

اثرات میدان‌های شعوری طاهری بر رشد باکتری اشیریشیا کولای BL21 و رفتار جذب زیستی ساکارومایسس سرویزیه^۱ در حذف فلز سنگین سرب در شرایط گرانش متغیر

* نویسنده مسئول: فرید سمسارها، موسسه‌ی بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران، صندوق پستی: ۱۳۸۴-۱۳۱۴۵، تهران، ایران
تلفن: +۹۸ - ۹۱۲۱۷۸۶۵۷۷
ایمیل: Semsarha@ut.ac.ir

محمدعلی طاهری^۱، زهرا حاج ابراهیمی^۲، سارا ترابی^۳، فرید سمسارها^{۴*}

DOI: doi.org/10.61450/joci.FA.v2i12.165

- ۱- بخش تحقیق و توسعه‌ی ساینس‌فکت، مرکز تحقیقات کامپوایتل، انتاریو، کانادا
- ۲- محقق هوافضا و علوم زیستی، تهران، ایران
- ۳- گروه بیولوژی گیاهی، دانشکده‌ی زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران
- ۴- مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران، تهران، ایران

چکیده

در آزمایش‌های قبلی رشد میکروارگانیسم‌های مختلف تحت تاثیر میدان‌های شعوری طاهری (TCFs) مورد بررسی قرار گرفت. این میدان‌ها با ویژگی‌های غیرمادی و غیرانرژیایی می‌توانند اثرات قابل ردیابی بر سیستم تحت مطالعه داشته باشند و مشخص شده است آن‌ها از میدان‌های مغناطیسی، الکتریکی و گرانش متفاوت هستند. هدف این مطالعه بررسی اثرات میدان‌های شعوری (ط) بر رشد باکتری اشیریشیا کولای سویه BL21 به عنوان موجود زنده‌ی مدل پروکاریوت در شرایط میکروگراویتی (MG) و همچنین، بررسی رفتار جذب زیستی فلز سنگین سرب توسط *Saccharomyces Cerevisiae*، مدل یوکاریوت، در MG و گرانش زمین (IG) بود. در این آزمایش‌ها که به طور مجزا انجام شدند، نمونه‌های بدون تاثیر میدان‌های شعوری (ط) به عنوان کنترل در نظر گرفته شدند و مدت زمان آزمایش ۲۴ ساعت بود. ابتدا، رشد باکتریایی با روش اندازه‌گیری دانسیته‌ی نوری در ۶۰۰ نانومتر (OD600) مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که محیط میکروگراویتی باعث افزایش رشد باکتری تا حدود ۱/۴٪ در مقایسه با گرانش زمین (IG) شد. در حالی که تحت تاثیر میدان‌های شعوری (ط) تفاوت معناداری بین نمونه‌های MG و IG مشاهده نشد. در مطالعه‌ی دوم، از تکنیک طیف‌سنجی جرمی پلاسمای جفت‌شده القایی (ICP-MS) به منظور ارزیابی جذب فاز سنگین استفاده شد. نتایج نشان داد که مخمر قادر به جذب فلز سنگین در هر دو گرانش بود و محیط MG جذب را به طور معنادار و حدود ۱۳/۵٪ نسبت به گرانش زمین افزایش داد. اگرچه اثر TCFs بر نمونه‌ی MG معنادار نبود اما در شرایط گرانش زمین جذب فلز سرب را به طور معناداری تا حدود ۹٪ کاهش داد. در جمع‌بندی، محیط میکروگراویتی باعث افزایش رشد این سویه از باکتری ای کولای شد و اعمال میدان‌های شعوری (ط) این القای رشد را مهار کرد. همچنین، این میدان‌ها بر مدل یوکاریوت به طور متفاوتی در دو گرانش IG و MG اثر داشتند. پیشنهاد می‌شود در مطالعات بیش‌تری اثر میدان‌های شعوری (ط) بر رفتار موجودات زنده پروکاریوت و یوکاریوت تحت تنش میکروگراویتی بررسی شود.

کلیدواژه‌ها: میدان شعوری طاهری، میکروگراویتی، اشیریشیا کولای، رشد، مخمر، سرب

اعمال میکروگراویتی

در این مطالعه، شرایط میکروگراویتی با استفاده از کلینوستات (اهدای دفتر امور فضایی سازمان ملل متحد در وین به پژوهشگاه هوافضای ایران) انجام شد. اگرچه حذف بردار گرانش روی سطح زمین امکان پذیر نیست اما این دستگاه می تواند نمونه‌ی قابل قبولی از آزمایش‌های فضایی در شرایط میکروگراویتی واقعی ارائه دهد. برای این منظور، کلینوستات با اشعه‌ی ماوراء بنفش و اتانول (۷۰٪) استریل شد و سپس در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی گراد قرار داده شد. نمونه‌ها به منظور جلوگیری از تشکیل حباب‌های هوا در سرنگ‌های ۵۰ میلی‌لیتری در نگه‌دارنده‌ی دایره‌ای در دستگاه کلینوستات ثابت شدند. شش سرنگ در کلینوستات وجود داشت که سه نمونه از این سرنگ‌ها به مدت ۲۴ ساعت تحت تاثیر TCFs قرار داشتند و سرعت چرخش دستگاه ۳۰ دور در دقیقه بود (۷). در آزمایش مخمر سرعت چرخش دستگاه بر روی ۱۵ دور در دقیقه تنظیم شد (۸) و در دمای ۲۷ درجه‌ی سانتی گراد داخل انکوباتوری استاندارد اجرا شد. نمونه‌ها در شرایط گرانش زمین در کنار کلینوستات در انکوباتور قرار گرفتند. سه نوع میدان شعوری (ط)، هم‌زمان با چرخش کلینوستات به نیمی از نمونه‌ها اعمال شد و به مدت ۲۴ ساعت ادامه یافت. نمونه‌های بدون تاثیر TCF در محیط MG و زمین به عنوان کنترل در نظر گرفته شدند.

گروه‌ها و نمونه‌های آزمایش بر مخمر به صورت زیر است:

- نمونه‌ی استاندارد با مقادیر مشخص و اولیه از فلزات سنگین.
- نمونه‌ی تحت تاثیر میدان‌های شعوری (ط) در شرایط میکروگراویتی (MG-TCFs)
- کنترل واقع در شرایط میکروگراویتی (MG-Control)
- نمونه‌ی تحت میدان‌ها واقع در شرایط گرانش زمین (1G-TCFs) و کنترل واقع در شرایط گرانش زمین (1G-Control).

اندازه‌گیری دانسیته‌ی نوری (OD)

رشد سلول باکتریایی با اندازه‌گیری OD600 برای نمونه‌های تحت تاثیر میدان‌های شعوری (ط) در گرانش زمین و میکروگراویتی انجام شد. هر اندازه‌گیری سه بار تکرار داشت. به منظور تخمین رشد یک میلی‌لیتر از نمونه‌ها استفاده شد.

محیط کشت مخمر و توده‌ی زیستی

S. cerevisiae ATCC 9763 در زمان رشدی ۷۲-۴۸ ساعت از اداره‌ی تحقیقات و فناوری وزارت علوم به صورت خشک انجمادی تهیه و در دمای ۲۵-۳۰ درجه‌ی سانتی گراد در شرایط هوایی نگه‌داری شد. محیط کشت حاوی یک گرم گلوکز، ۰/۲۵ گرم عصاره‌ی مخمر، یک گرم کلرید آمونیوم، ۰/۷۵ گرم Na_2HPO_4 و ۱/۲۵ گرم KH_2PO_4 بود. تمام اجزای کشت و معرف‌های شیمیایی به صورت خالص از مرک (Darmstadt، آلمان) خریداری شد. این مواد به طور جداگانه در سه فلاسک ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر آب دی‌یونیزه در دمای ۱۲۱ درجه‌ی سانتی گراد و فشار ۱/۴ اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شدند. لازم به ذکر

میکروارگانیزم‌ها قادرند شرایط سخت محیطی را تحمل کنند و حتی در دماهای بسیار بالا رشد و تکثیر داشته باشند (۱). بنابراین، این موضوع حائز اهمیت است که بدانیم آیا آن‌ها می‌توانند در استرس‌های مختلف فضا زندگی کنند؟ به عبارت دیگر، انجام مطالعات بر میکروب‌ها در محیط فضا به منظور درک خطرات احتمالی آن‌ها و حفظ سلامت خدمه در مأموریت‌های طولانی ضروری است (۲). رشد اشیریشیا کولای به طور مکرر در شرایط میکروگراویتی (MG) مورد بررسی قرار گرفته است و گزارش‌های گوناگونی درباره‌ی پاسخ‌های فیزیولوژیکی آن‌ها و بیان ژن تغییر یافته در این تنش وجود دارد (۳).

مخمر ساکارومایسس سرویزیه یکی از بهترین مدل‌های یوکاریوت شناخته شده است. این مدل، به دلیل قابلیت جذب فلزات سنگین نیز مورد توجه قرار گرفته است (۴). فلزات سنگین می‌توانند تهدیدی برای موجودات زنده باشند. امروزه، به دلیل انقلاب صنعتی، زندگی انسان‌ها تحت تاثیر میزان بالای تولیدات فلزات سنگین قرار گرفته است. به همین دلیل به منظور بررسی اثرات آن‌ها بر زنجیره‌ی غذایی و مضرات بلندمدت آن، مطالعات متعددی انجام شده است (۵). برای حذف این آلودگی‌ها، تکنیک‌های گوناگونی، مانند روش‌های غیرزیستی همچون تکنولوژی‌های الکتروشیمیایی و راه‌های زیست‌پالایی^۱ که متکی به استفاده از میکروارگانیزم‌ها است، به کار گرفته می‌شود (۶). در این مطالعه، ابتدا اثرگذاری ترکیب سه نوع از میدان‌های شعوری طاهری (TCFs) بر رشد باکتری اشیریشیا کولای، سویه‌ی BL21 در شرایط MG مورد بررسی قرار گرفت و پس از مشاهده‌ی نتایج، آزمایش دیگری بر رفتار جذب زیستی ساکارومایسس سرویزیه در حذف فلز سرب در دو محیط گرانش زمین (1G) و MG تحت تاثیر این میدان‌ها طراحی شد.

مواد و روش‌ها

به کارگیری میدان‌های شعوری طاهری: با توجه به توضیحات ارائه شده در بخش ملاحظات این شماره، نمونه‌ها تحت تاثیر این میدان‌ها قرار گرفتند.

محیط کشت باکتری

ابتدا سویه‌ی BL21 اشیریشیا کولای با استفاده از محیط کشت مایع Luria-Bertani (LB) کشت داده شد که این محیط شامل (در هر ۱۰۰ میلی‌لیتر): یک گرم پپتون (QUELAB)، ۰/۵ گرم عصاره‌ی مخمر (QUELAB)، یک گرم NaCl (مرک، آلمان) بود. سپس پنج میکرولیتر از استوک باکتری در محیط کشت مایع LB با پنج میکرولیتر آمبی سلین کشت شد و در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی گراد، به مدت ۱۶ تا ۱۸ ساعت انکوبه شد.

مواجهه‌ی مخمر با فلز سنگین

پیش از انجام آزمایش جذب زیستی، ابتدا تمامی ظروف شیشه‌ای به مدت ۲۴ ساعت در اسید نیتریک ۱۵٪ خیسانده شدند تا آلودگی احتمالی فلزی از بین برود. سپس با آب دیونیزه شسته و به‌درستی خشک شدند. علاوه بر این، ظروف و ابزار تمیزشده در آن با دمای ۱۸۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت سه ساعت استریل شدند. سپس حجم مورد نیاز محلول اسپایک‌شده با مقداری شامل ۲۸ میکروگرم در لیتر سرب تهیه شد و pH محلول به وسیله‌ی سود و اسیدکلریدریک 0.1 N روی ۵ تنظیم شد. پس از آن ۱۰ میلی‌لیتر از محلول حاوی مخمر (seed) به فالكون منتقل و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۴۰۰۰ سانتی‌فیوژ شد. مایع رویی به‌دقت تخلیه شد تا یک میلی‌لیتر از آن در فالكون باقی بماند. در نهایت نه میلی‌لیتر محلول اسپایک‌شده به محلول اضافه شد و غلظت مخمر $2/5 \times 10^7$ CFU/ml بود. سپس این محلول به سرنگ منتقل شد و بعد از هواگیری در دستگاه کلینوستات و یا شرایط گرانش زمین قرار گرفت.

در این مطالعه غلظت فلزات سنگین با استفاده از روش طیفسنجی جرمی پلاسمای القایی (ICP-MS; Perkin Elmer ELAN 6100 DRC-e, USA) انجام شد (۸).

آنالیز آماری

هر آزمایش سه بار تکرار شد. داده‌ها به‌صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد ارائه شد. سپس تحلیل واریانس دو طرفه و به دنبال آن، مقایسه‌های چندگانه با فاصله‌ی اطمینان ۹۵٪ با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism (نسخه‌ی ۹) انجام شد و مقادیر معنادار کمتر از 0.05 ($p < 0.05$) ارائه شد.

نتایج و بحث

اندازه‌گیری چگالی نوری (OD) نشان داد که در محیط MG، رشد باکتری‌ها بدون تاثیر TCFs (کنترل) نسبت به گرانش زمین تا ۱/۴٪ افزایش یافت (شکل ۱). اما در نمونه‌هایی که تحت تاثیر میدان‌ها بودند نسبت به گرانش زمین تغییر معناداری مشاهده نشد.

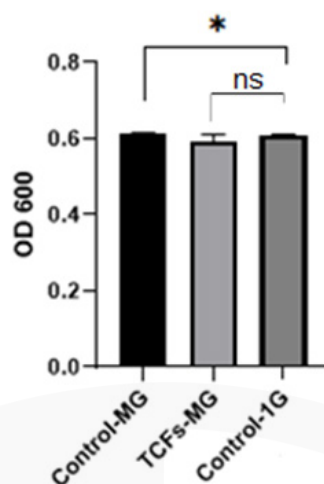
است تمامی ظروف شیشه‌ای خالی به مدت سه ساعت در دمای ۱۸۰ درجه‌ی سانتی‌گراد تحت حرارت خشک اتوکلاو شدند. پس از سردشدن در شرایط استریل، مواد مخلوط شد و به حجم نهایی ۱۵۰ میلی‌لیتر رسید. سپس ۱۰۰ میلی‌لیتر از کشت آماده‌شده در ارلن استریل ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد و ۱۰ کلنی از مخمر در پلیت در آن تلقیح شد. سپس در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۰-۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۶ تا ۲۰ ساعت با سرعت ۸۰ دور در دقیقه قرار داده شد تا مخمر رشد کند و به پایان مرحله‌ی رشد نمایی (کشت اصلی) برسد. پس از این مدت، محیط کشت مایع مغذی به شکل کدر در می‌آید که نشان‌دهنده‌ی تکثیر سلول‌های مخمر است. هدف از این کار افزایش میزان زیست توده است. محلول کشت اصلی تا زمان مطالعات جذب زیستی در یخچال و در شرایط استریل قرار داده شد.

شمارش کلنی توده‌ی زیستی

برای انجام آزمایش جذب زیستی، تهیه‌ی کشت فعال seed به‌صورت روزانه ضروری است. برای این منظور، ۱۰ میلی‌لیتر از کشت اصلی (مستر) در شرایط استریل به ۱۰۰ میلی‌لیتر کشت تهیه‌شده اضافه و همانند کشت اصلی در انکوباتور شیکردار قرار داده شد. اولین کشت seed شمارش شد و از آن‌جا که در تمام آزمایش‌ها، جذب بیولوژیکی مخمر با روش مشابه و محلول کشت اولیه انجام شد، این اولین شمارش سلولی به‌عنوان معیاری برای کشت seed بعدی در نظر گرفته شد. کشت seed فعال‌شده با استفاده از روش رقت سریال شمارش شد. به این ترتیب یک میلی‌لیتر از کشت seed به نه میلی‌لیتر سرم فیزیولوژیک منتقل و به نسبت ۱:۱۰ رقیق شد و ۱۰ بار به‌صورت متوالی تکرار شد. پس از آن، از هر رقت، دو حجم یک میلی‌لیتری برداشت و در دو صفحه‌ی جداگانه ریخته شد. سپس سابورو دکستروز آگار^۱ (SDA) در دمای ولرم به پلیت‌ها اضافه شد. پلیت‌ها به شکل عدد ۸ در جهت عقربه‌های ساعت و خلاف جهت عقربه‌های ساعت چرخانده شدند و سپس به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. شمارش ریز کلنی‌های مخمر با دو تکرار انجام شد و میانگین $2/5 \times 10^4$ CFU/ml را نشان داد. این روش بر اساس مشاهده‌ی کلنی‌های واقعی و شمارش دقیق مخمر ساکارومایسس سرویزیه است (۸).

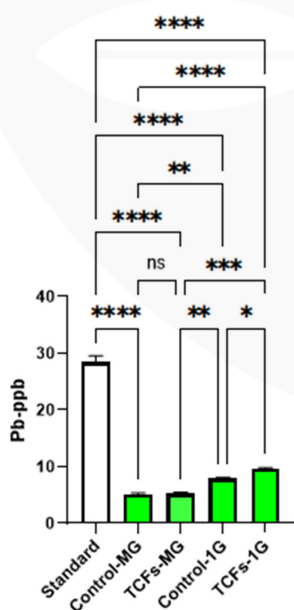
استانداردها و محلول‌ها

در این مطالعه در تمامی مراحل جهت تهیه‌ی محلول‌های آبی از آب دیونیزه استفاده شده است. جهت تهیه‌ی محلول ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر از محلول استاندارد سرب (Pb^{2+}) با غلظت اولیه‌ی 1000 میلی‌گرم بر لیتر (Merck)، ابتدا یک میلی‌لیتر از محلول استاندارد ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سرب را در نه میلی‌لیتر اسیدنیتریک ۱٪ مخلوط کرده و پس از مخلوط کردن، محلول ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر حاصل می‌شود. این عمل را جهت تهیه‌ی محلول ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر تکرار نمودیم. علاوه بر این، ۰/۸۳ میکرولیتر 36% HCl و ۰/۴ گرم NaOH در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه‌ی رقیق‌شده تا 1.0 N از این محلول‌ها تهیه شود و 0.5% NaCl (w/v) با افزودن ۰/۵ گرم از آن در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه تهیه شد.



شکل ۱. دانسیته‌ی نوری در ۶۰۰ نانومتر (OD600) سویه‌ی *BL21* اشریشیا کولای تحت تاثیر میدان‌های شعوری (ط) (TCFs) در شرایط میکروگروایتی (MG) و در مقایسه با گرانش زمین (1G) در ساعت ۲۴. ارور بارها نشان‌دهنده‌ی میانگین $\pm$ استاندارد ارور از سه تکرار است. *: $p\text{-value} < 0.05$ در تست آماری Brown-Forsythe و ns : غیرمعنادار است.

که اعمال میدان شعوری (ط) باعث شد اثر القای رشد محیط میکروگروایتی بر باکتری ای کولای مهار شود، نشان می‌دهد نشان می‌دهد اثر این میدان‌ها مستقل از گرانش است. به منظور درک سازوکار اثرگذاری این میدان‌های شعوری (ط) مطالعات بیشتری نیاز است. به‌عنوان مثال در این آزمایش، کاهش جذب زیستی مخمر در حذف فلز سنگین سرب در گرانش زمین نامشخص است و نیاز به آزمایش‌های بیشتری دارد. بنابراین، پیشنهاد می‌شود اثر میدان‌های شعوری (ط) بر رفتار مدل‌های پروکاریوت و یوکاریوت در شرایط میکروگروایتی و هایپرگروایتی نیز بررسی شود.



شکل ۲. اثر میدان‌های شعوری طاهری (TCFs) بر تغییرات غلظت باقی‌مانده‌ی سرب (Pb) در مقایسه با مقدار استاندارد. *, **, *** و **** به ترتیب نشان‌دهنده‌ی $p\text{-value} < 0.05$, < 0.01 , < 0.0002 و < 0.0001 است.

در مطالعه‌ی قبلی تاثیر میدان شعوری (ط) ۱ یا فرادرمانی، بر رشد جمعیت باکتریایی تایید شده است (۶). در آزمایش حاضر، باکتری‌ها به‌طور هم‌زمان تحت تاثیر سه نوع میدان شعوری (ط) بودند و مشخص شد تحت تاثیر این میدان‌ها رشد کم‌تری در شرایط میکروگروایتی داشتند. باکتری ای کولای، بخشی از فلور نرمال انسان بوده و البته بهترین موجود زنده‌ی شناخته‌شده است. بنابراین، مطالعات بر این مدل می‌تواند افق دید ما را نسبت به پاسخ‌های احتمالی‌اش در شرایط میکروگروایتی و خطرات بالقوه‌ی آن برای سلامتی خدمه‌ی فضایی وسعت بخشد. گزارش شده است که میکروگروایتی تشکیل بیوفیلم ای کولای را افزایش می‌دهد (۹). علاوه بر ای کولای، آزمایش مشابهی بر مدل یوکاریوت ساکارومایسیس سرویزیه انجام شد و رفتار جذب زیستی این مخمر در حذف فلز سنگین سرب در شرایط MG و 1G با و بدون تاثیر سه نوع TCF نیز بررسی شد.

مقادیر باقی‌مانده از سرب در هر گروه آزمایشی پس از حذف مخمرها از محیط و مقایسه‌ی آن با محلول استاندارد، در شکل ۱ نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود در وهله‌ی اول، جذب این فلز سنگین به وسیله‌ی این مخمر تایید می‌شود. در رابطه با محیط میکروگروایتی، این شرایط استرس اثر مثبتی بر جذب فلز سرب داشته است؛ طوری که جذب آن حدود ۱۳/۵٪ نسبت به گرانش زمین افزایش داشته است. مشخص شده که این تک‌سلولی یوکاریوت می‌تواند شرایط تنش MG را حس کند و به این تحریک مکانیکی پاسخ سلولی بدهد. مانند تغییر در مورفولوژی، نرخ رشد و بیان ژن (۱۰). اعمال TCFs اثرات متفاوتی در دو گرانش بر رفتار جذب زیستی مخمر داشت. در گرانش 1G، میزان فلز باقی‌مانده به‌طور معناداری بیش از نمونه‌ی کنترل است (حدود ۹٪). در حالی که اعمال میدان‌ها در محیط میکروگروایتی، تغییری در رفتار جذبی ایجاد نکرده است.

علاوه بر این که این مطالعات به منظور جلوگیری از آلودگی‌ها در ماموریت‌های فضایی حائز اهمیت است، می‌تواند درک عمیق‌تری از حیات در خارج از زمین فراهم کند (۱۱). همچنین، این مشاهده

منابع

1. Takai, K., Nakamura, K., Toki, T., Tsunogai, U., Miyazaki, M., Miyazaki, J., ... & Horikoshi, K. (2008). Cell proliferation at 122 C and isotopically heavy CH₄ production by a hyperthermophilic methanogen under high-pressure cultivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(31), 10949-10954.
2. Mora, M., Wink, L., Kögler, I., Mahnert, A., Rettberg, P., Schwendner, P., ... & Moissl-Eichinger, C. (2019). Space Station conditions are selective but do not alter microbial characteristics relevant to human health. *Nature communications*, 10(1), 3990.
3. Aunins, T. R., Erickson, K. E., Prasad, N., Levy, S. E., Jones, A., Shrestha, S., ... & Chatterjee, A. (2018). Spaceflight modifies *Escherichia coli* gene expression in response to antibiotic exposure and reveals role of oxidative stress response. *Frontiers in microbiology*, 9, 310.
4. Wang, J., & Chen, C. (2006). Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: a review. *Biotechnology advances*, 24(5), 427-451.
5. Bermudez, G. M., Jasan, R., Plá, R., & Pignata, M. L. (2012). Heavy metals and trace elements in atmospheric fall-out: their relationship with topsoil and wheat element composition. *Journal of hazardous materials*, 213, 447-456.
6. Taheri, M. A., Zarrini, G., Torabi, S., Nabavi, N., & Semsarha, F. (2021). Influence of Fara-darmani Consciousness Field on Bacterial Population Growth. *bioRxiv*, 2021-01.
7. Shao, D., Yao, L., Riaz, M. S., Zhu, J., Shi, J., Jin, M., Huang, Q., & Yang, H. (2017). Simulated microgravity affects some biological characteristics of *Lactobacillus acidophilus*. *Applied microbiology and biotechnology*, 101(8), 3439–3449. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-8059-6>
8. Mirmahdi, R. S., Mofid, V., Zoghi, A., Khosravi Darani, K., & Mortazavian, A. M. (2022). Risk of low stability *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763-heavy metals complex in gastrointestinal simulated conditions. *Heliyon*, 8(5), e09452. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09452>
9. Lynch, S. V., Mukundakrishnan, K., Benoit, M. R., Ayyaswamy, P. S., & Matin, A. (2006). *Escherichia coli* biofilms formed under low-shear modeled microgravity in a ground-based system. *Applied and environmental microbiology*, 72(12), 7701-7710.
10. G Willaert, R. (2013). The growth behavior of the model eukaryotic yeast *Saccharomyces cerevisiae* in microgravity. *Current Biotechnology*, 2(3), 226-234.
11. Scalzi, G., Selbmann, L., Zucconi, L., Rabbow, E., Horneck, G., Albertano, P., & Onofri, S. (2012). LIFE experiment: isolation of cryptoendolithic organisms from Antarctic colonized sandstone exposed to space and simulated Mars conditions on the International Space Station. *Origins of Life and Evolution of Biospheres*, 42, 253-262.