مجلة پژوهشي دانشگاه اصفهان (علوم پايه)
جلد بيست و هشتم ـ شماره ۲ ـ سال ۱۳۸٦
صص٥٤-٤٣

توانايي پلي ساكاريدهاي ديواره سلولي كالوس تنباكو (Nicotiana tabacum L. cv. Burley 21) در جذب نقره

راضيه رجبي- فائزه قناتي
گروه زيست شناسي دانشگاه تربيت مدرس

چكيده

در سال‌هاي اخير از گياهان و بخش‌هاي مرده آنها براي حذف آلاينده‌هاي محيط زيست (نظير فلزات سنگين و مواد آلي) استفاده مي شود. در بسياري از تحقيقات گذشته، ديواره سلولي به عنوان يكي از جايگاه‌هاي جذب فلزات سنگين معرفي شده است. با توجه به اينكه ديواره سلولي از پلي ساكاريدهاي مختلفي تشكيل شده است؛ لذا شناسايي موثرترين پلي ساكاريدهاي ديواره اي در جذب فلزات، مي تواند فناوري آلودگي زدايي را بهبود دهد.

در مطالعه حاضر،كالوس‌هاي تنباكو واريته Burley 21 به عنوان سلول‌هاي مدل در محيط جامدLS كشت داده شدند و ماده زمينه اي پلي ساكاريدي از ديواره سلولي كالوس، استخراج و در نهايت اجزاي پلي ساكاريدي آن شامل پكتين، همي سلولز A ، همي سلولز B و سلولز جداسازي و تخليص گرديد. ماده زمينه اي و اجزاي پلي ساكاريدي ديواره با محلول حاوي نقره با غلظت ppb ۱۰۰ در سه pH مختلف(اسيدي،تقريبا خنثي وقليايي) و دو زمان متفاوت تيمار داده شدند. بر مبناي نتايج بدست آمده از(ICP)، اجزاي پلي ساكاريدي ديواره در تمام pHها و زمان‌هاي مورد آزمايش، قادر به جذب نقره بودند.

واژه‌هاي كليدي: Phytoremediation ،سلولهاي تنباكو، محيط كشت LS ،ماده زمينه اي پلي ساكاريدي ديواره ، سلولز، پكتين، همي‌سلولز A و همي سلولز B .

Ability of Polysaccharides of Tobacco(Nicotiana tabacum L. cv. Burley 21) Callus Cell Wall to Ag Absorption

R. Rajabi, F. Ghanati

Department of Biology University of Tarbiat Modarres

Abstract

In recent years, the plants and their dead fractions have been used in order to remove pollutants (e.g. heavy metals and organics) from the environment. It has been noted by many investigations that cell wall with various polysaccharides is the main place for heavy metal absorption. It is noteworthy that defining the most efficient wall fraction can greatly improve the technology of Phytoremediation.

In this study, Tobacco (Nicotiana tabacum L. cv. Burley 21) Callus have been grown in solidified LS medium. The polysaccharide matrix of callus cell wall has been extracted and then polysaccharide components e.g. cellulose, pectin, hemicellulose A and hemicellulose B have been extracted and purified.

The matrix and their polysaccharide components were treated with aqueous solutions containing 100 ppb Ag in various pH (acidic, almost neutral and basic) and for different periods.

The results of ICP showed that the wall polysaccharide components adsorbed Ag in all applied pH(s) during the time of treatments.

Keywords: Phytoremediation, Nicotiana cells, solidified LS media, wall polysaccharide matrix, Cellulose, Pectin, Hemicellulose A, HemicelluloseB.

مقدمه

با پيشرفت صنعت و فناوري، بحث آلودگي محيط زيست به عنوان يكي از اساسي ترين مشكلات تهديد كننده حيات انسان وساير جانداران مطرح است. فلزات سنگين يكي از مهمترين آلاينده‌هاي خاک، آب و هوا به شمار مي‌آيند(۱۷). روش‌هاي قديمي و سنتي براي حذف فلزات سنگين از محيط زيست شامل دفن زباله ها، سوزاندن ،استفاده از روش‌هاي شيميايي و... با معضلاتي نظير گرم شدن كره زمين ، ذوب يخ‌ها و ورود مواد سمي نظير گازهاي دي اكسيد گوگرد، دي اكسيد كربن و نيتروژن همراه است(۱۷). فناوري باز يافت فلزات گرانبها با استفاده از مواد شيميايي، تهديدي براي سلامت ملي و محيطي محسوب مي شود. بنابراين لازم است از سيستم‌هاي مهربان با طبيعت براي باز يافت فلزات گرانبها استفاده شود(۶).

از قرن‌ها قبل گياهان به منظور تصفيه فاضلاب‌ها پيشنهاد شدند و در سال‌هاي قبل ثابت شد كه گياهان در حال رشد بر روي خاک‌هاي غني از روي، داراي مقادير زيادي از اين فلز در برگ‌هاي خود هستند(۷). مطالعاتي در آمريكا و ايتاليا نشان داد كه گياهاني از جنس Astaragalus وگياه Alyssum bertonolii به ترتيب قادرند بيش از ۶/ درصد سلنيوم و يک درصد نيكل را در ساقه و برگ‌هاي خشک خود جمع كنند(۱۵). اين مطالعات سبب شد تا عقيده استفاده از گياهان براي استخراج فلزات از خاک‌ها و آب‌هاي آلوده به عنوان فن

آوري نويني مطرح گردد.

آلودگي زدايي بـا اسـتفاده از گياهـان(Phytoremediation) فناوري نويني است كه از آن براي حذف آلاينده هـايي نظيـر فلـزات سـنگين، مـواد آلـي و بازيافـت فلـزات كـم يـاب از پساب‌ها و فاضلاب‌ها استفاده مي‌شود (۷و ۱۳). ايـن فنـاوري گياهي به چند شاخه تقسيم مي‌شودكه يكي از شـاخه‌هـاي آن استفاده از گياهان براي حذف آلاينده‌هاي خاک نظيـر فلـزات سنگين (Phytoextraction) است. مطالعـات متعـدد نـشان داده است كه برخي از گونه‌هاي گيـاهي قـادر بـه جـذب فلـزات سنگين از محيط زيست هستند (۷).

ابتدا محققان بر اين باور بودند كه فقط گياهـان زنـده قادر به جذب فلزات سنگين از زيستگاه خود هـستند؛ امـا در سال‌هاي اخير ثابت شده كه بخش‌هاي مـرده برخـي از باكتري ها، قارچ ها، جلبك‌ها و گياهان عالي نيز قـادر بـه جذب فلزات سنگين هـستند(۳، ۸،۹، ۱۷و ۱۸).اسـتفاده از بخش‌هاي مرده براي جذب فلزات سـنگين فوايـد زيـادي نسبت به بخـش‌هـاي زنـده دارد؛ زيـرا بخـش‌هـاي مـرده دستخوش اثـرات سـمي فلـزات سـنگين قـرار نگرفتـه و تخريب نمي شوند(۹).

تحقيقات نشان مي‌دهد جايگاه جذب و اتصال فلـزات در ديواره سلول (آپوپلاست)گياهان قراردارد و گروههـاي كربوكـسيلي و بـار الكتريكـي منفـي ديـواره در جـذب و اتصال با فلزات موثر است. ديواره سلول گياهي كه از پلي ساكاريدها، پروتئين ها، تركيبـات فنلـي و...تـشكيل شـده است، نقـش‌هـاي فيزيولـوژيكي بـسيار مهمـي در رشـد، ريخت زايي، جذب فلزات و... دارد. در تحقيقات گذشـته اشاره شـده كـه ديـواره سـلولي (آپوپلاسـم) در جـذب و اتصال بـا فلـزات سـنگين نقـش مهمـي دارد (۱۲)؛ ولـي تاكنون در مورد جذب فلـزات بـه وسـيله اجـزاي اصـلي ديواره سلولي تحقيقات گسترده اي صورت نگرفته است.

پلي ساكاريدهاي تشكيل دهنـده ديـواره بـه دو دسـته سلولزي و غيرسلولزي تقسيم مي‌شود.

۱- پلي سـاكاريدهاي سـلولزي شـامل سـلولز اسـت. سلولز رشته‌هاي خطي و غيـر منـشعب كـه از واحـدهاي گلوكزي با پيوند۴→۱ß تشكيل شده است. اين رشته‌ها در كنـار يكـديگر ميكروفيبريـل‌هـاي سـلولزي را بوجـود مي‌آورند(۴).

۲- پلي ساكاريدهاي غير سـلولزي كـه شـامل پكتـين، همي سلولز، كالوز و...است.

الف) پكتين: پيچيده تـرين پلـي سـاكارید موجـود در ديواره سلولي است و اعمال متعددي در رشد و نمو گيـاه ايفا مي كند. براي مثال يون‌هاي فلزات آهن، كلسيم، منگنز و... كه در واكنش‌هـاي زيـستي دخالـت دارنـد، از طريـق اتصال با پكتين از ديواره به سيتوپلاسم منتقل مي شـوند و احتمالا بار الكتريكي منفي گروه‌هـاي كربوكـسيلي سـبب اتصال يون‌ها به پكتين مي‌شوند. تفاوت اساسي پكتـين بـا همي سلولز در فراواني اسيدهاي يورونيك در پكتـين مـي باشد(۵و۱۲).

ب) همي سلولز: همي سلولز، يك گـروه نـاهمگن و غير يكنواخت از پلي ساكاريدها و بخشي از مواد زمينه اي ديواره است. همي سلولز از نظر ساختار شيميايي متـشكل از پنتوزان‌ها (آرابان ها، زايلان ها)، هگزان‌هـا (مانـان هـا، گلوكومانان‌ها و گالاكتـان هـا) بـا مقـدار كمـي اسـيدهاي يورونيك (اسيد گلوكورونيك و اسيد گالاكتورونيك) مـي باشد (۴). همـي سـلولز بـه ۲ دسـته همـي سـلولزA و B تقسيم مي‌شود. تفاوت بين اين دو در نوع قندهاي تشكيل

دهنده و بار الكتريكي آنهاست(١٧).

با استفاده از اين پژوهش مي توان به ايـن نتيجـه مهـم دست يافت كه با توجه به تحقيقات محققان، نه تنها ريشه، ساقه و برگ گياهان قادر به جذب فلزات سنگين هـستند؛ بلكه اجزاي پلي ساكاريدي ديواره سلولي كـالوس تنبـاكو نيز قادر به جذب فلز نقره هستند. استفاده از اجـزاي پلـي ساكاريدي ديواره سلولهاي گياهي مي‌تواند ابـزاري نـوين براي جذب نقره ي موجود در پساب‌هـا و فاضـلاب‌هـاي معدني باشد.

مواد و روش‌ها

الف)مواد گياهي مورد استفاده در كشت بافت

كـشت بافـت در فنـاوري زيـست گيـاهي بـه دليـل كاربردهاي متعدد، اهميت زيادي دارد. به كشت سلول‌هاي جدا كشت، بافت‌ها و انـدام‌هـاي گيـاهي بـر روي محـيط كنترل شده و عاري از هر گونه ميكـرو ارگانيـسم، كـشت بافت گياهي اطلاق مي شود (١ و ٢). در تحقيق حاضر از كالـــوس تنباكو حاصل از مـــــــــزوفيل برگ‌هاي گياه

جدول١- اجزاي تشكيل دهنده محيط كشت **LS** (٢٠)

Essential elements	Final Concentrations(per 1 lit)
Macroelements	
NH_4NO_3	20.6(mM)
$CaCl_2.2H_2O$	2.99(mM)
$MgSO_4.7H_2O$	0.15(mM)
KH_2PO_4	1.25(mM)
KNO_3	18.8(mM)
Microelements	
KI	5(µM)
$MnSO_4.7H_2O$	99(µM)
$ZnSO_4.7H_2O$	27(µM)
$Na_2MoO_4.H_2O$	1.03(µM)
$CuSO_4.5H_2O$	0.1(µM)
$CoCl_2.6H_2O$	0.129(µM)
Iron source	
$FeSO_4.7H_2O$	99.9(µM)
NaEDTA	100(µM)
Organic Suplements	
NAA	16(µM)
IAA	17(µM)
Kinetine	4.65(µM)
Nicotinic acid	0.203(µM)
Pyridoxine-HCl	0.123(µM)
Thiamine-HCl	0.148(µM)
Myoinisitol	0.1(µM)
Sucrose	30(g)

Nicotiana tabacum L. cv. Burley 21 (اهـدايي از ژاپن) استفاده شد. اين لاين ، لاين سلولي بسيار خـوب و مناسب براي انجام آزمايشهاي زيستي بوده و سرعت تكثير بالايي دارد. علت اسـتفاده از تـودههـاي كـالوس و انجـام آزمايشات با اسـتفاده از كـشت بافـت ايـن اسـت كـه در كالوس سلولها تمايز نيافته ، همگن و هم ارز مي باشند و زماني كه سلولهـا داراي ديـواره اوليـه (متـشكل از پلـي ساكاريدها و گليكو پروتئينها) بوده و وارد مرحلـه ثانويـه رشد نشده اند، مي توان آنها را برداشـت كـرد (١و٢). بـه دليـل اينكـه هـدف تحقيـق حاضـر اسـتفاده از پلـي ساكاريدهاي ديواره سلولي در جذب نقـره مـي باشـد، از كشت سلولي استفاده گرديد.

ب) كشت كالوس تنباكو در محيط كشت **LS**

از محـيط كـشت تعـديل شـدهLS (Leinsmayer & Skoog)(جدول ١)فاقد گليـسين و داراي ٣ % سـاكارز و ٠/١ ميلي مولار بوريک اسـيد (٥/٨ pH) جهـت واكـشت تودههاي كالوس استفاده گرديـد(٢٠). تـودههـاي كـالوس تقريبا هـر ١۴- ٢١ روز يكبـار در زيـر هـود اسـتريل بـه محيطهاي جديد منتقل شـد و در اتـاق كـشت اسـتريل و دمـاي ٢±٢٧ و در شـرايط تـاريكي نگهـداري شـدند. تـودههـاي كـالوس هـر١۴- ٢١ روز برداشـت و بـر روي صافي(μm ۴٢) و قيف بوخنر ٣ مرتبه با آب مقطر (۴ برابر حجم كالوس) شسته و با استفاده از پمپ خلأ آب گيـري شدند. توده كيک مانند حاصل بلافاصله با نيتـروژن مـايع (°C ١٩٢-) تثبيت و در فريزر با دماي °C ٨٠ - نگهداري شد.

پ) استخراج ماده زمينه اي پلي ساكاريدي ديواره

براي حذف تركيبات محلول در آب سلول ها، تـوده منجمد شده پس از توزين، درون هاون با استفاده از بـافر سديم فسفات با pH ۶/٨ و غلظت ۵٠ ميلي مولار ساييده شد. پس از همگن شدن، به مدت بيست دقيقه دو بـار بـا بيست حجم از همان بافر بر روي لرزاننده تكان داده شـده و بر روي صافي، صاف گرديد. براي حـذف چربـيهـا و پروتئينهاي موجود در سلول ها، توده حاصل از مرحلـه قبل دوبار با۴ حجم(V/W) اتـانول مطلـق بـه مـدت دو دقيقه و١٠ حجم آن بـه مـدت يـک سـاعت شـسته و بـا استفاده از پمپ خلأ صاف شـد. سـپس بـه تـوده حاصـل ١٠حجم استون افزوده و پس از يک سـاعت صـاف شـد. توده جامد حاصـل بـه مـدت يـک شـب درون محلـول كلروفرم: متانول (به نسبت حجمي ١:٢) قـرار گرفـت. در نهايت پس از صاف كـردن بـر روي صـافي، تـوده سـفيد رنگي حاصل گرديد. اين توده كه عمدتا پلـي سـاكاريدي است در زير هود بـا دمـاي اتـاق بـه مـدت ۴-٣ سـاعت خـشک شـد. پـودر حاصـل تـا زمـان اسـتفاده در داخـل دسيكاتور نگهداري گرديد (١١).

ج) جداسازي تركيبات پلي ساكاريدي ديواره

براي اسـتخراج پلـي سـاكاريدهـاي ديـواره از روش Sakurai و همكاران (١۶) استفاده شد. بر روي ماده زمينـه اي پلي ساكاريدي ديواره به ترتيب اعمال زير انجام شـد. ابتدا به منظور استخراج پكتين موجـود در مـاده زمينـه اي پلي ساكاريدي از EDTA داغ (۵٠ ميلي مـولارEDTA در ۵٠ ميلي مولار بافر سديم فسفات بـا pH ۶/٨ و دمـايC° ١٠٠) استفاده شد و عمل استخراج سه بار تكرار و پس از هر بار، بر روي صافي، صاف گرديد. محلول حاصل درون كيسه ديـاليز (MWCO 8000) ريختـه شـد و بـه مـدت٢۴ ساعت درون ظرف حاوي دو ليتر آب مقطر قرار گرفـت و در طي اين مدت، آب ظرف ۴_۶ مرتبه تعـويض شـد.

به منظور استخراج همي سلولز به بخش باقيمانده ، محلول غلـيظ قليـايي % ١٧/٥ NaOH شـامل % ٠/٠٢ NaBH4 اضافه شد. اين عمل دو بـار تكـرار و در مـدت زمـان ١٨ ساعت انجام گرفت. همي سلولز پس از صـاف شـدن بـر روي صافي و در قيف بوخنر با افـزودن نـيم حجـم اسـيد استيک گلاسيال خنثي شـد. همـي سـلولز B بـه صـورت بخش خنثاي محلول و همي سلولز A به صورت رسـوب سفيدرنگ كلوئيدي درآمد. سپس با قرار گرفتن در كيـسه ديااليز به مدت ٢۴ ساعت با چندين بار تعويض آب مقطـر ، تخليص شد. سپس براي جـدا كـردن همـي سـلولز A و همي سلولز B از سانتريفوژ به مدت ٢٠ دقيقه با سـرعت g × ١۴٠٠٠ و دماي ١٠°C استفاده شد. پس از سانتريفوژ، همي سلولز A به صورت رسـوب و همـي سـلولز B بـه صورت بخش بر رو شناور جدا گرديد. بـه بخـش جامـد باقيمانده از مرحله قبـل(اسـتخراج همـي سـلولز) ، تـري فلورواستيک اسيد اضافه و بـه مـدت يـک سـاعت درون اتوكلاو (دماي ١٢١ درجه سانتيگراد) قـرار داده و سـپس صاف گرديد. رسوب حاصل دو مرتبه با اتانول : اتـر (بـه نسبت حجمـي ١:١) شـسته و بـر روي فيلتـر شيـشه اي صاف شد. بخش موجود بر روي فيلتر شيـشه اي، سـلولز است (١١). به منظور خشک كردن سلولز و همي سلولز A از هود استفاده شد؛ ولـي پكتـين و همـي سـلولز B درون فريزر ٨٠°C - منجمد شده و با استفاده از دستگاه Freeze – drier مـدل Snijders Scientific b.v. Tilburg سـاخت هلند خشک شدند.

د) تهيه محلول كلريد نقره با غلظت **ppb** ١٠٠

محلول‌هاي حاوي نقره از كلريد نقره با فرمولAgCl با غلظت ppb١٠٠ در سه pH مختلـف٣، ۶/٨ و ٨/٥ بـا آب ديونيزه تهيه شدند. pH اين محلول‌ها با استفاده از NaOH و HCl بـا غلظـت هـاي٠/٠٠١ نرمـال تنظـيم شـد. ايـن محلول‌ها درون يخچال و در ظروف تيره نگهداري شدند.

و) تيمار اجزاي پلي ساكاريدي با محلول كلريد نقره

مقدار ٢٠ ميلي گرم از ماده زمينه اي پلي سـاكاريدي و هر يک از اجزاي آن به طور جداگانـه در معـرض١٠ ميلي ليتر محلول كلريد نقره قرار داده شـدند. مطالعـات نشان مي دهد كه جذب فلزات توسـط اجـزاي گياهـان به دو عاملpH و زمان بستگي دارد؛ همچنـين محققـان در آزمايش‌هاي وابسته به زمـان و pH از محلـول‌هـاي داراي فلزات سنگين با pHهاي مختلـف(اسـيدي،تقريبا خنثي و قليايي) و زمـان‌هـاي متفـاوت تيمـار، اسـتفاده كردند(٩و١٠). لذا در اين تحقيق تيمـار هـر جـزء پلـي ساكاريدي با نقره در سه pH ٣ ، ۶/٨ و ٨/٥ و براي هر pH در دو زمـان يـك سـاعت و شـش سـاعت انجـام شد(٩). بعد از اتمام زمان تيمار، نمونه‌ها با سرعت g × ١٠٠٠٠، در دماي ١٠ ° C و به مدت ٢٥ دقيقه سانتريفوژ شدند. بعد از سانتريفوژ و صاف كردن بـر روي صـافي، بخش مايع از جامد جدا شد.

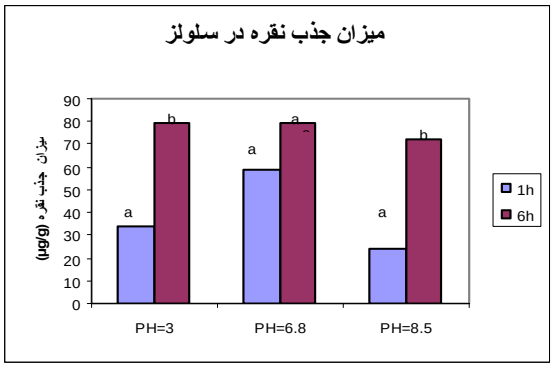
بخش‌هاي جامد هر يک با دو ميلـي ليتـر آب ديـونيزه شـسته و طبـق برنامـه قبـل سـانتريفوژ شـدند. بعـد از سانتريفوژ، بخشهاي محلول از بخش‌هاي جامد جدا شـده و بخش‌هاي جامـد درون اپنـدورف‌هـاي تميـز ريختـه و درون فريزر ٨٠°C - قـرار داده شـدند و پـس از منجمـد شدن با استفاده از دستگاه Freeze – drier خشک شدند و سپس ميزان نقره ي موجـود در آنهـا بـه روش‌هـاي زيـر سنجيده شد.

ن) سـنجش ميـزان جـذب نقـره بـا اسـتفاده از **ICP(Inductively Coupled Plasma Spectroscopy)**

به منظور تعيين غلظت نقـره از دسـتگاه ICP اسـتفاده شد. اسـتانداردهاي نقـره در غلظـت‌هـاي ppb ۵۰ - ۲۰۰ تهيه گرديد. بـه طـور خلاصـه روش كـار بـه شـرح زيـر مي‌باشد: نمونه‌ها پس از توزين و ريختن درون بوتـه‌هـاي چيني، داخل كوره با دماي ۳۰۰°C و ۵۰۰°C به ترتيب بـه مدت دو سـاعت و سـه سـاعت قـرار داده تـا در نهايـت خاكستر سفيد حاصل شود. پس از بيرون آوردن بوته‌هـاي چيني از درون كوره و خنک شدن آنها به هر كدام مقـدار يـک ميلـي ليتـر محلـول(۱۲N) H2O : HCl، بـه نـسبت حجمي ۱:۱ اضافه گرديد و بر روي حمام شـن بـا دمـاي ۱۱۰°C خشك شد. پس از خشک شدن كامل و سرد شدن بوته‌هـاي چينـي بـه هـر يـک مقـدار ۵ ميلـي ليتـر اسـيد كلريدريک N ۱ اضافه و محلول‌هاي حاصل درون ظروف پلاستيكي نگهداري شدند.

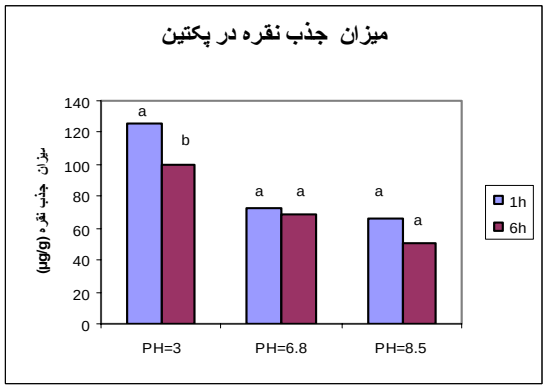
ي)روش‌هاي آمـــاري

با كمک دسـتگاه ICP مقـدار جـذب نقـره سـه مرتبـه خوانده شد. از نرم افزار Excel ، آنـاليز واريـانس و t.Test براي رسم نمودارها، تجزيه و تحليل آماري و تعيين معنـي دار بودن تفاوت‌ها در سطح $P \leq ۰/۰۵$ استفاده گرديد.



شكل۱- ميزان جذب نقره توسط سلولز در زمان‌ها و pHهاي متفاوت. حروف غير يكسان در هر ستون نماينده تفاوت معني دار در سطح $p<۰/۰۰۱$ مي باشد. (داده‌ها نماينده سه تكرار مي باشند. SD به دليل كوچک بودن ، نمايش داده نشده است)

* ميزان جذب نقره بر حسب ميكرو گرم در يک گرم سلولز يا هر جز ديگر پلي ساكاريدي ديواره بدست آمد.



شكل۲- ميزان جذب نقره توسط پكتين در زمان‌ها و pHهاي متفاوت حروف غير يكسان در هر ستون نماينده تفاوت معني دار در سطح $p<۰/۰۰۱$ مي باشد. (داده‌ها نماينده سه تكرار مي باشند. SD به دليل كوچک بودن ، نمايش داده نشده است)

نتـــايج

برمبناي نتايج حاصل از ICP بهترين pH و زمـان بـراي جذب بيشتر نقره توسط سلولز، ۳ pH و زمان شش ساعت بود. در ٦/٨ pH نيز مقدار جذب نقره زياد بوده و با ۳ pH تفاوت معني داري نداشت(شكل ۱).

پكتين در ۳ pH و زمان يك سـاعت مقـدار بيـشتري نقره جذب كرد. در pHهاي ديگر نيز، زمـان يـك سـاعت براي جذب بيشتر نقره مناسب تر بود (شكل۲).

بهترين pH و زمان براي جذب بيشتر نقره توسط همي سلولزB ، ۳ pH و زمان يك ساعت و در ديگر pHها مقدار

جذب نقره بسيار كم بود (شكل۳).

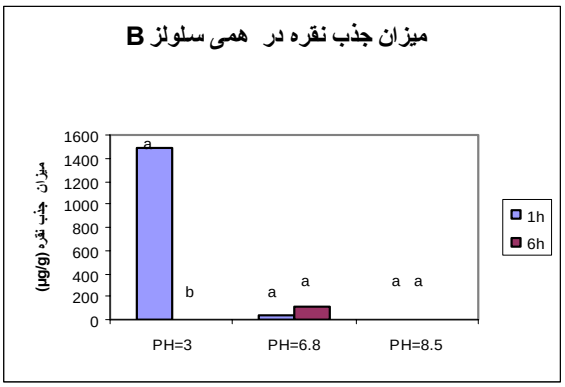
ماده زمينه اي پلي ساكاريدي ديواره در pH ٦/٨ و زمان شش ساعت مقدار بيشتري نقره جذب كرد. بهترين pH براي جذب نقره به ترتيب ٦/٨ و ٨/٥ و ٣ بود (شكل٤).

مقايسه اجزاي پلي ساكاريدي ديواره از نظر ميزان جذب نقره در **pH** هاي مختلف

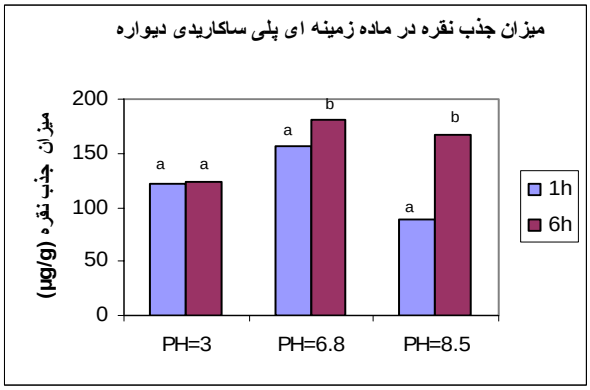
در pH اسيدي ، همي سلولز B در زمان يك ساعت در مقايسه با ساير اجزاي پلي ساكاريدي ديواره مقدار بيشتري نقره جذب كرد (شكل ٥).

در pH تقريبا خنثي ، همي سلولز B در زمان شش ساعت در مقايسه با ساير اجزاي پلي ساكاريدي ديواره بيشترين مقدار جذب نقره را داشته و سپس سلولز در زمان شش ساعت و پكتين در زمان يك ساعت مقدار بيشتري نقره جذب كردند (شكل ٦).

در pH قليايي، سلولز در زمان شش ساعت مقدار بيشتري نقره جذب كرد. سپس پكتين در زمان يك ساعت جذب بيشتري داشت و مقدار جذب همي سلولزB در مقايسه با آنها ناچيز بود (شكل۷).



شكل۳- ميزان جذب نقره توسط همي سلولز**B** در زمان‌ها و **pH**هاي متفاوت حروف غير يكسان در هر ستون نماينده تفاوت معني دار در سطح **p**<۰/۰۰۱ مي باشد. (داده‌ها نماينده سه تكرار مي باشند. **SD** به دليل كوچك بودن ، نمايش داده نشده است)



شكل٤- ميزان جذب نقره توسط ماده زمينه اي پلي ساكاريدي ديواره در زمان‌ها و **pH**هاي متفاوت حروف غير يكسان در هر ستون نماينده تفاوت معني دار در سطح **p**<۰/۰۰۱ مي باشد. (داده‌ها نماينده سه تكرار مي باشند. **SD** به دليل كوچك بودن ، نمايش داده نشده است)

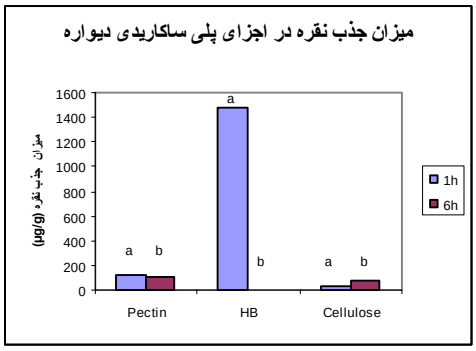
بحث و نتيجه گيري

در تحقيقات متعدد پيشنهاد شده است كه ديواره يكي از مكان‌هاي اصلي سميت زدايي فلزات سنگين و اولين بخش سلول گياهي است كه با فلزات اتصال برقرار مي‌كند (۱۴و۱۹). گياهان، فلزات را فعالانه در طي متابوليسم يا به طور غير فعال از طريق گروههاي عملكردي خود جذب مي‌كنند (۷).

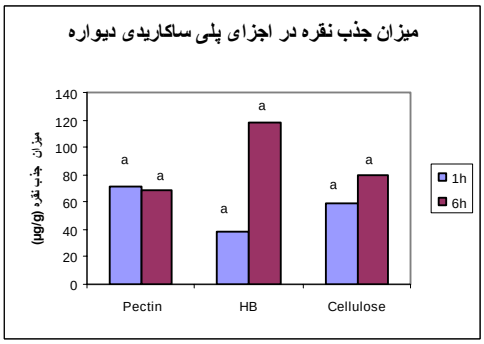
در بافت‌هاي مرده گياهان، اتصال فلزات به ديواره‌هاي سلولي به واسطه فرايندهاي زيستي نبوده بلكه به علت

اتصال شيميايي به گروههاي عملكـردي كربوهيـدرات‌هـا و... است (۹).

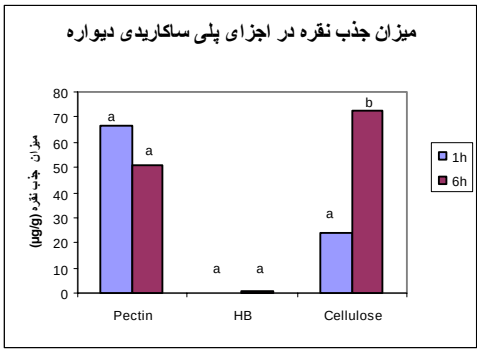
نتايج حاصل از تحقيق حاضر نشان داد كه ماده زمينـه اي پلـي سـاكاريدي و همـه اجـزاي پلـي سـاكاريدي آن (پكتين، همي سلولزB و سلولز) داراي جايگاههاي جذب براي برقراري پيوند با نقره مي‌باشند. اين اجزا در pHهـا و زمان‌هاي مورد آزمايش قادر به جذب نقره بودنـد. سـلولز در pH اسيدي و مدت زمان ۶ ساعت مقدار بيشتري نقـره جـذب كـرد (شـكل۱). بـا توجـه بـه سـاختار سـلولز و واحـدهاي تـشكيل دهنـده آن، بـه نظـر مـي‌رسـد كـه جايگاههـاي جـذب در سـلولز، گروههـاي هيدروكـسيلي موجود بر روي گلوكز باشد كه بـا افـزايش زمـان تيمـار، بيشتر اين جايگاهها اشغال مـي‌شـوند. در pH اسـيدي از يك طرف پروتون دار شدن و در نتيجه، مثبـت شـدن بـار الكتريكي عوامل هيدروكسيلي سـلولز (بـرهم كـنش‌هـاي الكتروستاتيك بين بارهاي ناهمنام) و از طرف ديگر وجود زوج الكترون‌هاي آزاد اكسيژن و خـالي يـا نيمـه پربـودن اربيتال‌هاي نقره، باعث كوئوردينه شدن اكسيژن بـا نقـره (ايجاد پيوند داتيو) در اين pH و سبب جذب بيـشتر نقـره شده است (۶). پكتين نيز قادر به جذب نقره بـود (شـكل ۲) و در pH اسيدي در مقايسه بـا pH هـاي ديگـر مقـدار بيشتري نقره جذب كرد. در مدت زمان يك سـاعت اكثـر جايگاههاي جـذب پكتـين اشـغال شـده اسـت، لـذا در pHهاي مورد آزمايش با افزايش زمان تيمار، مقدار بيشتري



شكل۵- مقايسه اجزاي پلي ساكاريدي ديواره از نظر ميزان جذب نقره در pH ۳. حروف غير يكسان در هر گروه نماينده تفاوت معني دار در سطح $p<۰/۰۰۱$ مي‌باشد. (داده‌ها نماينده سه تكرار مي باشند. SD به دليل كوچك بودن ، نمايش داده نشده است)



شكل۶- مقايسه اجزاي پلي ساكاريدي ديواره از نظر ميزان جذب نقره در pH۶/۸. حروف غير يكسان در هر گروه نماينده تفاوت معني دار در سطح $p<۰/۰۰۱$ مي باشد. (داده‌ها نماينده سه تكرار مي باشند. SD به دليل كوچك بودن ، نمايش داده نشده است)



شكل۷- مقايسه اجزاي پلي ساكاريدي ديواره از نظر ميزان جذب نقره در pH ۸/۵. حروف غير يكسان در هر گروه نماينده تفاوت معني دار در سطح p<۰/۰۰۱ مي باشد. (داده‌ها نماينده سه تكرار مي باشند. SD به دليل كوچك بودن ، نمايش داده نشده است)

نقره جذب نشد. پكتين عمدتا متشكل از اسيدهاي يورونيك بوده، بنابراين گروههاي كربوكسيلي آن (داراي بار منفي) در جذب و اتصال با نقره نقش اصلي را ايفا كرده اند.

با توجه به نتايج بدست آمده ميزان جذب و اتصال با نقره در همه اجزاي پلي ساكاريدي به دو عامل pH و زمان بستگي داشت و براي همه اجزاي ماده زمينه اي پلي ساكاريدي ديواره، pH اسيدي و زمان يک ساعت مناسب‌تر بود.

مطابق شكل ۳ همي سلولز B قادر به جذب مقدار زيادي نقره بود. جذب نقره در pH ۳ و زمان يك ساعت بيشتر بود. كاهش مقدار جذب نقره با افزايش زمان تيمار به دليل اتصالات سست و فيزيكي بوده كه با افزايش زمان تيمار مقداري از نقره به محلول پس داده شده است. در ماده زمينه اي پلي ساكاريدي ديواره كه داراي سلولز،پكتين، همي سلولزB وهمي سلولز Aاست، در pH ۶/۸ و زمان شش ساعت مقدار بيشتري نقره جذب شد(شكل۴).

اتصال نقره به اجزاي پلي ساكاريدي اتصال كاملا فيزيكي نبود؛ زيرا بخشي از نقره پس از شستشو و سانتريفوژ اجزاي پلي ساكاريدي در آن باقي مي‌ماند. اين اتصال به واسطه فرايندهاي زيستي(آنزيمي) نيز نبوده بلكه به دليل اتصال شيميايي نقره به گروههاي عملكردي (CHOH, COH، COOH) اجزاي پلي ساكاريدي بوده است (۱۰). بنابراين در اين تحقيق نشان داده شده است كه بين جايگاههاي جذب اجزاي پلي ساكاريدي ديواره و نقره پيوند برقرار شده است و مي توان از اجزاي تشكيل دهنده ديواره سلول‌هاي گياهي به عنوان روشي مهربان با طبيعت، براي حذف فلزات سنگين و بازيافت فلزات كمياب نظير نقره و طلا استفاده كرد.

منابع

۱- اج. دادز، جان و رابرتز، لورين ؛ تجربياتي در زمينه كشت بافت‌هاي گياهي؛ ترجمه قدير نوري قنبلاني؛ انتشارات دانشگاه تبريز؛ تبريز؛۱۳۷۱.

۲- م. تاجي، اكرم، ا.داد، ويليام و ا. ويليامز ريچارد ؛ كشت بافت گياهي؛ ترجمه احمد معيني و دانيال كهريزي؛ انتشارات سازمان بسيج دانشجويي؛تهران؛۱۳۸۲.

3- Ph., Ball, Fungus with the midas touch. ChemBio -Chem. 1-2; (2002).

4- D.J., Cosgrove, Wall structure and loosening. Plant physiol.125,131-134; (2001).

5- C.R., Franco, A. P., Chagas, A. Jorge. Ion-exchange equilibria with aluminium pectinates; Colloids and Surfaces.A: Physicochemical and Engineering Aspects.204,183-192; (2002).

6- G., Gamez, J.L., Gardea-Torresdey, K.J. , Tiemann, Chemical processes involved in Au(III) binding and bioreduction by Alfalfa biomass. Proceeding of the 2000 Conference on Hazardous Waste Research. 46-53; (2000).

7- C., Garbisu, and I., Alkorta, Phytoextraction :a cost-effective plant- based technology for the removal of metal from the environment. Bioresource Technology. 77, 229-236; (2001).

8- J. L., Gardea- Torresdey, I., Cano-Aguilera, R., Webb, K.J., Tiemann, and F., Gutierrez-Corona, Copper adsorption by inactivated cells Mucor rouxii : Effect of estrification of carboxyl groups. Journal of Hazardous Materials. 48, 171-180; (1996).

9- J. L., Gardea- Torresdey, K.J., Tiemann, J.H., Gonzalez, I., Cano- Aguilera, J.A., Henning, and M.S., Townsend, Ability of Medicago sativa (alfalfa) to remove nickel ions from aqueous solution. Proceeding of the Annual Conference on Hazardous Waste Research.(2000).

10- J.L., Gardea-Torresdey, K.J., Tiemann, J.G., Parsons, G., Gamez, and M., Yacaman, Jose. Characterization of trace level Au(III) Characterization of trace level Au(III) binding to alfalfa biomass (Medicago sativa) by GFAAS. Advances in Environmental Research. 6, 313-323; (2002).

11- F., Ghanati, Studies on boron tolerance mechanism of suspension- cultured Tobacco cells; Shizouka university. Ph.D thesis; (2002).

12- K., Kakagawa, Y., Edashige, and T., Ishii, Metabolism of cell wall polysaccharides in cell suspension cultures of Populus alba in relation to cell growth. Physiologia Plantarum. 108,420-425 ; (2000).

13- M.M., Lasat, Phytoextraction of metals from contaminated soil: a review of plant/soil/metal interaction and assessment of pertinent Agronomic issues. Journal of Hazardous Substance Research. 1-25; (2000).

14- H., Matsumoto, Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants; International Review of cytology. 200, 1-43; (2000).

15- I., Raskin, and B. D., Ensley, Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment; A Wiley_Interscience Publication.Canada.pp,231-233; (2000).

16 - N., Sakurai, S., Tanaka, and S., Kuraishi, Changes in cell wall polysaccharides of squash (Cucurbita maxima Duch.) hypocotyles under

water stress condition II. Composition of pectic and hemicellulosic polysaccharides. Plant Cell Physiology. 28, 1059-1070; (1987).

17- G., Sarret, A., Manceau, J.L., IIzemann, L., Spadini, J.C., Roux, Y., Soldo, L., Eybert-Berard, and J.J., Mentiionnex, Structural determination of Zn and Pb binding sites in Penicillium chrysogenum cell walls by EXAFS spectroscopy. Environ. Sci.Technol. 32, 1648-1655; (1998).

18- M., Sastry, A., Ahmad, M.I., Khan, Biosynthesis of metal nanoparticles using fungi and actinomycete. Current Science. 85, 2,162-170; (2003).

19- N., Schomhl, and W.J., Horst, Cell wall pectin content modulates aluminium sensitivity in Zea mays (L.) cells grown in suspension culture. Plant cell and Environment. 23, 735-742; (2000).

20- H., Yokota, and S., Konishi, Effect of the formation of sugar-borate complex on the growth inhibition of pollen tubes of Camellia sinensis and cultured cells of Nicotiana tabacum by toxic levels of borate. Soil Sci. Plant Nutr.36, 275-281; (1990).