲۲۲۷/۵ میلی گرم/کیلوگرم) بوده است.

سمیت فلزات سنگین بر تعداد، تنوع و فعالیت میکروبی میکروارگانیسم های خاک اثر می گذارد. از میان این فلزات، مس که از نظر کشاورزی نیز مهم است، از نظر شیمیایی به شدت انفعالی است. می تواند با اجزای آلی و معدنی خاک واکنش دهد و با سولفید، کربنات، هیدروکسید و سایر آنیون ها رسوب تشکیل دهد (Dumestre *et al.*, 1999). ساختار و تنوع جامعه میکروبی خاک به شدت به تغییرات محیطی خاک حساس است و اغلب به عنوان شاخص آلودگی خاک به فلزات به شمار می رود (Tang *et al.*, 2019). مطالعات مختلف تکامل جامعه میکروبی خاک تحت تاثیر آلودگی طولانی مدت به فلزات سنگین را نشان داده است (Wang *et al.*, 2015;

(Song et al., 2018; Tang et al., 2019). سانگ و همکاران (۲۰۱۸) نشان دادند که جوامع میکروبی خاک تحت غلظت‌های مختلف فلزاتی چون مس و کادمیوم و همچنین خصوصیات فیزیکوشیمیایی خاک تغییر می‌کند (Song et al., 2018). وانگ و پکورارو (۲۰۲۱) با بررسی تنوع جوامع میکروبی در خاک‌های آتشفشانی نشان دادند که قارچ‌ها در مقایسه با باکتری‌ها نسبت به تغییرات محیطی و جغرافیایی حساسیت بیشتری دارند (Wang & Pecoraro, 2021). نتایج تحقیق حاضر با نتایج سایر محققین در خصوص کاهش جمعیت میکروبی خاک با افزایش غلظت فلزات سنگین در خاک از جمله مس مطابقت دارد.



شکل ۴-۵- میزان مس و جمعیت میکروبی موجود در هر نمونه خاک

#### ۴-۶- شناسایی مولکولی جدایه‌های قارچی

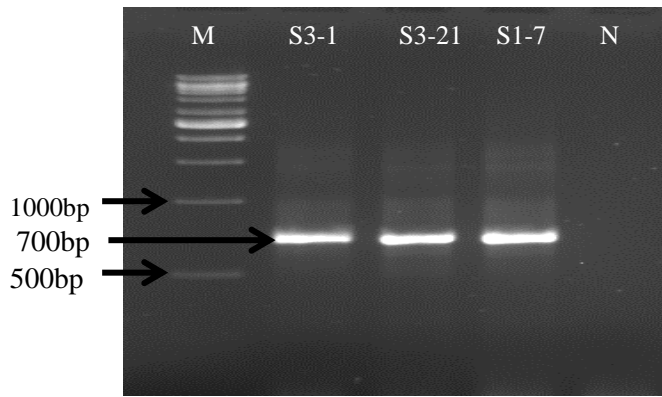
براساس نتایج آزمون‌های زیست‌سنجی سه جدایه قارچی S3-1، S3-21 و S1-7 که قابلیت رشد در محیط جامد و مایع حاوی غلظت ۵۵۰۰ پی‌پی‌ام را داشتند، انتخاب شدند (شکل ۴-۶) و مورد شناسایی مولکولی قرار گرفتند. به منظور شناسایی گونه‌های قارچی، ابتدا از آغازگرهای ITS1 و ITS4 استفاده شد. در سه جدایه بررسی شده قطعه تقریباً ۷۰۰ جفت بازی مربوط به ناحیه ITS1، 5.8S و ITS2 تکثیر (شکل ۴-۷) و تعیین

توالی شد. پس از بلاست کردن توالی‌های نوکلئوتیدی (Blastn) در پایگاه اطلاعاتی NCBI و تایید صحت قطعه توالی بابتی شده، توالی‌های مورد نظر با توالی‌های دریافت شده از پایگاه اطلاعاتی NCBI به کمک نرم‌افزار Mega X و Clustal X هم‌ردیف و درخت توافقی به کمک نرم‌افزار Mega X و Mrbays ترسیم شد. بر اساس توالی ناحیه ITS1، ITS2 و 5.8S جدایه S3-1 با ۹۹/۰۷ درصد تشابه با HM561985 به گونه *Pleurotus* *eryngii* و جدایه S1-7 به با ۹۲/۶۲ درصد تشابه با FJ379275 به جنس *Pleurotus* و جدایه S3-21 با ۹۷/۹۴ درصد تشابه با KT878333 به جنس *Sarocladium* sp. تعلق داشت. درخت توافقی ترسیم شده مربوط به جدایه‌ها در شکل‌های ۸-۴ و ۹-۴ آورده شده‌است. همانطور که در شکل ۸-۴ مشاهده می‌شود ناحیه ITS قادر به تفکیک گونه‌های جنس *Sarocladium* نمی‌باشد و مطالعات تکمیلی به منظور شناسایی دقیق گونه باید انجام شود.

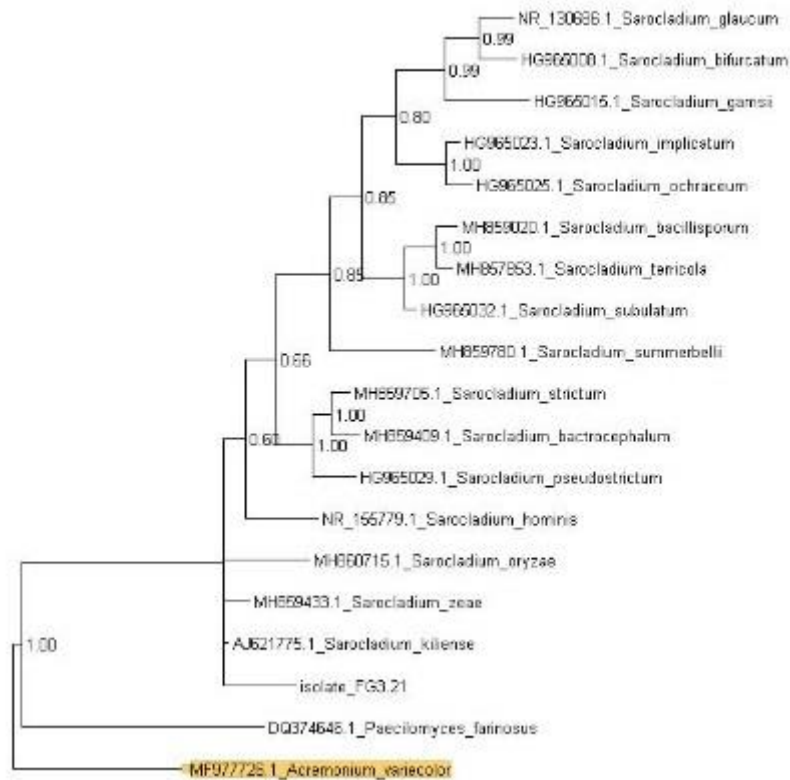
توالی جدایه‌های S3-1، S1-7 و S3-21 در پایگاه داده NCBI ثبت و به ترتیب با کدهای MW812027، OK044001 و OK054342 قابل دسترسی است. تحمل فلزات سنگین در گونه‌های جنس *Pleurotus* و *Acremonium* توسط سایر محققین گزارش شده‌است (Blaudez et al., 2000; Pezzella et al., 2009)، اما در گونه‌های شناسایی شده در تحقیق حاضر برای اولین بار گزارش می‌شود.



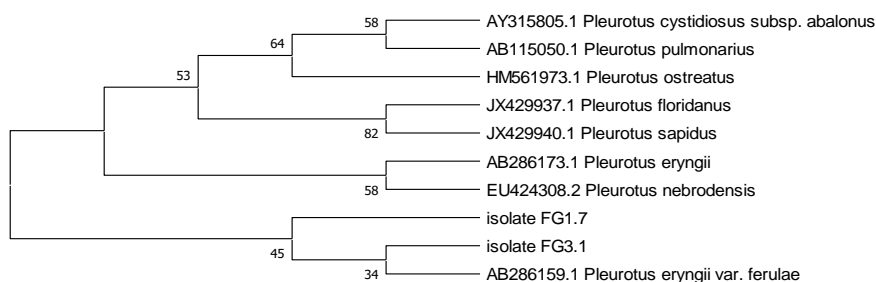
شکل ۴-۶- پرگنه جدایه‌های منتخب رشد یافته روی محیط PDA پس از پنج روز.



شکل ۴-۷- نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای ITS4 و ITS1F روی ژل آگارز ۱/۲ درصد (وزنی/حجمی). M نشانگر یک کیلو جفت بازی (NL-1411 Vivantis)، NC کنترل منفی می‌باشد.



شکل ۴-۸- رابطه فیلوژنتیکی جدایه S3-21 با استفاده از نرم افزار Mrbays بر اساس توالی ناحیه ITS.



شکل ۴-۹ - رابطه فیلوژنتیکی جدایه‌های S3-1 و S1-7 با استفاده از روش گروه‌بندی Neighbor-Joining بر اساس

توالی ناحیه ITS.

#### ۴-۷ - اندازه‌گیری میزان مس جذب‌شده توسط میسلیم قارچ

میزان جذب مس توسط میسلیم قارچ و ساختار ریشه‌ها، با دستگاه جذب اتمی و میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) بررسی شد. نتایج این بررسی در جدول ۴-۴ و شکل ۴-۱۰ آورده شده است. در این بررسی از دو جدایه S1-7 و S3-21 که در شناسایی مولکولی به دو جنس *Pleurotus* و *Sarocladium* تعلق داشتند، استفاده شد.

در بررسی که توسط SEM صورت گرفت، قطر و ترکیبات ریشه در نقاط مختلف اندازه‌گیری شد، همچنین آنالیز EDS نقطه‌ای جدایه‌ها جذب ترکیباتی را در قسمت‌های مختلف ریشه نشان می‌دهد که بخش عمده این ترکیبات عناصری شامل O، P، K و C بودند که عمده ساختار شیمیایی بافت‌های زنده را تشکیل می‌دهند (شکل ۴-۱۱). همچنین در برخی نقاط از ریشه عنصر مس علاوه بر عناصر فوق وجود داشت که نشان‌دهنده جذب مس توسط ریشه قارچ است. بر اساس نتایج به‌دست آمده جذب مس در قسمت‌های مختلف ریشه بطور غیر یکنواخت بوده است. بیشترین مقدار مس موجود در ریشه ۲۳/۸۱ درصد (وزنی) بود که در جدایه S1-7 مشاهده شد. همچنین مقایسه قطر ریشه‌ها در نمونه‌ها نشان داد که، قطر ریشه در نمونه شاهد و تیمار شده با غلظت ۵۵۰۰ پی‌پی‌ام سولفات مس متفاوت است. همانطور که در جدول ۴-۴ مشاهده می‌شود، قطر ریشه

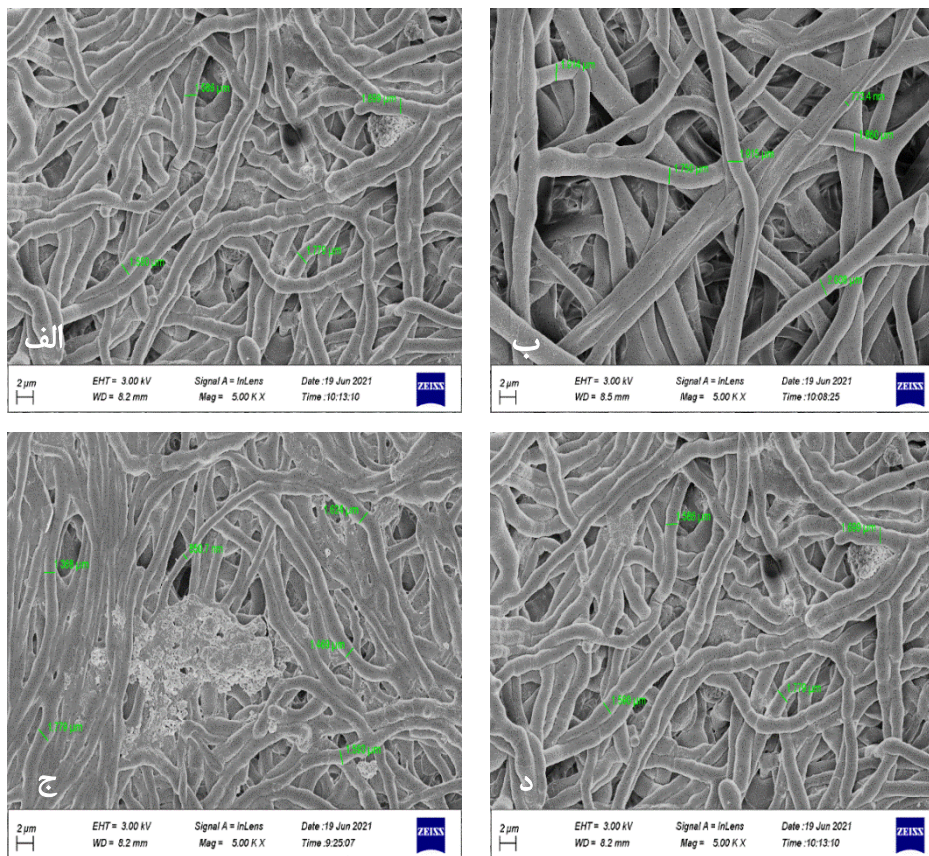
در جدایه S1-7 در شاهد بطور متوسط ۱/۷۰۳۴ میکرومتر و در تیمار بطور متوسط ۱/۶۶۳۵ میکرومتر می باشد. در جدایه S3-21 در شاهد قطر ریشه بطور متوسط ۲/۱۶۳ میکرومتر و در تیمار بطور متوسط ۱/۴۴۷۳ میکرومتر می باشد.

نتایج جذب اتمی نشان داد که میزان جذب مس در جدایه S3-21 بیشتر از جدایه S1-7 می باشد. با توجه به اینکه در روش جذب اتمی میزان مس جذب شده در ریشه بطور یکنواخت در توده میسلیمی اندازه گیری می شود و در روش SEM بصورت نقطه ای اندازه گیری شده است و با توجه به غیر یکنواخت بودن میزان جذب در ریشه، لذا تفاوت در نتایج این دو روش دور از انتظار نیست. بطور کلی می توان گفت که بدلیل جذب بیشتر مس در ریشه جدایه S3-21 کاهش قطر ریشه نیز در این جدایه مشاهده شده است. مطالعات مختلف نشان داده است که ریخت شناسی دیواره سلولی قارچ ها به دلیل تنش فلزات سنگین تغییر می کند. کاهش قطر ریشه در نمونه تیمار می تواند به دلیل جذب مس توسط ریشه می باشد. این نتایج نشان دهنده نقش فعال قارچ در جذب زیستی فلزات سنگین است (Jacob et al., 2018). نتایج تحقیق حاضر با نتایج این محققین در خصوص تغییر ریخت شناسی ریشه در تیمار سولفات مس مطابقت دارد.

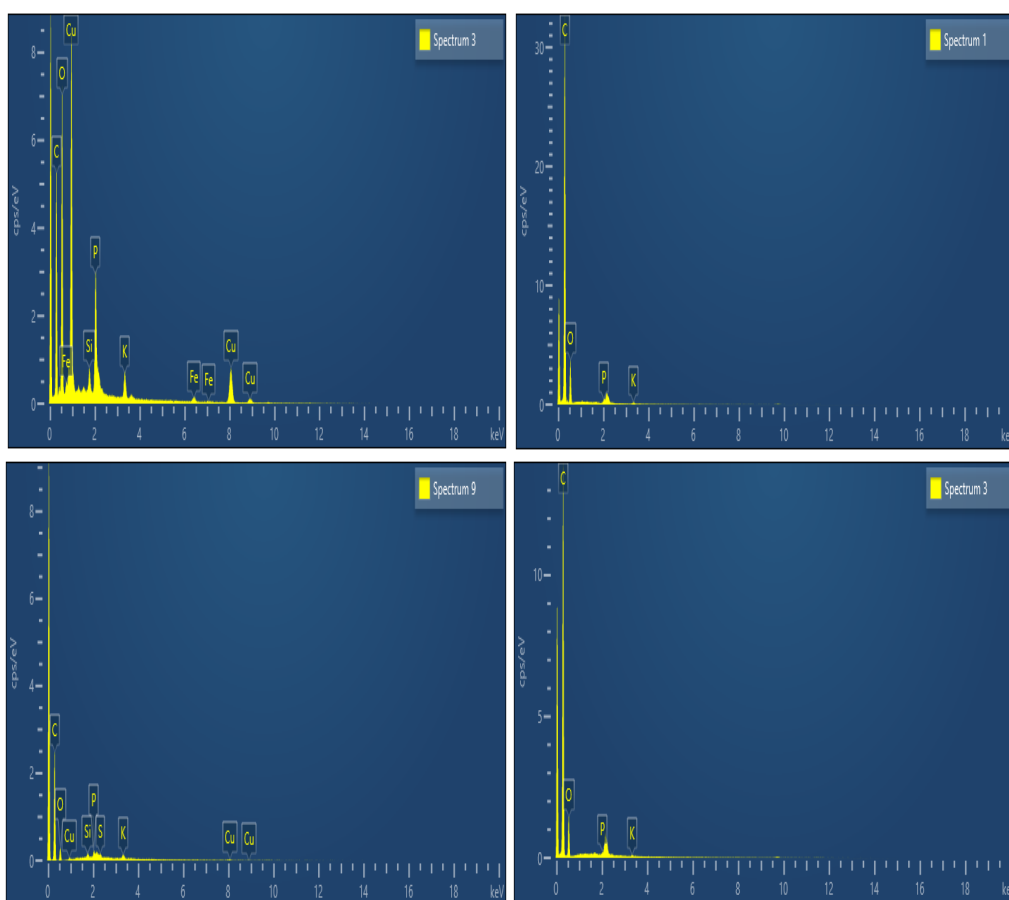
جدول ۴-۴ - مقادیر مس جذب شده در نمونه های تیمار شده با غلظت ۵۵۰۰ پی پی ام سولفات مس و شاهد

| نمونه | جذب اتمی (mg/kg) |                | میکروسکوپ الکترونی روبشی (% وزنی) |
|-------|------------------|----------------|-----------------------------------|
|       | ریشه             | محیط فیلتر شده |                                   |
| S1-7  | ۱۹۸۰۰۰           | ۰/۵۷۵          | شاهد<br>تیمار<br>۲۳/۸۱            |
| S3-21 | ۲۴۹۹۰۰           | ۰/۲۴۲          | شاهد<br>تیمار<br>۴/۱۹             |





شکل ۴-۱۰ - تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) جدایه‌ها با بزرگنمایی  $500\times$ . جدایه S1-7 رشد یافته در محیط مایع حاوی پی‌پی‌ام سولفات مس پس از هفت روز (الف)، جدایه S1-7 رشد یافته در محیط مایع بدون سولفات مس (ب)، جدایه S3-21 رشد یافته در محیط مایع حاوی پی‌پی‌ام سولفات مس پس از هفت روز (ج)، جدایه S3-21 رشد یافته در محیط مایع بدون سولفات مس (د).

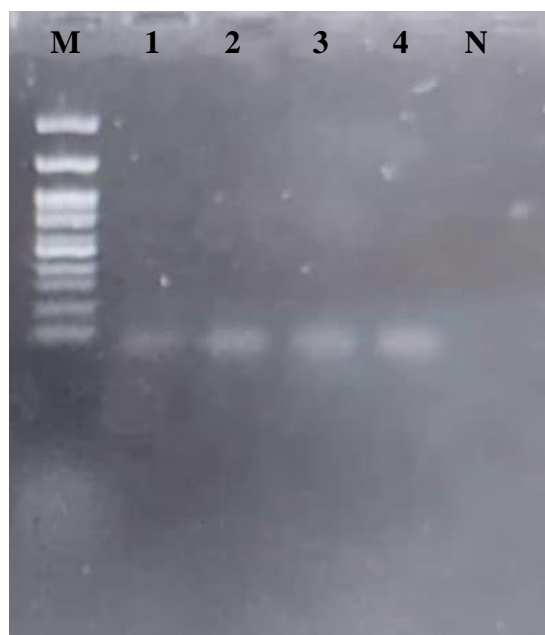


شکل ۴-۱۱ - آنالیز EDS نقطه ای جدایه‌ها. جدایه S1-7 رشد یافته در محیط مایع حاوی ۵۵۰۰ پی‌پی‌ام سولفات مس پس از هفت روز (الف)، جدایه S1-7 رشد یافته در محیط مایع بدون سولفات مس (ب)، جدایه S3-21 رشد یافته در محیط مایع حاوی ۵۵۰۰ پی‌پی‌ام سولفات مس پس از هفت روز (ج)، جدایه S3-21 رشد یافته در محیط مایع بدون سولفات مس (د).

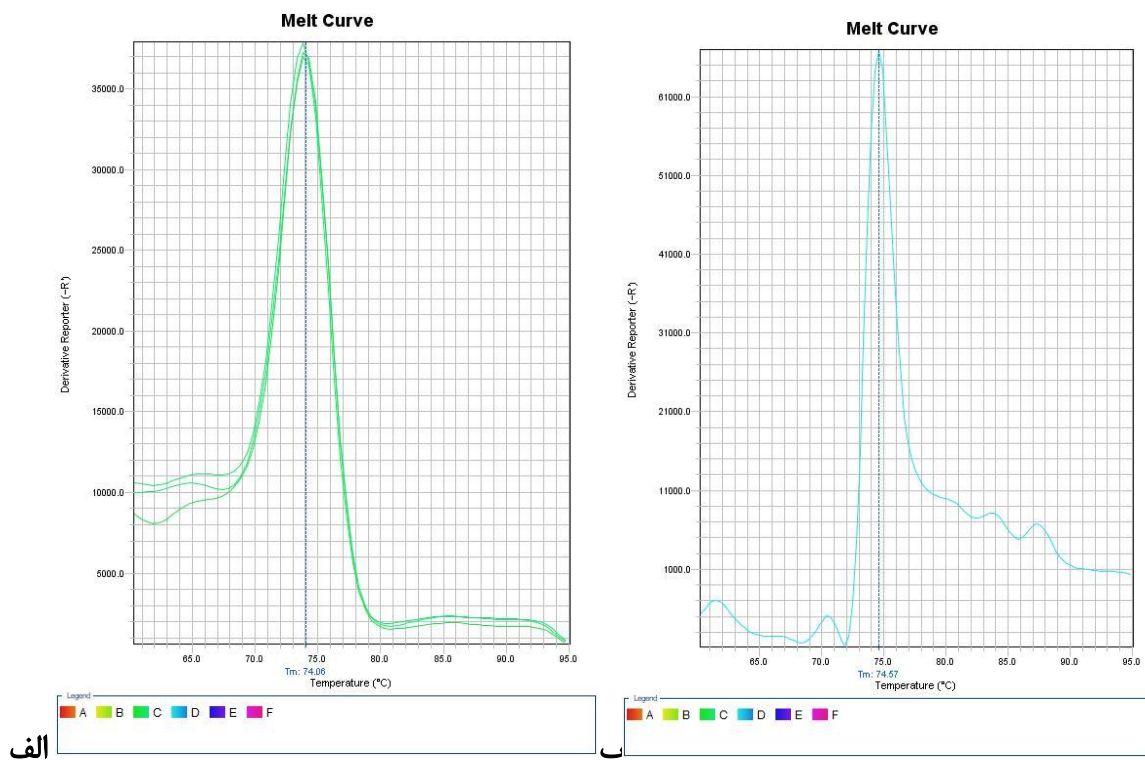
#### ۴-۸ - بررسی تغییرات بیان ژن لاکاز در جدایه‌های منتخب تحت تیمار مس

در این تحقیق به منظور بررسی تغییرات بیان ژن لاکاز در سه جدایه منتخب متحمل به غلظت ۵۵۰۰ پی‌پی‌ام سولفات مس، نمونه‌برداری در سه نقطه زمانی انجام شد. سپس استخراج RNA، سنتز DNA مکمل و واکنش real-time PCR با استفاده از 5x Hot FIREPOL EvaGreen HRM Mix در دستگاه step one ABI انجام شد. از ژن اکتین به عنوان کنترل داخلی استفاده شد (Castanera *et al.*, 2012; Fueyo *et al.*, 2014). به

منظور اطمینان از سنتز DNA مکمل، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگر ژن مرجع انجام شد (شکل ۴-۱۲). مقدار آغازگر و دمای اتصال آغازگر از فاکتورهای مهم در بهینه‌سازی واکنش real-time PCR به شمار می‌آید. در این تحقیق شرایط بهینه به گونه‌ای فراهم شد که بازدهی واکنش در بهترین حالت ممکن باشد و هیچ محصول غیراختصاصی در طول واکنش تولید نشود. این امر با مشاهده یک پیک منفرد در منحنی ذوب تأیید شد (شکل ۴-۱۳).



شکل ۴-۱۲ - نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمرز DNA مکمل با استفاده از آغازگر ژن اکتین روی ژل آگارز ۱/۵ درصد (وزنی/حجمی). M نشانگر ۱۰۰ جفت بازی، لاین‌های ۱ تا ۴ مربوط نمونه DNA مکمل و لاین N کنترل منفی شامل آب مقطر می‌باشد.



شکل ۴-۱۳- تجزیه و تحلیل منحنی ذوب ژن های لاکاز (الف)، اکتین (ب).

تجزیه و تحلیل واریانس داده‌های میانگین بیان ژن لاکاز تحت تیمار ۵۵۰۰ پی‌پی‌ام سولفات مس در جدایه‌های مختلف در زمان‌های مختلف (جدول ۴-۵) نشان داد، جدایه‌های مختلف، تیمارهای مختلف و اثر متقابل قارچ × تیمار در سطح یک درصد با هم اختلاف معنی‌دار داشتند. زمان‌های مختلف نمونه‌برداری و اثر متقابل قارچ × زمان غیر معنی‌دار و اثر متقابل زمان × تیمار در سطح پنج درصد معنی‌دار بود. با توجه به اینکه میزان رشد توده‌زیستی قارچ در تیمارها، ۳ روز پس از کشت در مقایسه با شاهد اختلاف قابل توجهی داشت و بدلیل عدم وجود توده‌زیستی کافی در تیمار و ایجاد خطا در نتایج بررسی بیان ژن، لذا داده‌های روز سوم در تجزیه و تحلیل بیان ژن استفاده نشد.

جدول ۴-۵- جدول تجزیه واریانس داده‌های بیان ژن لاکاز در ۳ جدایه تحت تیمار ۵۵۰۰ پی‌پی‌ام سولفات مس در

زمان‌های مختلف

| F                   | میانگین مربعات | مجموع مربعات | درجه آزادی | منبع تغییرات    |
|---------------------|----------------|--------------|------------|-----------------|
|                     | ۰/۰۰۵۴۱        | ۰/۰۱۰۸۲      | ۲          | تکرار           |
| ۴۳/۸۷*              | ۱/۷۵۲۰۰        | ۳/۵۰۴        | ۲          | قارچ            |
| ۴۴/۹۹ <sup>ns</sup> | ۱/۷۹۶۶۸        | ۱/۷۹۶۶۸      | ۱          | زمان            |
| ۴/۴۳**              | ۰/۱۷۶۸۵        | ۰/۱۷۶۸۵      | ۱          | تیمار           |
| ۱۵/۸۳ <sup>ns</sup> | ۰/۶۳۲۲۰        | ۱/۲۶۴۴۰      | ۲          | قارچ*زمان       |
| ۱/۳۱**              | ۰/۰۵۲۴۱        | ۰/۱۰۴۸۳      | ۲          | قارچ*تیمار      |
| ۶/۴۴*               | ۰/۲۵۷۲۰        | ۰/۲۵۷۲۰      | ۱          | زمان*تیمار      |
| ۲/۳۸ <sup>ns</sup>  | ۰/۰۹۵۱۱        | ۰/۱۹۰۲۲      | ۲          | قارچ*زمان*تیمار |
|                     | ۰/۰۳۹۹۴        | ۰/۸۷۸۶۰      | ۲۲         | خطا             |
|                     |                | ۸/۱۸۳۵۹      | ۳۵         | کل              |

ضریب تغییرات: ۱۸/۶۹؛ \* معنی‌دار در سطح ۵ درصد، \*\* معنی‌دار در سطح یک درصد، ns غیر معنی‌دار

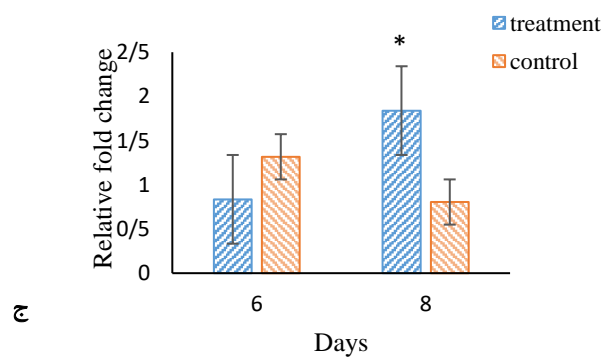
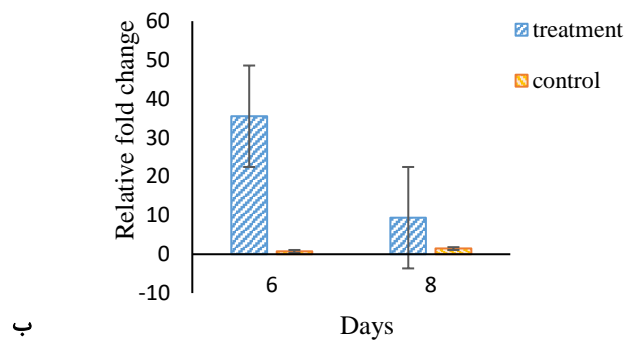
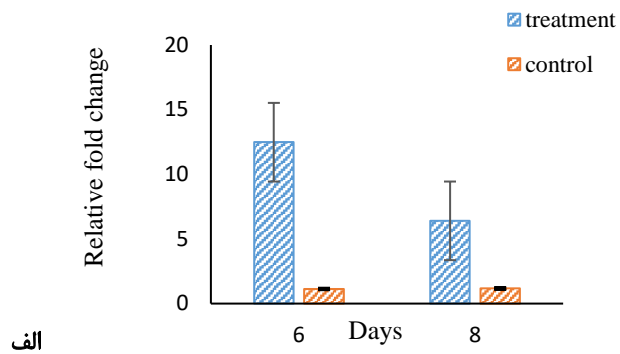
تغییرات بیان ژن لاکاز در سه جدایه S3-1، S1-7 و S3-21 تحت تیمار ۵۵۰۰ پی‌پی‌ام سولفات مس ۶ و ۸ روز پس از کشت در مقایسه با شاهد در شکل ۴-۱۴ نشان داده شده‌است. همانطور که در شکل ۴-۱۴ الف مشاهده می‌شود بیان ژن لاکاز در جدایه S3-1 شش روز پس از کشت ۱۰ برابر شاهد و در روز هشتم حدود ۳/۵ برابر شاهد (محیط بدون سولفات مس) بود. بیان ژن لاکاز در روز هشتم در مقایسه با روز ششم در تیمار حاوی سولفات مس کاهش (یک دوم) و در شاهد افزایش (حدود ۱/۵ برابر) داشته است. بیان ژن لاکاز در جدایه S1-7، در روز ششم ۲۸ برابر شاهد و در روز هشتم ۴ برابر شاهد بود. روند تغییرات بیان ژن در تیمار سولفات مس کاهش (یک سوم) و در شاهد افزایش (حدود ۲ برابر) نشان داد (شکل ۴-۱۴ ب). بیان ژن لاکاز در جدایه S3-21، در روز ششم حدود یک برابر شاهد و در روز هشتم ۲ برابر شاهد بوده‌است. روند تغییرات بیان ژن در تیمار سولفات مس افزایش (حدود ۲ برابر) و در شاهد کاهش (دو سوم) نشان داد (شکل ۴-۱۴ ج). با توجه به اینکه دو جدایه S3-1 و S1-7 هر دو به جنس *Pleurotus* تعلق داشتند لذا روند مشابه تغییرات بیان ژن در این دو جدایه قابل انتظار است. همچنین جدایه S3-21 که به جنس *Sarocladium* تعلق داشت، روند تغییر بیان ژن متفاوتی نسبت به سایر جدایه‌ها نشان داد.

آنزیم لاکاز در قارچ‌ها برای عملکردهای مختلفی از جمله پاسخ به تنش‌ها استفاده می‌شود (Sjaarda *et al.*, 2015). بررسی‌ها نشان داد که افزودن مقدار ۰/۵ تا ۵ میلی‌مولار مس به قارچ *Pleurotus ostreatus* کشت‌شده روی محیط مایع حاوی مقادیر محدود نیتروژن موجب افزایش میزان فعالیت آنزیم لاکاز ۱۲ روز پس از کشت می‌شود. روند افزایشی از روز ۱۲ تا ۲۰ ادامه دارد، اما قبل از روز ۱۲ مقدار فعالیت آنزیم افزایشی نشان نمی‌دهد (Baldrian & Gabriel, 2002). تغییر تنظیم بیان ژن لاکاز و تولید آنزیم در پاسخ به شرایط کشت توسط محققین گزارش شده‌است (Buswell *et al.*, 1995; Ohga & Royse, 2001; Yaver *et al.*, 1996). ترکیبات مختلفی نیز وجود دارند که فعالیت لاکاز را تنظیم می‌کنند. یکی از تنظیم‌کننده‌های فعالیت آنزیم لاکاز، فلزات سنگین هستند که یا بطور طبیعی در محیط وجود دارند (مانند مس) و یا در نتیجه فعالیت بشر به محیط اضافه شده‌اند (مانند کادمیوم، جیوه و سرب) (Koeleman *et al.*, 1999).

پالمیری و همکاران (۲۰۰۰) تغییرات بیان ایزوآنزیم‌های فنل اکسیداز (POX) شامل POXA1B، POXA2 و POXC را در قارچ *Pleurotus ostreatus* تحت تیمارهای مختلف بررسی کردند. نتایج این محققین نشان داد که مس موثرترین القاگر فعالیت آنزیم لاکاز است. همچنین آر آن آ پیک *poxa1b* فراوان‌ترین رونوشت القا شده در تمام زمان‌های رشدی است و مقدار آن تا روز هفتم افزایش می‌یابد. نتایج نشان داد که فعالیت خارج سلولی ایزوآنزیم POXA1B تا سه روز قابل تشخیص نمی‌باشد و وسترن بلات کاهش قابل توجه در غلظت این ایزوآنزیم را نشان می‌دهد و افزایش رونوشت *poxa1b* از روز سوم شروع می‌گردد.

وجود بیش از یک ژن کدکننده لاکاز در قارچ‌های مختلف گزارش شده‌است. برای مثال در قارچ *Rhizoctonia solani* چهار توالی متفاوت دی آن آ مکمل (Wahleithner *et al.*, 1996) ، در قارچ *Trametes villosa* پنج ژن لاکاز (Yaver *et al.*, 1996) ، سه توالی ژنومی در *Pleurotus ostreatus* (Giardina *et al.*, 1999) و دو ژن در *Agaricus bisporus* (Smith *et al.*, 1998) معرفی شد. افزودن سولفات مس (CuSO<sub>4</sub>) به محیط مایع منجر به افزایش قابل توجه فعالیت لاکاز کل و تولید ایزوآنزیم POXA1B می‌شود (Giardina *et al.*, 1999).

در تحقیق حاضر نیز بیان ایزوآنزیم POXA1B لاکاز مورد بررسی قرار گرفت. در جدایه‌های قارچی مورد بررسی بیان ژن *pox1b* از روز ششم تا هشتم به بعد در گونه *Pleurotus eryngii* کاهش و در جنس *Sarocladium* افزایش داشته‌است که نشان‌دهنده نقش آنزیم لاکاز در تحمل به سولفات مس در جنس *Sarocladium* می‌باشد. اما در گونه *Pleurotus eryngii* به نظر می‌رسد از روز ششم به بعد مکانیسم دیگری در تحمل به سولفات مس دخالت داشته‌است. افزایش بیان ژن *pox1b* تا روز هفتم توسط سایر محققین (Palmieri *et al.*, 2000) نیز گزارش شده‌است. سایر تفاوت‌های موجود به تفاوت در جنس و گونه قارچی مورد بررسی مربوط می‌باشد.

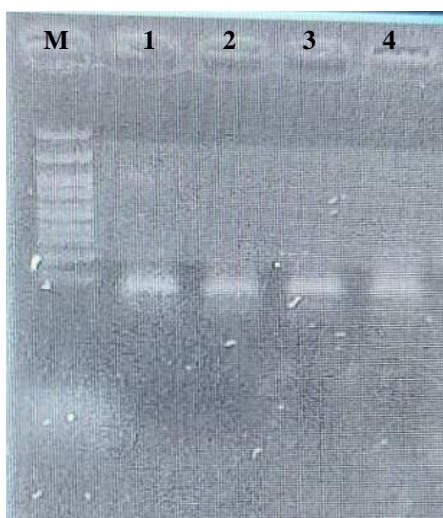


شکل ۴-۱۴ - تغییرات بیان ژن لاکاز در جدایه S3-1 (الف) و S1-7 (ب) و S3-21 (ج). برای نرمال کردن داده‌ها از ژن اکتین استفاده شد. \* نشان دهنده افزایش بیان ژن لاکاز در تیمار در مقایسه با روز ششم می‌باشد.



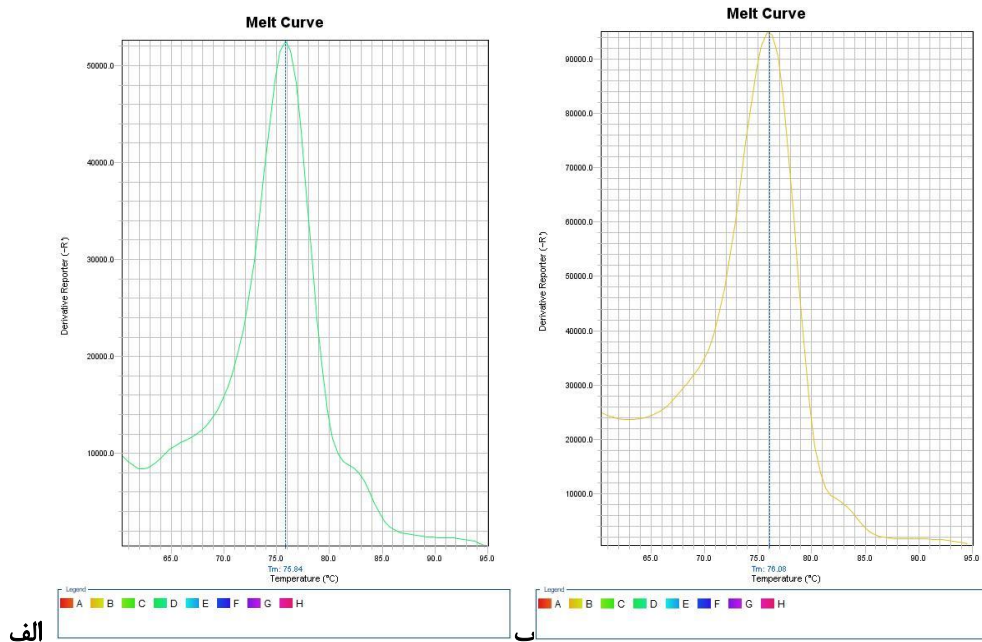
#### ۹-۴- بررسی تغییرات بیان ژن متالوتیونین در جدایه‌های منتخب تحت تیمار مس

به منظور بررسی تغییرات بیان ژن متالوتیونین مانند آنچه در مورد بررسی ژن لاکاز گفته شد، انجام گردید. به منظور اطمینان از سنتز DNA مکمل و بهینه سازی دمای اتصال، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگر ژن متالوتیونین انجام شد (شکل ۴-۱۵). همچنین شرایط واکنش real-time PCR به گونه‌ای بهینه شد که هیچ محصول غیر اختصاصی در طول واکنش تولید نشود و یک پیک منفرد در منحنی ذوب به دست آید (شکل ۴-۱۶).



شکل ۴-۱۵- نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمرز DNA مکمل با استفاده از آغازگر ژن متالوتیونین روی ژل آگارز ۱/۵ درصد (وزنی/حجمی). M نشانگر ۱۰۰ جفت بازی، لاین‌های ۱ تا ۴ مربوط نمونه DNA مکمل می‌باشد.

تجزیه و تحلیل واریانس داده‌های میانگین بیان ژن متالوتیونین تحت تیمار ۵۵۰۰ پی‌پی‌ام سولفات مس در جدایه‌های مختلف در زمان‌های مختلف (جدول ۴-۶) نشان داد، جدایه‌های مختلف (در سطح ۵ درصد)، تیمارها، زمان‌های مختلف و اثر متقابل زمان × تیمار در سطح یک درصد با هم اختلاف معنی‌دار داشتند. اثر متقابل قارچ × زمان و متقابل قارچ × تیمار غیر معنی‌دار بود. در این آزمایش نیز داده‌های روز سوم در تجزیه و تحلیل بیان ژن استفاده نشد.



شکل ۴-۱۶ - تجزیه و تحلیل منحنی ذوب ژن‌های متالوتیونین (الف)، اکتین (ب).

جدول ۴-۶ - جدول تجزیه واریانس داده‌های بیان ژن متالوتیونین در ۳ جدایه تحت تیمار ۵۵۰۰ پی‌پی‌ام سولفات مس در زمان‌های مختلف

| F        | میانگین مربعات | مجموع مربعات | درجه آزادی | منبع تغییرات    |
|----------|----------------|--------------|------------|-----------------|
|          | ۰/۰۰۸۳۴        | ۰/۰۱۶۶۹      | ۲          | تکرار           |
| ۵/۷۳ *   | ۰/۰۱۷۷۶        | ۰/۰۳۵۵۲      | ۲          | قارچ            |
| ۹/۳۸ **  | ۰/۰۲۹۱۰        | ۰/۰۲۹۱۰      | ۱          | زمان            |
| ۱۸/۳۹ ** | ۰/۰۵۷۰۲        | ۰/۰۵۷۰۲      | ۱          | تیمار           |
| ۲/۱۳ ns  | ۰/۰۰۶۶۰        | ۰/۰۱۳۲۰      | ۲          | قارچ*زمان       |
| ۱/۶۳ ns  | ۰/۰۰۵۰۴        | ۰/۰۱۰۰۹      | ۲          | قارچ*تیمار      |
| ۱۷/۳۲ ** | ۰/۰۵۳۷۱        | ۰/۰۵۳۷۱      | ۱          | زمان*تیمار      |
| ۲/۱۳ ns  | ۰/۰۰۶۵۹        | ۰/۰۱۳۱۹      | ۲          | قارچ*زمان*تیمار |
|          | ۰/۰۰۳۱۰        | ۰/۰۶۸۲۳      | ۲۲         | خطا             |
|          |                | ۰/۲۹۶۷۳      | ۳۵         | کل              |

ضریب تغییرات: ۵/۶۷؛ \* معنی‌دار در سطح ۵ درصد، \*\* معنی‌دار در سطح یک درصد، ns غیر معنی‌دار

تغییرات بیان ژن متالوتیونین در سه جدایه S3-1، S1-7 و S3-21 تحت تیمار ۵۵۰۰ پی‌پی‌ام سولفات مس شش و هشت روز پس از کشت در مقایسه با شاهد در شکل ۴-۱۷ نشان داده شده‌است. همانطور که در شکل

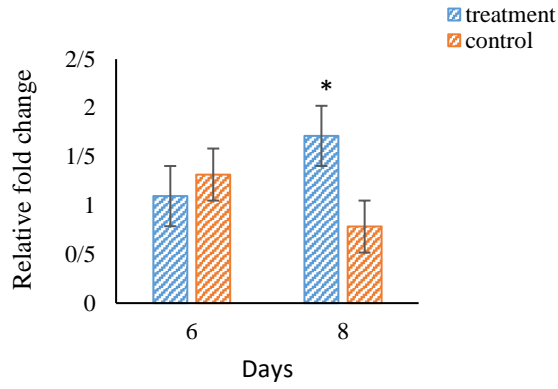
۱۷-۴ الف مشاهده می‌شود بیان ژن متالوتیونین در جدایه S3-1 هشت روز پس از کشت در مقایسه با روز ششم حدود ۱/۵ برابر افزایش یافته‌است. روند بیان ژن در تیمار سولفات مس افزایشی و در شاهد کاهشی بوده‌است. همچنین در این جدایه بیان ژن متالوتیونین در روز هشتم در مقایسه با شاهد بدون مس حدود ۲ برابر بوده است.

بیان ژن متالوتیونین در جدایه S1-7، هشت روز پس از کشت در مقایسه با روز ششم حدود ۲ برابر افزایش یافته‌است. روند بیان ژن در تیمار سولفات مس افزایشی و در شاهد کاهشی بوده‌است. همچنین در این جدایه بیان ژن متالوتیونین در روز هشتم در مقایسه با شاهد بدون مس ۲ برابر بوده‌است (شکل ۴-۱۷ ب). بیان ژن متالوتیونین در جدایه S3-21، در روز هشتم نسبت به روز ششم حدود ۱/۵ برابر افزایش یافته‌است. روند تغییرات بیان ژن در تیمار سولفات مس افزایشی بوده است و در روز هشتم بیان ژن در تیمار سولفات مس حدود ۲ برابر شاهد بوده‌است (شکل ۴-۱۷ ج).

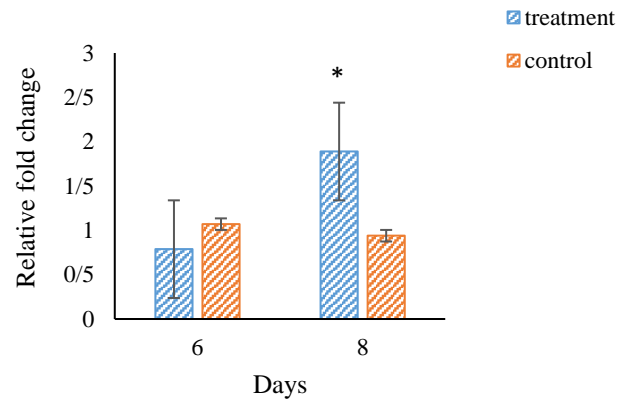
اغلب تحقیقات صورت‌گرفته درخصوص ژن‌های قارچی دخیل در مقاومت به مس در مخمر نان *Saccharomyces cerevisiae* انجام شده‌است. با توجه به اینکه خاموشی دو ژن *cup1* و *ace1* منجر به ایجاد فنوتیپ حساس به مس در مخمر نان می‌شود، به نظر می‌رسد آن‌ها ژن‌های غالب در مقاومت به مس هستند. با این حال، ژن‌های دیگری نیز در هموستاز مس نقش دارند (Cornelissen, 2004). مکانیسم اصلی در مخمرها برای جلوگیری از مسمومیت سلول، تشکیل پروتئین متالوتیونین (MT) است که اتم‌های مس داخل سلولی را به هم متصل می‌کند (Cornelissen, 2004). سطح مقاومت فنوتیپ‌ها نسبت به مس متناسب با تعداد کپی ژن *cup 1* است و ممکن است افزایش و کاهش یابد. سویه‌های حساس به مس معمولاً فقط یک نسخه از ژن *cup 1* را دارند اما سویه‌های مقاوم در برابر مس بین ۱۰ تا ۲۰ نسخه دارند و معمولاً در محیط مایع ۵۰ تا ۱۰۰ میکرومولار مس و در محیط جامد بیش از ۲ میلی مولار مس را تحمل می‌کنند (Cornelissen, 2004). ژن پروتئین متالوتیونین در قارچ *Neurospora crassa* نیز مورد مطالعه قرار گرفته‌است. نتایج نشان داد که مکانیسم مقاومت به مس مشابه مخمر نان می‌باشد و به نظر می‌رسد این دو ژن از طریق تکامل همگرا تکامل یافته‌اند. ۱۷ ساعت پس از افزودن ۰/۵ میلی مولار  $\text{CuSO}_4$  به محیط کشت *N. crassa* رشد القایی mRNA

متالوتیونین مس بسیار سریع است، بطور قابل توجهی سریعتر از آنچه که برای ژن‌های MT پستانداران گزارش شد که بیشترین میزان mRNA متالوتیونین ۴ تا ۸ ساعت پس از حضور یون‌های فلزی تشخیص داده شده است (Kumar et al., 2005). هوانگ و وانگ (۲۰۰۹) بیان ژن متالوتیونین *BgMT2* را در گیاه *Bruguiera* *gymnorrhiza* از خانواده شاه پسند یک، ۳ و ۷ روز پس از تیمار با فلزات سنگین به کمک qPCR مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که فلزاتی مانند مس، روی و سرب بیان این ژن را با الگوهای مختلفی افزایش می‌دهند. همچنین این محققین نقش ژن *BgMT2* را در تحمل به فلزات مذکور گزارش کردند.

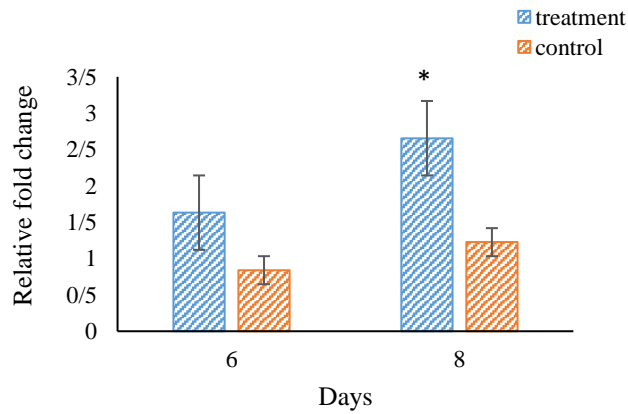
در تحقیق حاضر برای اولین بار نقش ژن متالوتیونین در تحمل به مس در گونه *Pleurotus eryngii* و جنس *Sarocladium* مورد بررسی قرار گرفت و همانطور که گفته شد، بیان ژن متالوتیونین در هر سه جدایه در روز هشتم در مقایسه با روز ششم افزایش یافته است که نشان‌دهنده نقش این ژن در تحمل به غلظت بالای سولفات مس در جدایه‌های مورد بررسی می‌باشد. نتایج این تحقیق با سایر محققین در خصوص نقش ژن متالوتیونین در تحمل فلزات سنگین (مس) در یوکاریوت‌ها از جمله قارچ‌ها مطابقت دارد.



الف



ب



ج

شکل ۴-۱۷ - تغییرات بیان ژن متالوتیونین در جدایه S3-1 (الف) و S1-7 (ب) و S3-21 (ج). برای نرمال کردن داده‌ها از ژن اکتین استفاده شد. \* نشان دهنده افزایش بیان ژن متالوتیونین در تیمار در مقایسه با روز ششم می‌باشد.

صنعتی شدن منجر به افزایش آلودگی به فلزات سنگین در خاک شده است (Liaquat *et al.*, 2020) و با توجه به اینکه، فلزات سنگین بطور طبیعی تجزیه نمی‌شوند، حذف آن‌ها از خاک یک چالش بزرگ در عصر جدید می‌باشد (Bai & Abraham, 2003). استفاده از میکروب‌ها یکی از راه‌حل‌های ممکن برای حذف فلزات سنگین از خاک‌های آلوده است. آن‌ها بطور طبیعی توانایی جذب فلزات و حذف آن‌ها از محیط را دارند (Levinskaite, 2001).

آگاهی از آلودگی‌های محیطی یکی از فرآیندهایی نظارتی پالایش محیط زیست می‌باشد. به منظور مدیریت آلودگی‌های خاص، هر روش توسعه‌یافته مزایا و معایب خود را دارد. زیست‌پالایی و گیاه‌پالایی به کمک میکروارگانیسم‌ها از روش‌های پیشرفته حذف مشکلات آلودگی‌های زیست‌محیطی می‌باشند. کاربرد قارچ‌ها در زیست‌پالایی به دلیل فراوانی حضور آن‌ها در محل آلودگی بسیار مورد بررسی قرار گرفته است (Khan *et al.*, 2019; Mtibà *et al.*, 2020; Tripathi & Kohli, 2013) از دیدگاه صنعتی، کلونیزاسیون قارچ‌ها بسیار حائز اهمیت می‌باشد، چراکه قارچ‌ها دارای آنزیم‌هایی هستند که تحمل طیف وسیع دما و pH را امکانپذیر می‌کند (Neifar *et al.*, 2015). مشکلات مهم موجود در زیست‌پالایی توسط قارچ‌ها در مزرعه شامل تولید انبوه اینوکولوم قارچ، استفاده مناسب اینوکولوم در خاک و انتخاب مواد مناسب برای انتقال می‌باشد (Chen *et al.*, 2018). زیست‌پالایی عناصر کروم و نیکل توسط گونه‌های مختلف *Aspergillus* و *Penicillium* گزارش شده است (Congeevaram *et al.*, 2007; Nanda *et al.*, 2011). درک مکانیسم زیست‌پالایی توسط قارچ‌ها در حال بررسی می‌باشد. بسیاری از مطالعات نشان می‌دهد که این میکروارگانیسم‌ها توانایی جذب زیستی یا تجمع زیستی دارند و می‌توانند فلزات را به سطح خود متصل کنند. همچنین مطالعات معدودی دخالت‌زن‌هایی مانند هیدروبین را در تحمل فلزات در قارچ‌ها را نشان داده است (Gönen & Aksu, 2009). قارچ *Penicillium simplicissimum* می‌تواند مس و سرب را از محیط مایع حذف نماید و مکانیسم‌های مشابه آنچه در بالا گفته برای آن مشخص شده است (Iskandar *et al.*, 2011). جذب فلز مس در دیواره سلولی سایر قارچ‌ها از جمله جنس‌های *Neurospora*، *Penicillium*، *Auerobasidium* و *Mucor* توسط محققین گزارش

شده است (Somers, 1963; Gadd, Stewart, *et al.*, 1984; Cervantes & Gutierrez-Corona, 1994). لیاکوات و همکاران (۲۰۲۰) تحمل قارچ‌های جدا شده از خاک معدن آلوده به فلزات کروم، سرب، کادمیوم و مس را بررسی کردند. نتایج این محققین نشان داد که تمامی قارچ‌های جدا شده قادر به تحمل غلظت ۱۵۰۰ پی‌پی‌ام از فلزات مختلف بودند. این محققین قارچ‌های *Aspergillus aculeatus*، *Aspergillus sclerotiorum*، *Trichoderma harzianum* و *Komagataella phaffii* را به‌عنوان گونه‌های متحمل به فلزات کروم، سرب، کادمیوم و مس گزارش کردند. همچنین گونه *Komagataella phaffii* قادر به تحمل غلظت ۵۵۰۰ پی‌پی‌ام کادمیوم می‌باشد. تغییرات ریخت‌شناسی قارچ از جمله شکل نامنظم ریشه تحت تیمار با فلزات نیز توسط این محققین گزارش شد (Liaquat *et al.*, 2020). خان و همکاران (۲۰۱۶) تغییر ریخت‌شناسی قارچ تحت تیمار با مس را گزارش کردند. در مطالعات مختلف تحمل قارچ‌های *Penicillium*، *Aspergillus*، *Fusarium* و *Trichoderma* به تنش ناشی از فلزات سنگین گزارش شده است (Iram *et al.*, 2012; Iskandar *et al.*, 2007; Zafar *et al.*, 2011). با افزایش غلظت فلز، ظرفیت تجمع زیستی قارچ افزایش می‌یابد (Liaquat *et al.*, 2020; Mishra & Malik, 2012).

بر اساس نتایج بدست آمده در تحقیق حاضر، دو جدایه *Pleurotus eryngii* و یک جدایه *Sarocladium sp.* جدا شده از معدن مس سرچشمه توانایی تحمل غلظت ۵۵۰۰ پی‌پی‌ام سولفات مس در محیط جامد و مایع با اسیدیته ۳/۵ و ۷ را داشتند. همچنین بررسی SEM جدایه‌ها نشان داد که تیمار سولفات مس منجر به تغییر ریخت‌شناسی ریشه‌ها از جمله کاهش قطر ریشه گردید. بررسی‌های مولکولی با استفاده از real time-PCR نشان داد که در هر سه جدایه ژن متالوتیونین در تحمل به فلز مس دخالت دارد. آنزیم لاکاز در جنس *Sarocladium* در تحمل به فلز مس تا روز هشتم دخالت دارد. اما در گونه *Pleurotus eryngii* بعد از روز ششم مکانیسم دیگری از جمله ژن متالوتیونین می‌تواند در تحمل فلز مس دخالت داشته‌باشد و نقش آنزیم لاکاز کم‌رنگ می‌شود. نتایج این تحقیق با نتایج سایر محققین روی گونه‌های قارچی دیگر مطابقت دارد و گونه *Pleurotus eryngii* و جنس *Sarocladium sp.* برای اولین به عنوان گونه‌های قارچی متحمل به مس گزارش می‌شوند و بیان ژن‌های متالوتیونین و لاکاز در آن‌ها مورد بررسی قرار گرفته است.

## پیشنهادات

براساس نتایج بدست آمده در تحقیق حاضر موارد زیر برای مطالعات بعدی پیشنهاد می‌گردد؛

- بررسی میزان آنزیم لاکاز تولید شده در جدایه‌های مورد مطالعه
- بررسی مکانیسم مولکولی دخیل در تحمل به غلظت‌های بالای فلز مس در جدایه‌های مورد مطالعه
- بررسی متابولیت‌های ثانویه تولید شده توسط جدایه‌های متحمل به فلز مس



## فصل پنجم

### منابع

حسینی ع. (۱۳۹۰)، پایان نامه ارشد: "بررسی تحمل و جذب زیستی برخی از فلزات سنگین توسط برخی انواعی از سویه‌های مخمری"، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان.

بی‌نام (۱۳۹۱)، شرکت ملی صنایع مس ایران، برگرفته از لینک <http://nicico.com/HomePage.aspx?TabID=1&Site=DouranPortal&Lang=fa-IR> (تاریخ دسترسی فوریه ۲۰۱۱).

Abbas, S. H., Ismail, I. M., Mostafa, T. M., & Sulaymon, A. H. (2014). Biosorption of heavy metals: a review. *Journal of Chemical Science and Technology*, 3(4), 74–102.

Akcil, A., Erust, C., Ozdemiroglu, S., Fonti, V., & Beolchini, F. (2015). A review of approaches and techniques used in aquatic contaminated sediments: metal removal and stabilization by chemical and biotechnological processes. *Journal of Cleaner Production*, 86, 24–36.

Akinkunmi, W. A., Husaini, A. A. S. A., Zulkharnain, A., Tay, M. G., & Roslan, H. A. (2016). Mechanism of biosorption of Pb (II) and Cu (II) ions using dead biomass of *Fusarium equiseti* strain UMAS and *Penicillium citrinum* strain UMAS B2. *Journal of Biochemistry, Microbiology and Biotechnology*, 4(2), 1–6.

Arnau, J., Murillo, F. J., & Torres-Martinez, S. (1990). A cytoplasmically inherited mutation in the fungus *phycomyces blakesleeanus*. *Journal of General Microbiology*, 136(8), 1577–1581.

Ashida, J. (1965). Adaptation of fungi to metal toxicants. *Annu. Rev. Phytopathol. (United States)*, 3.

Avery, S. V. (2001). Metal toxicity in yeasts and the role of oxidative stress. *Advances in Applied Microbiology*, 49, 111–142.

Ayyadurai, N., Kirubakaran, S. I., Srisha, S., & Sakthivel, N. (2005). Biological and molecular variability of *Sarocladium oryzae*, the sheath rot pathogen of rice (*Oryza sativa* L.). *Current Microbiology*, 50(6), 319–323.

Bai, R. S., & Abraham, T. E. (2003). Studies on chromium (VI) adsorption–desorption using immobilized fungal biomass. *Bioresource Technology*, 87(1), 17–26.

Baik, W. Y., Bae, J. H., Cho, K. M., & Hartmeier, W. (2002). Biosorption of heavy metals

- using whole mold mycelia and parts thereof. *Bioresource Technology*, 81(3), 167–170.
- Baldrian, P., & Gabriel, J. (2002). Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus*. *FEMS Microbiology Letters*, 206(1), 69–74.
- Baltazar, M. dos P. G., Gracioso, L. H., Avanzi, I. R., Karolski, B., Tenório, J. A. S., do Nascimento, C. A. O., & Perpetuo, E. A. (2019). Copper biosorption by *Rhodococcus erythropolis* isolated from the Sossego Mine–PA–Brazil. *Journal of Materials Research and Technology*, 8(1), 475–483.
- Bayramoğlu, G., Bektaş, S., & Arıca, M. Y. (2003). Biosorption of heavy metal ions on immobilized white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Journal of Hazardous Materials*, 101(3), 285–300.
- Blaudez, D., Jacob, C., Turnau, K., Colpaert, J. V., Ahonen-Jonnarth, U., Finlay, R., Botton, B., & Chalot, M. (2000). Differential responses of ectomycorrhizal fungi to heavy metals in vitro. *Mycological Research*, 104(11), 1366–1371.
- Brenes-Pomales, A., Lindegren, G., & Lindegren, C. C. (1955). Gene control of copper-sensitivity in *Saccharomyces*. *Nature*, 176(4487), 841–842.
- Bruins, M. R., Kapil, S., & Oehme, F. W. (2000). Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 45(3), 198–207.
- Buswell, J. A., Cai, Y., & Chang, S. (1995). Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. *FEMS Microbiology Letters*, 128(1), 81–87.
- Butt, T R., & Ecker, D. J. (1987). Yeast metallothionein and applications in biotechnology. *Microbiological Reviews*, 51(3), 351–364.
- Butt, Tauseef R., Sternberg, E. J., Gorman, J. A., Clark, P., Hamer, D., Rosenberg, M., & Crooke, S. T. (1984). Copper Metallothionein of Yeast, Structure of the Gene, and Regulation of Expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(11), 3332–3336.
- Cano-Canchola, C., Sosa, L., Fonzi, W., Sypherd, P., & Ruiz-Herrera, J. (1992). Developmental regulation of CUP gene expression through DNA methylation in *Mucor* spp. *Journal of Bacteriology*, 174(2), 362 LP – 366.
- Carri, M. T., Galiazzo, F., Ciriolo, M. R., & Rotilio, G. (1991). Evidence for co-regulation of

- Cu, Zn superoxide dismutase and metallothionein gene expression in yeast through transcriptional control by copper via the ACE 1 factor. *FEBS Letters*, 278(2), 263–266.
- Castanera, R., Pérez, G., Omarini, A., Alfaro, M., Pisabarro, A. G., Faraco, V., Amore, A., & Ramírez, L. (2012). Transcriptional and enzymatic profiling of *Pleurotus ostreatus* laccase genes in submerged and solid-state fermentation cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(11), 4037–4045.
- Cervantes, C., & Gutierrez-Corona, F. (1994). Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. *FEMS Microbiology Reviews*, 14(2), 121–137.
- Chandra, R., & Chowdhary, P. (2015). Properties of bacterial laccases and their application in bioremediation of industrial wastes. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 17(2), 326–342.
- Chen, H., & Cutright, T. J. (2003). Preliminary evaluation of microbially mediated precipitation of cadmium, chromium, and nickel by rhizosphere consortium. *Journal of Environmental Engineering*, 129(1), 4–9.
- Chen, J. D., Zhang, G. C., & Fu, X. H. (1986). The pathogen of rice purple sheath disease *Sarocladium synense* sp. nov. *Acta Mycologica Sinica, Supplement*, 1, 318–327.
- Chen, M., Arato, M., Borghi, L., Nouri, E., & Reinhardt, D. (2018). Beneficial services of arbuscular mycorrhizal fungi—from ecology to application. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1270.
- Chia-Chay, T., Redzwan, G., Hong-Hooi, L., Soon-Kong, Y., Surif, S., & Abdul-Talib, S. (2010). Copper (II) biosorption characteristic of *Pleurotus spent* mushroom compost. *2010 International Conference on Science and Social Research (CSSR 2010)*, 6–10.
- Chmelová, D., & Ondrejovič, M. (2021). Effect of potential inductors on laccase production by white-rot fungus *Ceriporiopsis subvermispora*. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2021, 84–87.
- Chojnacka, K. (2010). Biosorption and bioaccumulation—the prospects for practical applications. *Environment International*, 36(3), 299–307.
- Congeevaram, S., Dhanarani, S., Park, J., Dexilin, M., & Thamaraiselvi, K. (2007). Biosorption of chromium and nickel by heavy metal resistant fungal and bacterial isolates. *Journal of Hazardous Materials*, 146(1–2), 270–277.

- Contreras-Cortés, A. G., Almendariz-Tapia, F. J., Cortez-Rocha, M. O., Burgos-Hernández, A., Rosas-Burgos, E. C., Rodríguez-Félix, F., Gómez-Álvarez, A., Quevedo-López, M. Á., & Plascencia-Jatomea, M. (2020). Biosorption of copper by immobilized biomass of *Aspergillus australensis*. Effect of metal on the viability, cellular components, polyhydroxyalkanoates production, and oxidative stress. *Environmental Science and Pollution Research*, 1–16.
- Cornelissen, S. (2004). *The impact of copper on filamentous fungi and yeasts present in soil*. Stellenbosch: University of Stellenbosch.
- Culotta, V. C., & Hamer, D. H. (1989). Fine mapping of a mouse metallothionein gene metal response element. *Molecular and Cellular Biology*, 9(3), 1376–1380.
- Dameron, C T, Winge, D. R., George, G. N., Sansone, M., Hu, S., & Hamer, D. (1991). A copper-thiolate polynuclear cluster in the ACE1 transcription factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(14), 6127–6131.
- Dameron, Charles T, & Harrison, M. D. (1998). Mechanisms for protection against copper toxicity. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 67(5), 1091S-1097S.
- Das, N., Vimala, R., & Karthika, P. (2008). *Biosorption of heavy metals—an overview*.
- Dixit, R., Malaviya, D., Pandiyan, K., Singh, U. B., Sahu, A., Shukla, R., Singh, B. P., Rai, J. P., Sharma, P. K., & Lade, H. (2015). Bioremediation of heavy metals from soil and aquatic environment: an overview of principles and criteria of fundamental processes. *Sustainability*, 7(2), 2189–2212.
- Dumestre, A., Sauve, S., McBride, M., Baveye, P., & Berthelin, J. (1999). Copper speciation and microbial activity in long-term contaminated soils. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 36(2), 124–131.
- Duncan, K. E. R., Ngu, T. T., Chan, J., Salgado, M. T., Merrifield, M. E., & Stillman, M. J. (2006). Peptide folding, metal-binding mechanisms, and binding site structures in metallothioneins. *Experimental Biology and Medicine*, 231(9), 1488–1499.
- Echlin, P. (2011). *Handbook of sample preparation for scanning electron microscopy and X-ray microanalysis*. Springer Science & Business Media.
- Edris, G., Alhamed, Y., & Alzahrani, A. (2014). Biosorption of cadmium and lead from aqueous solutions by *Chlorella vulgaris* biomass: equilibrium and kinetic study. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 39(1), 87–93.

- Ehrlich, H. L. (1997). Microbes and metals. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48(6), 687–692.
- Farooq, U., Kozinski, J. A., Khan, M. A., & Athar, M. (2010). Biosorption of heavy metal ions using wheat based biosorbents—a review of the recent literature. *Bioresource Technology*, 101(14), 5043–5053.
- Fogel, S., Welch, J. W., & Louis, E. J. (1984). Meiotic gene conversion mediates gene amplification in yeast. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 49, 55–65.
- Fukami, M., Yamazaki, S., & Toda, S. (1983). Distribution of copper in the cells of heavy metal tolerant fungus, *Penicillium ochrochloron*, cultured in concentrated copper medium. *Agricultural and Biological Chemistry*, 47(6), 1367–1369.
- Gadd, G M. (1984). Effect of copper on *Aureobasidium pullulans* in solid medium: adaptation not necessary for tolerant behaviour. *Transactions of the British Mycological Society*, 82(3), 546–549.
- Gadd, G M. (2008). *Accumulation and transformation of metals by microorganisms, biotechnology set*. Wiley-VCH Verlag GmbH.
- Gadd, G M, Chudek, J. A., Foster, R., & Reed, R. H. (1984). The osmotic responses of *Penicillium ochro-chloron*: changes in internal solute levels in response to copper and salt stress. *Microbiology*, 130(8), 1969–1975.
- Gadd, G M, Stewart, A., White, C., & Mowll, J. L. (1984). Copper uptake by whole cells and protoplasts of a wild-type and copper-resistant strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters*, 24(2–3), 231–234.
- Gadd, Geoffrey M, & Griffiths, A. J. (1980). Influence of pH on toxicity and uptake of copper in *Aureobasidium pullulans*. *Transactions of the British Mycological Society*, 75(1), 91–96.
- Gadd, Geoffrey Michael. (2010). Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology*, 156(3), 609–643.
- Galhaup, C., & Haltrich, D. (2001). Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(1–2), 225–232.

- Galun, M., Keller, P., Feldstein, H., Galun, E., Siegel, S., & Siegel, B. (1983). Recovery of uranium (VI) from solution using fungi II. Release from uranium-loaded *Penicillium* biomass. *Water, Air, and Soil Pollution*, 20(3), 277–285.
- Galvão, L. A. C., & Corey, G. (1987). Arsénico. *Serie Vigilancia*; 3.
- Garcia-toledo, A., Babich, H., & Stotzky, G. (1985). Training of *Rhizopus stolonifer* and *Cunninghamella blakesleeana* to copper: cotolerance to cadmium, cobalt, nickel, and lead. *Can J Microbiol*, 31.
- Gaur, N., Flora, G., Yadav, M., & Tiwari, A. (2014). A review with recent advancements on bioremediation-based abolition of heavy metals. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 16(2), 180–193.
- Ge, W., Zamri, D., Mineyama, H., & Valix, M. (2011). Bioaccumulation of heavy metals on adapted *Aspergillus foetidus*. *Adsorption*, 17(5), 901.
- Gerald, F., Platas, G., & Walter, G. (2004). Conspicuity of the cerulenin and helvolic acid producing ‘*Cephalosporium caerulens*’, and the hypocrealean fungus *Sarocladium oryzae*. *Mycological Research*, 108(11), 1291–1300.
- Gianfreda, L., Xu, F., & Bollag, J.-M. (1999). Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediation Journal*, 3(1), 1–26.
- Giardina, P., Aurilia, V., Cannio, R., Marzullo, L., Amoresano, A., Siciliano, R., Pucci, P., & Sanna, G. (1996). The gene, protein and glycan structures of laccase from *Pleurotus ostreatus*. *European Journal of Biochemistry*, 235(3), 508–515.
- Giardina, P., Palmieri, G., Scaloni, A., Fontanella, B., FARACO, V., CENNAMO, G., & Sanna, G. (1999). Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Biochemical Journal*, 341(3), 655–663.
- Gomes, P. F., Lennartsson, P. R., Persson, N.-K., & Taherzadeh, M. J. (2014). Heavy metal biosorption by *Rhizopus* sp. biomass immobilized on textiles. *Water, Air, & Soil Pollution*, 225(2), 1834.
- Gönen, F., & Aksu, Z. (2009). Single and binary dye and heavy metal bioaccumulation properties of *Candida tropicalis*: Use of response surface methodology (RSM) for the estimation of removal yields. *Journal of Hazardous Materials*, 172(2–3), 1512–1519.
- González, M. A., Pavlovic, I., Rojas-Delgado, R., & Barriga, C. (2014). Removal of Cu<sup>2+</sup>,

- Pb<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> by layered double hydroxide–humate hybrid. Sorbate and sorbent comparative studies. *Chemical Engineering Journal*, 254, 605–611.
- Gorman, J. A., Clark, P. E., Lee, M. C., Debouck, C., & Rosenberg, M. (1986). Regulation of the yeast metallothionein gene. *Gene*, 48(1), 13–22.
- Goudopoulou, A., Krimitzas, A., & Typas, M. A. (2010). Differential gene expression of ligninolytic enzymes in *Pleurotus ostreatus* grown on olive oil mill wastewater. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88(2), 541–551.
- Gregori, A., Švagelj, M., & Pohleven, J. (2007). Cultivation techniques and medicinal properties of *Pleurotus* spp. *Food Technology and Biotechnology*, 45(3), 238–249.
- Grill, E., Winnacker, E.-L., & Zenk, M. H. (1986). Synthesis of seven different homologous phytochelatins in metal-exposed *Schizosaccharomyces pombe* cells. *FEBS Letters*, 197(1–2), 115–120.
- Harms, H., Schlosser, D., & Wick, L. Y. (2011). Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. *Nature Reviews Microbiology*, 9(3), 177–192.
- Helfer, W. (1991). Pilze auf Pilzfruchtkörpern. Untersuchungen zur Ökologie, Systematik und Chemie. *Libri Bot*, 1, 1–157.
- Hernández-Monjaraz, W. S., Caudillo-Pérez, C., Salazar-Sánchez, P. U., & Macías-Sánchez, K. L. (2018). Influence of iron and copper on the activity of laccases in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49, 269–275.
- Hill, K. L., Li, H. H., Singer, J., & Merchant, S. (1991). Isolation and structural characterization of the *Chlamydomonas reinhardtii* gene for cytochrome c6. Analysis of the kinetics and metal specificity of its copper-responsive expression. *Journal of Biological Chemistry*, 266(23), 15060–15067.
- Hoshino, Y. T., & Morimoto, S. (2008). Comparison of 18S rDNA primers for estimating fungal diversity in agricultural soils using polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis. *Soil Science and Plant Nutrition*, 54(5), 701–710.
- Iram, S., Arooj, A., & Parveen, K. (2012). Tolerance potential of fungi isolated from polluted soil of Multan, Pakistan. *Int. J. Biosci*, 2, 27–34.
- Iskandar, N. L., Zainudin, N. A. I. M., & Tan, S. G. (2011). Tolerance and biosorption of copper (Cu) and lead (Pb) by filamentous fungi isolated from a freshwater ecosystem.



*Journal of Environmental Sciences*, 23(5), 824–830.

- Jacob, J. M., Karthik, C., Saratale, R. G., Kumar, S. S., Prabakar, D., Kadirvelu, K., & Pugazhendhi, A. (2018). Biological approaches to tackle heavy metal pollution: a survey of literature. *Journal of Environmental Management*, 217, 56–70.
- Jedinak, A., & Sliva, D. (2008). Pleurotus ostreatus inhibits proliferation of human breast and colon cancer cells through p53-dependent as well as p53-independent pathway. *International Journal of Oncology*, 33(6), 1307–1313.
- Kaegi, J. H. R., & Schaeffer, A. (1988). Biochemistry of metallothionein. *Biochemistry*, 27(23), 8509–8515.
- Kägi, J. H. R., & Kojima, Y. (1987). Chemistry and biochemistry of metallothionein. In *Metallothionein II* (pp. 25–61). Springer.
- Kahraman, S., Asma, D., Erdemoglu, S., & Yesilada, O. (2005). Biosorption of copper (II) by live and dried biomass of the white rot fungi Phanerochaete chrysosporium and Funalia trogii. *Engineering in Life Sciences*, 5(1), 72–77.
- Karin, M., Najarian, R., Haslinger, A., Valenzuela, P., Welch, J., & Fogel, S. (1984). Primary structure and transcription of an amplified genetic locus: the CUP1 locus of yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(2), 337–341.
- Khan, I., Ali, M., Aftab, M., Shakir, S., Qayyum, S., Haleem, K. S., & Tauseef, I. (2019). Mycoremediation: a treatment for heavy metal-polluted soil using indigenous metallotolerant fungi. *Environmental Monitoring and Assessment*, 191(10), 622.
- Kneer, R., Kutchan, T. M., Hochberger, A., & Zenk, M. H. (1992). Saccharomyces cerevisiae and Neurospora crassa contain heavy metal sequestering phytochelatin. *Archives of Microbiology*, 157(4), 305–310.
- Kobayashi, S., Ueda, K., & Komano, T. (1990). The effects of metal ions on the DNA damage induced by hydrogen peroxide. *Agricultural and Biological Chemistry*, 54(1), 69–76.
- Koeleman, M., vd Laak, W. J., & Ietswaart, H. (1999). Dispersion of PAH and heavy metals along motorways in The Netherlands—an overview. *Science of the Total Environment*, 235(1–3), 347–349.
- Kondo, N., Imai, K., Isobe, M., Goto, T., Murasugi, A., Wada-Nakagawa, C., & Hayashi, Y.

- (1984). Cadystin a and b, major unit peptides comprising cadmium binding peptides induced in a fission yeast ----- separation, revision of structures and synthesis. *Tetrahedron Letters*, 25(35), 3869–3872.
- Kumar, K. S., Dayananda, S., & Subramanyam, C. (2005). Copper alone, but not oxidative stress, induces copper–metallothionein gene in *Neurospora crassa*. *FEMS Microbiology Letters*, 242(1), 45–50.
- Latha, J. N. L., Babu, P. N., Rakesh, P., Ashok, K., Kumar, M., & Susheela, L. (2012). FUNGAL CELL WALLS AS PROTECTIVE BARRIERS FOR TOXIC METALS. *Advances in Medicine and Biology*, 53, 181–198.
- Lerch, K. (1980). Copper metallothionein, a copper-binding protein from *Neurospora crassa*. *Nature*, 284(5754), 368–370.
- Levinskaite, L. (2001). Effect of heavy metals on the individual development of two fungi from the genus *Penicillium*. *Biologija*, 1, 25–30.
- Liaquat, F., Munis, M. F. H., Haroon, U., Arif, S., Saqib, S., Zaman, W., Khan, A. R., Shi, J., Che, S., & Liu, Q. (2020). Evaluation of Metal Tolerance of Fungal Strains Isolated from Contaminated Mining Soil of Nanjing, China. *Biology*, 9(12), 469.
- Lippert, B. (1992). From cisplatin to artificial nucleases—the role of metal ion-nucleic acid interactions in biology. *Biometals*, 5(4), 195–208.
- Lodeiro, P., Barriada, J. L., Herrero, R., & De Vicente, M. E. S. (2006). The marine macroalga *Cystoseira baccata* as biosorbent for cadmium (II) and lead (II) removal: kinetic and equilibrium studies. *Environmental Pollution*, 142(2), 264–273.
- Malavolta, E. (1994). *Fertilizantes e seu impacto ambiental: micronutrientes e metais pesados: mitos, mistificação e fatos*. Produquímica São Paulo.
- Malik, A. (2004). Metal bioremediation through growing cells. *Environment International*, 30(2), 261–278.
- Mansur, M., Suárez, T., & González, A. E. (1998). Differential Gene Expression in the Laccase Gene Family from Basidiomycete I-62 (CECT 20197). *Applied and Environmental Microbiology*, 64(2), 771 LP – 774.
- Margoshes, M., & Vallee, B. L. (1957). A cadmium protein from equine kidney cortex. *Journal of the American Chemical Society*, 79(17), 4813–4814.

- Mate, D., García-Burgos, C., García-Ruiz, E., Ballesteros, A. O., Camarero, S., & Alcalde, M. (2010). Laboratory evolution of high-redox potential laccases. *Chemistry & Biology*, *17*(9), 1030–1041.
- Mehra, R. K., & Winge, D. R. (1991). Metal ion resistance in fungi: Molecular mechanisms and their regulated expression. *Journal of Cellular Biochemistry*, *45*(1), 30–40.
- Mishra, A., & Malik, A. (2012). Simultaneous bioaccumulation of multiple metals from electroplating effluent using *Aspergillus lentulus*. *Water Research*, *46*(16), 4991–4998.
- Montllor-Albalade, C., Colin, A. E., Chandrasekharan, B., Bolaji, N., Andersen, J. L., Outten, F. W., & Reddi, A. R. (2019). Extra-mitochondrial Cu/Zn superoxide dismutase (Sod1) is dispensable for protection against oxidative stress but mediates peroxide signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Redox Biology*, *21*, 101064.
- Mounaji, K., Erraiss, N.-E., & Wegnez, M. (2002). Identification of metallothionein in *Pleurodeles waltl*. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, *57*(7–8), 727–731.
- Mtibaà, R., Ezzanad, A., Aranda, E., Pozo, C., Ghariani, B., Moraga, J., Nasri, M., Cantoral, J. M., Garrido, C., & Mechichi, T. (2020). Biodegradation and toxicity reduction of nonylphenol, 4-tert-octylphenol and 2, 4-dichlorophenol by the ascomycetous fungus *Thielavia* sp HJ22: identification of fungal metabolites and proposal of a putative pathway. *Science of the Total Environment*, *708*, 135129.
- Muzzarelli, R. A. A. (1985). Removal of uranium from solutions and brines by a derivative of chitosan and ascorbic acid. *Carbohydrate Polymers*, *5*(2), 85–89.
- Nanda, M., Sharma, D., & Kumar, A. (2011). Removal of heavy metals from industrial effluent using bacteria. *International Journal of Environmental Sciences*, *2*(2), 765–780.
- Neifar, M., Maktouf, S., Ghorbel, R. E., Jaouani, A., & Cherif, A. (2015). Extremophiles as source of novel bioactive compounds with industrial potential. *Biotechnology of Bioactive Compounds: Sources and Applications*. Wiley, Hoboken, 245–268.
- Nordberg, M., & Nordberg, G. F. (2009). Metallothioneins: historical development and overview. *Met Ions Life Sci*, *5*(2009), 1–29.
- Nordberg, M., & Nordberg, G. F. (2015). 1 Metallothioneins: Historical Development and Overview. In *Metallothioneins and related chelators* (pp. 1–30). De Gruyter.
- Ohga, S., & Royse, D. J. (2001). Transcriptional regulation of laccase and cellulase genes

- during growth and fruiting of *Lentinula edodes* on supplemented sawdust. *FEMS Microbiology Letters*, 201(1), 111–115.
- Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Fontanella, B., & Sannia, G. (2000). Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(3), 920–924.
- Peerzada, S., Viswanath, H., & Bhat, K. (2020). In-vitro studies on effect of fungicides against mycelial growth and sporangial germination of *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary) causing late blight of potato. *International Journal of Chemical Studies*, 8(1), 2069–2075.
- Peligro, F. R., Pavlovic, I., Rojas, R., & Barriga, C. (2016). Removal of heavy metals from simulated wastewater by in situ formation of layered double hydroxides. *Chemical Engineering Journal*, 306, 1035–1040.
- Pezzella, C., Autore, F., Giardina, P., Piscitelli, A., Sannia, G., & Faraco, V. (2009). The *Pleurotus ostreatus* laccase multi-gene family: isolation and heterologous expression of new family members. *Current Genetics*, 55(1), 45–57.
- Piscitelli, A., Giardina, P., Mazzoni, C., & Sannia, G. (2005). Recombinant expression of *Pleurotus ostreatus* laccases in *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69(4), 428–439.
- Poladian, Q., Şahin, O., Karakurt, T., İlhan-Ceylan, B., & Kurt, Y. (2021). A new zinc(II) complex with N2O2-tetradentate schiff-base derived from pyridoxal-S-methylthiosemicarbazone: Synthesis, characterization, crystal structure, DFT, molecular docking and antioxidant activity studies. *Polyhedron*, 201, 115164.
- Price, M. S., Classen, J. J., & Payne, G. A. (2001). *Aspergillus niger* absorbs copper and zinc from swine wastewater. *Bioresource Technology*, 77(1), 41–49.
- Quero, G. M., Cassin, D., Botter, M., Perini, L., & Luna, G. M. (2015). Patterns of benthic bacterial diversity in coastal areas contaminated by heavy metals, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorinated biphenyls (PCBs). *Frontiers in Microbiology*, 6, 1053.
- Rafiu Awofolu, O., Okechukwu Okonkwo, J., Badenhorst, J., & Jordaan, E. (2006). A new approach to chemical modification protocols of *Aspergillus niger* and sorption of lead ion by fungal species. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9(4), 0.

- Ross, I. S., & Parkin, M. J. (1989). Uptake of copper by *Candida utilis*. *Mycological Research*, 93(1), 33–37.
- Samuels, G. J. (1976). Perfect states of *Acremonium* the genera *Nectria*, *Actiniopsis*, *Ijuhya*, *Neohenningsia*, *Ophiodictyon*, and *Peristomialis*. *New Zealand Journal of Botany*, 14(3), 231–260.
- Shatzman, A. R., & Kosman, D. J. (1979). Characterization of two copper-binding components of the fungus, *Dactylium dendroides*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 194(1), 226–235.
- Simpson, J. A., Cheeseman, K. H., Smith, S. E., & Dean, R. T. (1988). Free-radical generation by copper ions and hydrogen peroxide. Stimulation by HEPES buffer. *Biochemical Journal*, 254(2), 519–523.
- Sing, C., & Yu, J. (1998). Copper adsorption and removal from water by living mycelium of white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Water Research*, 32(9), 2746–2752.
- Singh, M., Srivastava, P. K., Verma, P. C., Kharwar, R. N., Singh, N., & Tripathi, R. D. (2015). Soil fungi for mycoremediation of arsenic pollution in agriculture soils. *Journal of Applied Microbiology*, 119(5), 1278–1290.
- Singh, V. K., & Hanson, J. (2006). Assessment of metallothionein and antibodies to metallothionein in normal and autistic children having exposure to vaccine-derived thimerosal. *Pediatric Allergy and Immunology*, 17(4), 291–296.
- Sjaarda, C. P., Abubaker, K. S., & Castle, A. J. (2015). Induction of *lcc2* expression and activity by *A. garicus* *bisporus* provides defence against *T. richoderma* *aggressivum* toxic extracts. *Microbial Biotechnology*, 8(6), 918–929.
- Smiderle, F. R., Olsen, L. M., Carbonero, E. R., Baggio, C. H., Freitas, C. S., Marcon, R., Santos, A. R. S., Gorin, P. A. J., & Iacomini, M. (2008). Anti-inflammatory and analgesic properties in a rodent model of a (1→3),(1→6)-linked  $\beta$ -glucan isolated from *Pleurotus pulmonarius*. *European Journal of Pharmacology*, 597(1–3), 86–91.
- Smith, M., Shnyreva, A., Wood, D. A., & Thurston, C. F. (1998). Tandem organization and highly disparate expression of the two laccase genes *lcc1* and *lcc2* in the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *Microbiology*, 144(4), 1063–1069.
- Somers, E. (1963). The uptake of copper by fungal cells. *Annals of Applied Biology*, 51(3), 425–437.

- Song, J., Shen, Q., Wang, L., Qiu, G., Shi, J., Xu, J., Brookes, P. C., & Liu, X. (2018). Effects of Cd, Cu, Zn and their combined action on microbial biomass and bacterial community structure. *Environmental Pollution*, *243*, 510–518.
- Subramanyam, C., & Gupta, P. D. (1986). Glycogen deposition in *Neurospora crassa* under conditions of copper toxicity; a correlative ultrastructural and biochemical study. *Microbios*, *45*.
- Subramanyam, C., Venkateswerlu, G., & Rao, S. L. N. (1983). Accumulation of histidinol phosphate in copper toxic cultures of *Neurospora crassa*. *Curr Sci*, *52*.
- Summerbell, R. C., Gueidan, C., Schroers, H. J., De Hoog, G. S., Starink, M., Rosete, Y. A., Guarro, J., & Scott, J. A. (2011). Acremonium phylogenetic overview and revision of *Gliomastix*, *Sarocladium*, and *Trichothecium*. *Studies in Mycology*, *68*, 139–162.
- Sun, G. L., Reynolds, E. E., & Belcher, A. M. (2020). Using yeast to sustainably remediate and extract heavy metals from waste waters. *Nature Sustainability*, *3*(4), 303–311.
- Sun, J., Zou, X., Ning, Z., Sun, M., Peng, J., & Xiao, T. (2012). Culturable microbial groups and thallium-tolerant fungi in soils with high thallium contamination. *Science of the Total Environment*, *441*, 258–264.
- Tamás, M. J., Labarre, J., Toledano, M. B., & Wysocki, R. (2005). Mechanisms of toxic metal tolerance in yeast. In *Molecular Biology of Metal Homeostasis and Detoxification* (pp. 395–454). Springer.
- Tang, J., Zhang, J., Ren, L., Zhou, Y., Gao, J., Luo, L., Yang, Y., Peng, Q., Huang, H., & Chen, A. (2019). Diagnosis of soil contamination using microbiological indices: A review on heavy metal pollution. *Journal of Environmental Management*, *242*, 121–130.
- Thurston, C. F. (1994). The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, *140*(1), 19–26.
- Tokunaga, J., & Bartnicki-Garcia, S. (1971). Structure and differentiation of the cell wall of *Phytophthora palmivora*: cysts, hyphae and sporangia. *Archiv Für Mikrobiologie*, *79*(4), 293–310.
- Trevors, J. T. (1987). Copper resistance in bacteria. *Microbiological Sciences*, *4*(1), 29–31.
- Tripathi, A. K., & Kohli, S. (2013). Anti-diabetic activity and phytochemical screening of crude extracts of *Pueraria Tuberosa* DC.(FABACEAE) grown in India on STZ-induced

- diabetic rats. *Asian J Med Pharm Res*, 3(3), 66–73.
- Tu, C., Liu, Y., Wei, J., Li, L., Scheckel, K. G., & Luo, Y. (2018). Characterization and mechanism of copper biosorption by a highly copper-resistant fungal strain isolated from copper-polluted acidic orchard soil. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(25), 24965–24974.
- Venkateswerlu, G., & Stotzky, G. (1986). Copper and cobalt alter the cell wall composition of *Cunninghamella blakesleeana*. *Can J Microbiol*, 32.
- Viraraghavan, T., & Srinivasan, A. (2011). Fungal biosorption and biosorbents. In *Microbial biosorption of metals* (pp. 143–158). Springer.
- Vrsanska, M., Voberkova, S., Langer, V., Palovcikova, D., Moulick, A., Adam, V., & Kopel, P. (2016). Induction of laccase, lignin peroxidase and manganese peroxidase activities in white-rot fungi using copper complexes. *Molecules*, 21(11).  
<https://doi.org/10.3390/molecules21111553>
- Wahab, A. A., Awang, A., Azham, Z., Tay, M. G., & Adeyemi, F. M. (2017). Biosorption of lead (II) ion using *Penicillium citrinum* KR706304 isolated from the mangrove soil environment of southeast Borneo. *Ife Journal of Science*, 19(2), 341–351.
- Wahleithner, J. A., Xu, F., Brown, K. M., Brown, S. H., Golightly, E. J., Halkier, T., Kauppinen, S., Pederson, A., & Schneider, P. (1996). The identification and characterization of four laccases from the plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani*. *Current Genetics*, 29(4), 395–403.
- Wang, X., & Pecoraro, L. (2021). Analysis of soil fungal and bacterial communities in Tianchi Volcano crater, northeast China. *Life*, 11(4), 280.
- Wang, Y., Peng, B., Yang, Z., Chai, L., Liao, Q., Zhang, Z., & Li, C. (2015). Bacterial community dynamics during bioremediation of Cr (VI)-contaminated soil. *Applied Soil Ecology*, 85, 50–55.
- Welch, J. W., Fogel, S., Cathala, G., & Karin, M. (1983). Industrial yeasts display tandem gene iteration at the CUP1 region. *Molecular and Cellular Biology*, 3(8), 1353–1361.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, 18(1), 315–322.

- Wong, C., Tan, L. T., Mujahid, A., Lihan, S., Wee, J. L. S., Ting, L. F., & Müller, M. (2018). Biosorption of copper by endophytic fungi isolated from *Nepenthes ampullaria*. *Letters in Applied Microbiology*, *67*(4), 384–391.
- Yaghoubian, Y., Siadat, S. A., Telavat, M. R. M., Pirdashti, H., & Yaghoubian, I. (2019). Bio-removal of cadmium from aqueous solutions by filamentous fungi: *Trichoderma* spp. and *Piriformospora indica*. *Environmental Science and Pollution Research*, *26*(8), 7863–7872.
- Yan, G., & Viraraghavan, T. (2003). Heavy-metal removal from aqueous solution by fungus *Mucor rouxii*. *Water Research*, *37*(18), 4486–4496.
- Yaver, D. S., Xu, F., Golightly, E. J., Brown, K. M., Brown, S. H., Rey, M. W., Schneider, P., Halkier, T., Mondorf, K., & Dalboge, H. (1996). Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, *62*(3), 834–841.
- Zafar, S., Aqil, F., & Ahmad, I. (2007). Metal tolerance and biosorption potential of filamentous fungi isolated from metal contaminated agricultural soil. *Bioresource Technology*, *98*(13), 2557–2561.
- Zervakis, G. I., Ntougias, S., Gargano, M. L., Besi, M. I., Polemis, E., Typas, M. A., & Venturella, G. (2014). A reappraisal of the *Pleurotus eryngii* complex – New species and taxonomic combinations based on the application of a polyphasic approach, and an identification key to *Pleurotus* taxa associated with Apiaceae plants. *Fungal Biology*, *118*(9), 814–834.
- Zevenhuizen, L., Dolfing, J., Eshuis, E. J., & Scholten-Koerselman, I. J. (1979). Inhibitory effects of copper on bacteria related to the free ion concentration. *Microbial Ecology*, *5*(2), 139–146.
- Zhao, J., Csetenyi, L., & Gadd, G. M. (2020). Biocorrosion of copper metal by *Aspergillus niger*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *154*, 105081.
- Zhou, P. B., & Thiele, D. J. (1991). Isolation of a metal-activated transcription factor gene from *Candida glabrata* by complementation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *88*(14), 6112–6116.



## Abstract

Bioremediation and phytoremediation using microorganisms are considered as advanced method to eliminate environmental contaminations. In order to identify tolerant fungi against copper contamination and study of the related genes expression, sampling was carried out from the soil and waste water of “Sarcheshmeh Copper Mine”, which is one of the biggest open cast copper mines in the world. Totally 73 fungal isolates were obtained and purified. Afterwards, inhibitory effect of different concentrations of CuSO<sub>4</sub> on mycelial growth was evaluated. Results showed that concentrations of 1000, 1500, 3500 and 4500 ppm had no inhibitory effect on fungal isolates, as all of them could grow on media culture as well, only 5500 ppm of CuSO<sub>4</sub> inhibited fungal growth compared to control. Based on bioassay experiments, three isolates including S3-1, S3-21 and S1-7, which were able to growth on solid and broth media containing 5500 ppm of CuSO<sub>4</sub>, were selected and identified using molecular approaches. Also, laccase and metallothionein gene expression has been assessed in the selected isolates. According to molecular identification using ITS1,5.8s, ITS2 regions, isolates S3-1 and S1-7 were belonged to *Pleurotus eryngii* and isolate S3-21 was belonged to genus *Sarocladium* sp. In addition, Isolates S3-1 and S1-7 showed similar laccase gene expression trend, which it has been decreased after 8 days treatment with CuSO<sub>4</sub> compared to 6<sup>th</sup> day. But, the isolate S3-21 has represented different pattern and CuSO<sub>4</sub> treatment has increased (almost 2 times) laccase gene expression from 6 to 8 days. Besides, metallothionein gene expression has increased from 6 days to 8 days treatment with CuSO<sub>4</sub> compared to control which represents its role in fungal tolerance against copper in all studied isolates. In this study, *Pleurotus eryngii* species and genus *Sarocladium* sp. are introduced as heavy metal tolerant fungi and the related gene expression against copper was studied for the first time in Iran.

**Keywords:** Bioremediation, CuSO<sub>4</sub>, laccase, Metallothionine, *Pleurotus eryngii*, *Sarocladium* sp.



Shahrood University of Technology

Faculty of Agricultural Engineering

M.Sc Thesis in *Agricultural biotechnology*

Identification of copper contamination tolerant fungi and study of  
metallothioneine gene expression of dominant fungal species

By: Ferdos Ganji

Supervisor:

Dr. Shideh Mojerlou

Dr. Naser Safaie

October 2021