دانشگاه الزهرا (س)

دانشکده علوم پایه

پایان نامه

جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد

رشته شیمی تجزیه

عنوان پایان نامه

بهینه‌سازی روش استخراج آنزیم‌های موجود درخاک‌های آلوده به ترکیبات نفتی و اندازه‌گیری آن‌ها با استفاده ازدستگاه GC FID و HPLC

استاد راهنما

خانم دکتر زهره مدرس تهرانی

استاد مشاور

آقای دکتر روانبخش شیردم

دانشجو

مریم ایمانی اختیار

دی ۱۳۹۰

حاصل این تلاشم را تقدیم می‌کنم به :

گوهران دریای محبت

بخشندگان بی منت

پدر و مادر عزیزم

و همسرم که با همراهی و راهنماییش همواره مشوق تحصیل من بودند.

تقدیر و تشکر:

بر خود لازم می‌دانم از تمام کسانی که در انجام این تحقیق حمایت و یاری‌ام کردند تشکر و قدردانی کنم.

از اساتید راهنما و مشاورم خانم دکتر زهره مدرس تهرانی و آقای دکتر روانبخش شیردم که همواره از توجه بی‌دریغشان برخوردار بوده‌ام سپاسگذارم.

از خانواده بزرگوار و همسر عزیزم که همواره مشوق و یاریگرم بودند تشکر می‌کنم.

از سرکار خانم دکتر آزاد و آقای دکتر اعلم الهدی که توفیق داشتم از داوری و راهنمایی‌های ایشان بهره ببرم کمال تشکر را دارم.

چکیده:

اخیرا روشی برای پاکسازی محیط توسعه یافته که گیاه پالایی نامیده شده است. روش به عنوان استفاده از گیاهان برای حذف و تخریب ترکیبات خطرناک از محیط تعریف می شود. در فرایند گیاه پالایی، گیاهان در مواجهه با این ترکیبات خطرناک تعدادی آنزیم به داخل خاک و یا آب ها آزاد می نمایند. مطالعات مختلف نشان داده که آنزیم های مشتق شده از گیاهان مورد استفاده در پایلوتهای حذف آلودگیهای نفتی شامل لاکازها، دهالوژنازها، نیترورداکتازها، نیتریلازها و پراکسیدازها هستند . لذا، اندازه گیری نوع و غلظت آنزیم ها در طول زمان اجرای پایلوتهای گیاه‌پالایی به منظور شناسایی میزان نقش آنها در حذف آلودگیهای نفتی از اهمیت ویژه ای برخوردار است. آنزیم ها، پلی پپتیدهایی هستندکه به لحاظ بالا بودن جرم مولکولی ، امکان اندازه گیری آن ها توسط GC و یا GC-MS وجود ندارد. لذا در این تحقیق برای دستیابی به روش اند ازه گیری آنزیم **لاکاز و پراکسیداز** از دستگاه HPLC استفاده شده است . هدف اصلی در این تحقیق، بهینه سازی روش اندازه گیری و استخراج آنزیم‌های لاکاز و پراکسیداز حاصل از گیاه پالایی خاک‌های آلوده به مواد نفتی، به وسیله ی HPLC است. در نهایت شرایط بهینه شده با استفاد ه از دستگاه HPLC عبارت است از : فاز متحرک بافر با ترکیب (بافر فسفات M ۰/۰۵ با pH:۷ + سدیم کلراید (NaCl) ۰/۳ مولار)، سرعت جریان فاز متحرک $mL\ min^{-1}$ ۰/۱۵ ستون CX و دتکتور UV با طول موج ۲۲۰ نانومتر. از سوی دیگر، در مرحله‌ی بهینه‌سازی روش اندازه گیری جذب و استخراج آنزیم لاکاز، دستگاه اسپکتروفوتومتر مورد استفاده قرار گرفت. فعالیت آنزیم که متناسب با جذب است به وسیله ی اکسایش ABTS به عنوان سابستریت لاکاز اندازه‌گیری شد.

فهرست مطالب

فصل یک

۱-۱-مقدمه ۲

۱-۲- گیاه‌پالایی ۳

۱-۲-۱-گیاه‌پالایی در محل(In situ Phytoremediation) ۵

۱-۲-۲-گیاه‌پالایی در بافت زنده(In-vivo phytoremediation) ۵

۱-۲-۳-گیاه‌پالایی در آزمایشگاه (In vitro phytoremediation) ۶

۱-۳- مکانیسم‌های گیاه‌پالایی ۶

۱-۳-۱-انباشتگی گیاهی ۷

۱-۳-۱-۱- گیاه‌پالایی زمین‌های آلوده به فلزات سنگین به وسیله‌ی درختان ۸

۱-۳-۲- مکش گیاهی ۹

۱-۳-۳- تثبیت گیاهی ۹

۱-۳-۴- تبدیل و تغییر شکل گیاهی (دگردیسی گیاهی) ۹

۱-۳-۵- تبخیر گیاهی ۱۱

۱-۳-۶- تجزیه‌ی ریزوسفری ۱۱

۱-۳-۷- استخراج گیاهی ۱۲

۱-۴- زیست‌پالایی هیدروکربن‌های پلی‌آروماتیک (PAHs) با وزن مولکولی بالا به وسیله‌ی باکتری‌ها ۱۲

۱-۴-۱- تجزیه‌ی فلوئورن و تولید متابولیت‌ها و مسیر متابولیکی ۱۳

۱-۴-۲- تجزیه‌ی پیرن و متابولیت‌های تولید شده و مسیر متابولیکی ۱۶

۱-۴-۳- تجزیه پیرن به وسیله باکتری Mycobacterium sp. AP1 ..... ۱۸

۱-۴-۴- تجزیه‌ی فنانترن و متابولیت‌های تولید شده و مسیر متابولیکی ۱۹

۱-۴-۵- متابولیسم benzo[a]pyrene(BaP) ۲۳

۱-۴-۵-۱- تجزیه‌ی BaP توسط باکتری و مسیر متابولیکی ۲۳

۱-۴-۵-۲- تجزیه‌ی BaP توسط قارچ‌ها ۲۴

۱-۴-۵-۳- تجزیه‌ی BaP توسط جلبک‌ها ۲۶

۱-۴-۶- متابولیسم آنتراسن توسط باکتری Rhodococcus ۲۷

۱-۴-۷- متابولیسم فلوئورانتن ۲۸

۱ -۵- مزایای گیاه پالایی در مقایسه با دیگر روش‌ها ۲۹

۱-۶- آنزیم ۲۹

فهرست مطالب

۱-۶-۱- تاریخچه ۳۰
۱-۶-۲- ساختار آنزیم‌ها ۳۱
۱-۶-۳- نامگذاری آنزیم‌ها ۳۱
۱-۶-۴- طرز کار آنزیم‌ها ۳۲
۱-۷- آنزیم لاکاز (laccase) ۳۳
۱-۷-۱- مکانیسم اکسایش توسط آنزیم لاکاز ۳۵
۱-۸- آنزیم پراکسیداز (peroxidase) ۳۷
۱-۸-۱- تاریخچه ۳۸
۱-۸-۲- ساختار و عمل پراکسیداز ۳۹
۱-۸-۲-۱- توصیف آنزیم پراکسیداز ترب کوهی ۴۰
۱-۸-۲-۲- ساختار سه بعدی آنزیم پراکسیداز ۴۱
۱-۸-۲-۳- مکانیسم اکسایش توسط HRP C ۴۲
۱-۹- تجزیه‌ی فنانترن و پیرن در ریزوسفر چمن‌زارها و حبوبات ۴۳

فصل دو

۲-۱- مواد و استانداردها ۴۶
۲-۲- دستگاه‌ها ۴۶
۲-۲-۱- سایر دستگاه‌ها ۴۷
۲-۳- شناسایی آنزیم‌ها در مواد استخراج شده از یشه گیاه یونجه با GC-MS ۴۷
۲-۴- بهینه سازی روش اندازه‌گیری استاندارد آنزیم پراکسیداز و لاکاز با دستگاه HPLC ۴۷
۲-۴-۱- بهینه سازی ستون (C_{18} , cation exchange) برای اندازه‌گیری آنزیم‌ها ۴۷
۲-۴-۲- بهینه سازی آشکارساز (RI, EC, UV) و فاز متحرک ۵۰
۲-۵- رسم منحنی کالیبراسیون آنزیم لاکاز و پراکسیداز ۵۱
۲-۵-۱- رسم منحنی کالیبراسیون آنزیم لاکاز ۵۱
۲-۵-۲- رسم منحنی کالیبراسیون آنزیم پراکسیداز ۵۲
۲-۶- بهینه سازی روش استخراج آنزیم‌ها از خاک ۵۲
۲-۶-۱- تهیه خاک مناسب جهت تزریق آنزیم ۵۲
۲-۶-۲- ساخت محلول‌های استاندارد از دو آنزیم جهت تزریق به خاک ۵۳
۲-۶-۳- بهینه سازی نوع بافر و pH بافر جهت استخراج آنزیم از خاک ۵۳

فهرست مطالب

۲-۶-۴- بهینه‌سازی مدت زمان چرخش سانتریوفوژ در بازدهی استخراج ۵۵

۲-۶-۵- بهینه سازی غلظت بافر و اثر افزودن EDTA ۵۶

۲-۷- بهینه‌سازی روش اندازه‌گیری آنزیم لاکاز با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر(UV)..... ۵۷

۲-۷-۱- بهینه‌سازی مدت زمان واکنش ABTS با آنزیم لاکاز و مقدار ABTS..... ۵۷

۲-۷-۲- رسم منحنی کالیبراسیون جذب برحسب غلظت آنزیم لاکاز..... ۵۸

۲-۷-۳- بررسی دقت و صحت روش..... ۵۸

۲-۸- استخراج آنزیم لاکاز از خاک..... ۵۹

۲-۸-۱- بهینه سازی نوع بافر و pH بافر جهت استخراج آنزیم از خاک ۵۹

۲-۸-۲- بهینه‌سازی مدت زمان چرخش سانتریوفوژ در بازدهی استخراج..... ۶۱

۲-۸-۳- بهینه سازی غلظت بافر و اثر افزودن EDTA..... ۶۱

فصل سه

۳-۱- مقدمه..... ۶۴

۳-۲- نتایج شناسایی آنزیم‌ها در مواد استخراج شده از یشه گیاه یونجه با GC-MS..... ۶۵

۳-۳- نتایج بهینه‌سازی روش اندازه گیری آنزیم لاکاز و پراکسیداز..... ۶۵

۳-۳-۱- بررسی بهینه سازی ستون(C_{18}, cation exchange)..... ۶۵

۳-۳-۲- بررسی بهینه سازی آشکارساز (RI, EC, UV) و فاز متحرک..... ۷۱

۳-۴- نتایج حاصل از رسم منحنی کالیبراسیون ۷۵

۳-۴-۱- نتایج حاصل از رسم منحنی کالیبراسیون آنزیم لاکاز..... ۷۵

۳-۴-۲- نتایج حاصل از رسم منحنی کالیبراسیون آنزیم پراکسیداز ۷۶

۳-۵- نتایج بهینه سازی روش استخراج آنزیم‌ها از خاک ۷۷

۳-۵-۱- نتایج بهینه‌سازی نوع بافر و pH بافر جهت استخراج آنزیم از خاک..... ۷۷

۳-۵-۲- نتایج بهینه‌سازی مدت زمان چرخش سانتریوفوژ در بازدهی استخراج..... ۷۸

۳-۵-۳- نتایج بهینه‌سازی غلظت بافر و اثر افزودن EDTA..... ۷۹

۳-۶- نتایج بهینه‌سازی روش اندازه‌گیری آنزیم لاکاز با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر(UV)..... ۸۱

۳-۶-۱- نتایج بهینه‌سازی مدت زمان واکنش ABTS با آنزیم لاکاز و مقدار ABTS..... ۸۱

۳-۶-۲- نتایج حاصل از رسم منحنی کالیبراسیون آنزیم لاکاز..... ۸۵

۳-۶-۳- نتایج حاصل از دقت و صحت روش..... ۸۶

۳-۷- نتایج استخراج آنزیم لاکاز از خاک ۸۶

۳-۷-۱- نتایج بهینه‌سازی نوع بافر و pH بافر جهت استخراج لاکاز از خاک ۸۷
۳-۷-۲- نتایج بهینه‌سازی مدت زمان چرخش سانتریوفوژ ۸۸
۳-۷-۳- نتایج بهینه‌سازی غلظت بافر و اثر افزودن EDTA در بازدهی استخراج..... ۸۹
۳-۸- نتیجه‌گیری..... ۹۱

اشکال

شکل ۱-۱- تجزیه فلوئورن به وسیله آنزیم مونو اکسیژناز ۱۴
شکل ۱-۲- مکانیسم مونو اکسیژنه شدن فلوئورن ۱۵
شکل ۱-۳- تجزیه پیرن به وسیله آنزیم دی اکسیژناز ۱۷
شکل ۱-۴- تجزیه پیرن و مسیر متابولیکی جدید ۱۸
شکل ۱-۵- تجزیه فنانترن به وسیله آنزیم دی اکسیژناز ۲۰
شکل ۱-۶- تجزیه اسنفتن توسط باکتری ۲۱
شکل ۱-۷- تجزیه نفتالین توسط باکتری ۲۱
شکل ۱-۸- تجزیه بنزن توسط آنزیم دی اکسیژناز ۲۲
شکل ۱-۹- تجزیه BaP توسط باکتری ۲۳
شکل ۱-۱۰- تجزیه BaP توسط قارچ ۲۴
شکل ۱-۱۱- تجزیه BaP توسط آنزیم‌های خارج سلولی لاکاز و پراکسیداز ۲۵
شکل ۱-۱۲- تجزیه BaP توسط جلبک ۲۶
شکل ۱-۱۳- متابولیسم آنتراسن توسط باکتری ۲۷
شکل ۱-۱۴- متابولیسم فلوئورانتن ۲۸
شکل ۱-۱۵- مس T_1, T_2, T_3 در آنزیم لاکاز[۲۶] ۳۴
شکل ۱-۱۶- چرخه‌ی کاتالیتیکی آنزیم لاکاز [۲۶] ۳۵
شکل ۱-۱۷- مکانیسم اکسایش توسط آنزیم لاکاز[۳۵] ۳۶
شکل ۱-۱۸- ساختار هم در آنزیم پراکسیداز ترب کوهی ۴۰
شکل ۱-۱۹- ساختار سه بعدی آنزیم پراکسیداز ۴۱
شکل ۱-۲۰- مکانیسم واکنش آنزیم پراکسیداز ۴۳

شکل ۳-۱- کروماتوگرام حاصل از تزریق $200\ mg\ L^{-1}$ از آنزیم پراکسیداز با شرایط ستون C_{18}، دتکتور UV، فاز متحرک استونیتریل: آب (۸۰: ۲۰، v/v) در دو طول موج ۲۳۰ و ۲۸۰ نانومتر ۶۶
شکل ۳-۲-کروماتوگرام حاصل از تزریق $200\ mg\ L^{-1}$ از آنزیم پراکسیداز با شرایط ستون C_{18}، دتکتور UV، فاز متحرک متانول: آب (۷۵: ۲۵، v/v) در دو طول موج ۲۳۰ و ۲۸۰ نانومتر ۶۷
شکل ۳-۳- کروماتوگرام حاصل از تزریق $200\ mg\ L^{-1}$ از آنزیم پراکسیداز با شرایط ستون C_{18}، دتکتور RI، فاز متحرک متانول: آب (۴۰: ۶۰، v/v) ۶۸

شکل ۳-۴- کروماتوگرام حاصل از تزریق $mg\ L^{-1}$ ۲۰۰ از آنزیم پراکسیداز با شرایط ستون C_{18}، دتکتور RI، فاز متحرک متانول: آب (۲۵: ۷۵، v/v) ، سرعت جریان $mL\ min^{-1}$ ۱ ..... ۶۸

شکل ۳-۵- کروماتوگرام حاصل از تزریق $mg\ L^{-1}$ ۱۰۰ از آنزیم لاکاز با شرایط ستون C_{18}،دتکتور RI، فاز متحرک استونیتریل: آب (۲۵: ۷۵، v/v) ، سرعت جریان $mL\ min^{-1}$ ۱..... ۶۹

شکل ۳-۶- کروماتوگرام مخلوط آنزیم لاکاز و پراکسیداز $mg\ L^{-1}$ ۱۰۰ با ستون CX و دتکتور RI و فاز متحرک متانول: آب (۲۵: ۷۵، v/v) ۷۰

شکل ۳-۷- کروماتوگرام حاصل از تزریق $mg\ L^{-1}$ ۱۰۰ از آنزیم پراکسیداز با شرایط ستون CX، دتکتور EC، فاز متحرک استونیتریل: آب (۲۵: ۷۵، v/v) ۷۱

شکل ۳-۸- کروماتوگرام حاصل از تزریق $mg\ L^{-1}$ ۱۰۰ از آنزیم پراکسیداز با شرایط ستون CX، دتکتور EC، فاز متحرک متانول: آب (۴۰: ۶۰، v/v) ۷۲

شکل۳-۹- کروماتوگرام حاصل از تزریق آنزیم پراکسیداز با شرایط ستون CX، دتکتورEC UV، فاز متحرک استونیتریل: آب (۱۰: ۹۰، v/v) در دو طول موج ۲۳۰ و ۲۸۰ نانومتر ۷۳

شکل۳-۱۰- کروماتوگرام $mg\ L^{-1}$ ۲۵ از آنزیم پراکسیداز با ستون CX، دتکتور UV در طول موج ۲۲۰ نانومتر، فاز متحرک (بافر فسفات M ۰/۰۵ با pH:۷ + سدیم کلراید(NaCl) ۰/۳ مولار)، سرعت جریان فاز متحرک $mL\ min^{-1}$ ۰/۱۵، حجم تزریق µL ۲۰، زمان بازداری ۵/۴ دقیقه ۷۴

شکل ۳-۱۱- کروماتوگرام $mg\ L^{-1}$ ۱۲۵ از آنزیم لاکاز در شرایط بهینه شده. زمان بازداری ۵/۲ دقیقه..... ۷۵

شکل ۳-۱۲- منحنی کالیبراسیون برای آنزیم لاکاز ۷۶

شکل ۳-۱۳- منحنی کالیبراسیون برای آنزیم پراکسیداز..... ۷۶

شکل ۳-۱۴- طیف جذبی mL ۰/۵ محلول ABTS در مدت زمان ۴ دقیقه واکنش با آنزیم لاکاز..... ۸۲

شکل ۳-۱۵- طیف جذبی mL ۰/۱ محلول ABTS در مدت زمان ۵ دقیقه واکنش با آنزیم لاکاز..... ۸۳

شکل ۳-۱۶- طیف جذبی mL ۰/۲ محلول ABTS در مدت زمان ۲ دقیقه واکنش با آنزیم لاکاز..... ۸۴

شکل ۳-۱۷- طیف جذبی mL ۰/۲ محلول ABTS در مدت زمان ۵ دقیقه واکنش با آنزیم لاکاز..... ۸۴

شکل ۳-۱۸- منحنی کالیبراسیون آنزیم لاکاز ۸۵

جداول

جدول ۲-۱- بهینه‌سازی روش اندازه‌گیری آنزیم با HPLC ۴۸
جدول ۲-۲- اندازه‌گیری هم‌زمان آنزیم‌های لاکاز وپراکسیداز ۴۹
جدول ۲-۳- اندازه‌گیری هم‌زمان آنزیم‌های لاکاز وپراکسیداز ۴۹
جدول ۲-۴- بهینه‌سازی آشکارساز و فاز متحرک برای اندازه‌گیری آنزیم‌ها ۵۰
جدول ۲-۵- نوع بافر و pH بافر جهت بهینه سازی استخراج ۵۳
جدول ۲-۶- محتویات هر ویال شامل ۳g خاک، ۱mL آنزیم و ۹mL بافر استخراج کننده با غلظت ۰/۱M ۵۴
جدول ۲-۷- اثر مدت زمان سانتریوفوژ در بازدهی استخراج ۵۵
جدول ۲-۸- محتویات هر ویال شامل ۳g خاک، ۱mL آنزیم و ۹mL بافر استخراج کننده با غلظت ۰/۱M ۶۰
جدول ۲-۹- اثر مدت زمان سانتریوفوژ در بازدهی استخراج آنزیم لاکاز از خاک ۶۱
جدول۲-۱۰- اثر غلظت بافر و افزودن EDTA ۶۲
جدول ۳-۱- نتایج حاصل از بهینه‌سازی نوع بافر و pH بافر جهت استخراج آنزیم لاکاز و پراکسیداز ۷۷
جدول ۳-۲- نتایج بهینه‌سازی مدت زمان چرخش سانتریوفوژ ۷۸
جدول ۳-۳- نتایج بهینه‌سازی غلظت بافرو اثر افزودن اتیلن دی آمین تترامید ۷۹
جدول ۳-۴- نتایج مرحله‌ی اول اندازه‌گیری جذب، با مقدار ۰/۵ mL محلول ABTS ۸۱
جدول ۳-۵- نتایج مرحله‌ی دوم اندازه گیری جذب، با مقدار ۰/۱ mL محلول ABTS ۸۲
جدول ۳-۶- نتایج مرحله‌ی سوم اندازه گیری جذب، با مقدار ۰/۲ mL محلول ABTS ۸۳
جدول ۳-۷- نتایج حاصل از رسم منحنی کالیبراسیون ۸۶
جدول ۳-۸- نتایج بدست آمده از دقت و صحت روش ۸۶
جدول ۳-۹- نتایج حاصل از بهینه‌سازی نوع بافر و pH بافر ۸۸
جدول ۳-۱۰- نتایج حاصل از بهینه‌سازی مدت زمان سانتریوفوژ ۸۹
جدول ۳-۱۱- نتایج حاصل از بهینه‌سازی غلظت بافر و اثر افزودن EDTA ۹۰

مقدمه

۱-۱-مقدمه

به طور افزایشی صنعتی شدن اقتصاد جهانی در سال‌های اخیر منجر به این شده است که مواد شیمیایی ناشی از فعالیتهای صنعتی به محیط رها شود و روز به روز فزونی یابد. در بین این مواد شیمیایی می‌توان به آلوده‌کننده‌های خطرناکی هم‌چون هیدروکربن‌های نفتی (PHC[1])، هیدروکربن‌های پلی آروماتیک (PAHs[2])، هیدروکربن‌های هالوژن‌دار و حشره کش‌ها اشاره نمود. در این ارتباط، تکنولوژی‌های مختلف بیولوژیکی برای کاهش و یا حذف این آلودگی‌ها با استفاده از باکتری‌ها، قارچ‌ها و گیاهان (Phytoremediation) مورد بررسی قرار گرفت. اگرچه استفاده از گیاه برای از بین بردن آلاینده‌ها در سال ۱۹۵۰کشف شد، اما تا سال۱۹۸۰ این موضوع مورد بررسی همه جانبه قرار نگرفت و به عبارت دیگر، توسعه این روش در دهه‌ی اخیرتحقق یافت [۱،۱۹].

[1] petroleum hydrocarbons
2 polycyclic aromatic hydrocarbons

۱-۲- گیاه‌پالایی[1]

گیاه پالایی فناوری است که از گیاه برای تجزیه و یا حذف آلاینده های خاک استفاده می شود. Rhizoremediation یک نوع ویژه از گیاه‌پالایی است که هر دو بخش گیاه و میکروب‌های ریزوسفر در تجزیه و حذف آلودگی نقش مهمی را ایفا می نمایند. بعضی آلاینده‌ها با وزن مولکولی کم می توانند به اعضای گیاه انتقال یابند (که در برخی شرایط، این‌گونه آلاینده ها به لحاظ داشتن فراریت بالا قبل از ورود به پیکره گیاه تبخیر شوند) و بنابر این از خاک حذف می‌شوند و یا ممکن است از بافت گیاه نیز به وسیله تعرق یا تبخیر[2] آزاد و رها می‌شوند. بعضی از ترکیبات غیر فرار می‌توانند توسط واکنش‌های آنزیمی تجزیه و یا تبدیل به ترکیبات غیر سمی شوند. گیاهان، قارچ ها و باکتری ها به کمک آنزیم هایی که ترشح می‌کنند می‌توانند آلاینده‌ها را تجزیه کنند [۲۰]. این آنزیم‌ها شامل **پراکسیداز**[3]، دی‌اکسیژناز[4]، فسفاتاز[5]، **لاکاز**[6]، نیتریلاز[7]، نیترورداکتاز[8]، دهالوژناز[9] و مونو اکسیژناز [10] هستند [۱-۳]. آلودگی خاک، مشکل محیطی بسیار مهمی است که توجه عموم را در دهه‌ی اخیر به خود جلب کرده است. متأسفانه هزینه‌های بالا برای حذف آلاینده ها از خاک به وسیله روش‌های شیمیایی و فیزیکی، شرکت‌ها و کارخانه‌ها را بر این می‌دارد که از این مشکل چشم‌پوشی کنند.

[1] Phytoremediation
[2] Phytovolatization
[3] **peroxidase**
[4] dioxygenase
[5] Phosphatase
[6] **laccase**
[7] nitrilase
[8] nitroreductase
[9] dehalogenase
[10] P450 mono-oxygenase

با این وجود در سال‌های اخیر، محققان شروع به تحقیق اثر گیاه‌پالایی در رفتار با هیدروکربن‌های چند حلقه‌ای (PAHs) کردند. بعضی از ترکیبات آلی از جمله اسیدهای آلی، الکل‌ها، پروتئین‌ها و ترکیبات فنولی که در تراوشات ریشه وجود دارند، می‌توانند به عنوان منابع نیتروژن و کربن برای رشد و بقای طولانی مدت میکروارگانیسم‌هایی به کارگرفته شوند که قادرند آلاینده های آلی را تجزیه کنند. ترکیبات شیمیایی تراوشات ریشه و سرعت تراوش، به طور قابل توجهی در میان گونه‌های گیاهی متفاوت است. این موضوع بعضی از گروه‌های تحقیقاتی را به سمت غربال گونه‌هایی هدایت می‌کند که ترکیبات فنولی را ترشح می‌کنند. این ترکیبات قادرند باکتری‌های تجزیه‌کننده‌ی PCB[1] را حمایت کنند [۲].

هج[2] و فلچر[3] در سال ۱۹۹۵ توانستند هفده گیاه مختلف را جدا کنند که قادرند ترکیبات فنولی را تراوش کنند. این دو محقق دریافتند که توت سفید[4] خواص زیادی دارد که استفاده از آن در گیاه‌پالایی مفید است [۲]. تعدادی گونه‌های مختلف گیاهی در تجزیه‌ی مولکول‌های آلی در ریزوسفر مؤثرند. این گیاهان ریشه‌های پهناوری دارند که منطقه‌ی ریزوسفر وسیعی را تشکیل می‌دهند. این گیاهان شامل ذرت[5] ، گندم[6] ، سویا[7] ، نخود[8] و لوبیا [9] هستند [۱۸].

[1] Polychlorinated biphenyls
2 Hedge
3 Fletcher
4 Mulberry
5 corn
6 wheat
7 soybean
8 peas
9 beans

روش‌های در محل[1] ، در بافت زنده[2] و در آزمایشگاه[3] توسط گیاه برای پالایش آلوده‌کننده‌ها به کار گرفته می‌شوند:

۱-۲-۱-گیاه‌پالایی در محل(In situ Phytoremediation)

روش گیاه پالایی در محل، شامل قرار دادن گیاه زنده در سطح آب و خاک یا رسوبات آلوده است، به طوری که گیاه‌پالایی تنها شامل جذب کردن[4] و انباشتگی[5] در مقابل تغییرشکل یا دگردیسی[6] آلوده‌کننده‌ها باشد. بعد از پالایش برای به‌دست آوردن بازده، گیاه از محل درو می‌شود. در این روش آلوده‌کننده‌ها باید به طور فیزیکی نزدیک ریشه باشند. این روش گیاه‌پالایی، پر خرج است.

۱-۲-۲-گیاه‌پالایی در بافت زنده (In-vivo phytoremediation)

در مناطقی که آلوده‌کننده‌ها در دسترس گیاه نیستند، مانند آلوده‌کننده‌ها در عمق سفره‌های زیرزمینی، از روش(in-vivo) استفاده می‌شود. در این روش آلاینده‌ها به وسیله‌ی یک روش مکانیکی استخراج می‌شوند. سپس به مناطقی منتقل می‌شوند که در معرض گیاهان انتخاب شده قرار بگیرند. این روش گرانتر از روش اول است.

[1] In situ
[2] In-vivo
[3] In-vitro
4 uptake
5 accumulation
6 transformation

۱-۲-۳-گیاه‌پالایی در آزمایشگاه (In vitro phytoremediation)

در دو روش قبلی از گیاهان زنده برای گیاه‌پالایی استفاده شد. در روش(in vitro) از آنزیم‌های استخراج شده از گیاه استفاده می‌شود [۳].

۱-۳- مکانیسم‌های گیاه‌پالایی

گیاه پالایی مواد آلی خاک یا آلوده‌کننده‌ها در دو قسمت جدا اتفاق می‌افتد، در قسمت ریشه و ساقه‌ی جوان گیاه و در ریزوسفر که شامل خاک و محیط اطراف ریشه است.

مکانیسم تغییر شکل و حذف آلوده‌کننده‌ها در ریشه و ساقه‌ی جوان شامل جذب به داخل ریشه، انتقال از ریشه به قسمت ساقه‌ی جوان، انباشتگی در ریشه و ساقه، تغییرشکل شیمیایی در سلول‌های گیاه و تبخیر از بافت گیاه است.

در ریزوسفر آلوده‌کننده‌ها توسط دو مکانیسم حذف می‌شوند: تغییر شکل شیمیایی بوسیله‌ی آنزیم‌های اکسید کننده که از ریشه‌ی گیاه تراوش می‌شوند و تغییر شکل زیستی به وسیله‌ی میکروارگانیسم‌های ریزوسفر [۲۲].

چند فاکتور مؤثر در جذب و پخش مواد شیمیایی در گیاهان وجود دارد که شامل موارد ذیل می‌باشد:

۱- خواص فیزیکی و شیمیایی ترکیبات مانند: حلالیت در آب، فشار بخار، جرم مولکولی و k_{ow}

۲- خصوصیات محیطی مانند: دما، pH، مواد آلی، میزان رطوبت خاک و مواد مغذی خاک (کودهای شیمیایی)

۳- خصوصیات گیاه مانند نوع سیستم ریشه و نوع آنزیم‌ها [۳].

گیاهان توسط تعداد متعددی مکانیسم می‌توانند مناطق آلوده را پالایش کنند. آلوده‌کننده‌های معدنی نمی‌توانند تجزیه شوند. این آلاینده‌ها یا باید در خاک پایدار شوند تا کمتر در دسترس قرار بگیرند که به این روش تثبیت شدن گیاهی می‌گویند، یا استخراج و انتقال یابند و در بافت گیاه انباشته شوند که به این روش استخراج گیاهی می‌گویند و یا به فرم بخار تغییرشکل پیدا کنند که تبخیر گیاهی می‌گویند که هر کدام به صورت جداگانه معرفی خواهند شد [۲۱].

۱-۳-۱-انباشتگی گیاهی[1]

انباشتگی در گیاه زمانی اتفاق می‌افتد که آلوده‌کننده‌هایی که به وسیله‌ی گیاه جذب شدند به طور کامل تجزیه نشوند. گیاهان ویژه‌ای، فلزاتی مانند نیکل، روی، مس و کروم را به‌طور قابل توجهی انباشته (Hyperaccumulation) می‌کنند. فوق‌انباشتگی فلزات سنگین، به عنوان انباشتگی بیشتر از ۰/۱ درصد به وسیله‌ی بافت گیاه تعریف می‌شود [۳،۴]. تاکنون بیشتر از ۴۰۰ گونه‌ی گیاهی گزارش شده‌اند که فلزات را فوق انباشته می‌کنند و تعداد قابل توجهی گونه‌ی گیاهی، توانایی انباشتگی دو یا چند عنصر را نشان داده‌اند. در حالی که بیشتر این گونه‌های گیاهی به داشتن توان انباشتگی نیکل، بعضی به قدرت انباشتگی کبالت، مس و روی و تعداد کمی از گونه‌ها به قدرت انباشتگی منگنز و کادمیوم گزارش شده‌اند [۱۰].

[1] phytoaccumulation

۱-۳-۱-۱- گیاه‌پالایی زمین‌های آلوده به فلزات سنگین به وسیله‌ی درختان

درختان در توانایی شان برای انتقال فلزات سنگین از ریشه به ساقه متفاوتند. مرین[1] در سال ۱۹۸۱ بافت‌های ریشه‌ی چندین گونه‌ی درختی را آزمایش کرد که در لجن‌های آلوده رشد کرده بودند. او دریافت که فلزات نیکل، کادمیوم، مس و روی بالاترین غلظت را در ریشه دارند. تورنر[2] و دکینسون[3] در سال ۱۹۹۳ دریافتند که درختان انجیری که در خاک‌های آلوده رشد کردند، بیشترین مقدار سرب، از ریشه به ساقه منتقل شده، درحالی‌که بیشترین مقدار روی از ریشه به برگ‌ها انتقال یافته است. Mcgregor و ... در سال ۱۹۹۶ بافت درختان بید[4] ، فان[5] و انجیر[6] را که به طور طبیعی در مناطق آلوده‌شده با پساب کارخانجات مواد منفجره رشد کرده بودند را آنالیز کردند. سرب و مس در ریشه‌ی درختان انباشته شده بود و روی بالاترین غلظت را در برگ‌ها داشت. تعداد زیادی از مطالعات نشان داد انباشتگی در بافت‌هایی اتفاق می‌افتد که در حال رشد هستند، مانند ساقه‌ها و بافت‌های جوان. فلزات سنگین، خصوصیات رفتاری متفاوتی از نظر حرکت در داخل درخت دارند. سرب، کروم و مس به طور عمده تمایل دارند در ریشه ثابت شوند. در حالی که کادمیوم، نیکل و روی به آسانی به بافت‌های هوایی منتقل می‌شوند. فلزات سنگین در غلظت‌های بالا سبب ایجاد مشکلات می‌شوند. برای مثال، ثابت کردن فلز کروم در ریشه می‌تواند یک روش اقتصادی برای محدود کردن سمیت کروم باشد. هم‌چنین جذب کادمیوم در قسمت‌های دروشدنی درختان، یک روش مناسب برای پاکسازی خاک‌های آلوده است [۲۳،۴] .

1 Morin
2Turner
3 Dickinson
4 Willow
5 birch
6 sycamore