دانشکده کشاورزی

پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد رشته‌ی مهندسی کشاورزی گرایش بیوتکنولوژی در کشاورزی

تعیین نقش ژن دفنزین بیان شده در سیستم گیاهی جهت جذب فلز روی

استادان راهنما:

دکتر ندا میرآخورلی

دکتر بهناز صفار

استاد مشاور:

دکتر کریم مهنام

پژوهشگر:

سمیراء فروزنده هفشجانی

مهر ماه۱۳۹۲

دانشکده کشاورزی

گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی

پایان‌نامه خانم سمیرا فروزنده هفشجانی جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد رشته کشاورزی گرایش بیوتکنولوژی در کشاورزی با عنوان: تعیین نقش ژن دفنزین بیان شده در سیستم گیاهی جهت جذب فلز روی در تاریخ ۱۳۹۲/۷/۲۱ با حضور هیأت داوران زیر بررسی و با نمره ۱۹/۶ مورد تصویب نهایی قرار گرفت.

۱. **استادان راهنمای پایان نامه:**

دکتر ندا میرآخورلی (استادیار) .....

دکتر بهناز صفار (استادیار) .....

۲. **استاد مشاور پایان نامه:**

دکتر کریم مهنام (استادیار) .....

۳. **استادان داور پایان نامه:**

دکتر سعداله هوشمند (دانشیار) .....

دکتر محمد ربیعی (استادیار) .....

دکتر حسن طباطبائی

معاون پژوهشی و تحصیلات تکمیلی

دانشکده کشاورزی

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات و نوآوری های ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه متعلق به دانشگاه شهرکرد است.

چکیده

فلزات‌سنگین یکی از آلاینده‌های پایدار و غیرقابل تجزیه بیولوژیکی هستند که می‌توانند همراه پساب تصفیه‌شده یا فاضلاب صنایع مختلف به محیط‌زیست وارد شوند. از جمله راه‌های معمول تصفیه و حذف فلزات‌سنگین از پساب، روش رسوب‌دهی شیمیایی است که این روش به دلیل داشتن هزینه بالا و تولید لجن‌شیمیایی مسئله‌ساز می‌باشد. از این‌رو روش حذف‌بیولوژیکی به‌عنوان گزینه‌ای اقتصادی سازگار با محیط‌زیست، مورد توجه قرارگرفته‌است. موجودات عالی مانند گیاهان و حیوانات عموماً بوسیله تولید پپتیدهای غنی از سیستئین مانند متالوتیونین‌ها، فیتوکلاتین‌ها و دفنزین‌ها و اتصال آن‌ها به یون‌های فلزی به حضور فلزات‌سنگین پاسخ می‌دهند. این پپتیدهای کوچک متصل‌شونده به فلزات دارای توالی غنی از سیستئین می‌باشند که به عنوان جاذب مواد عمل می‌کنند. از جمله این پپتیدها دفنزین‌های گیاهی هستند که خانواده بزرگی از پپتیدهای کاتیونی با توده‌های مولکولی کوچک و کروی با وزنی بین ۷kD– ۵ با ۵۴– ۴۵ آمینواسید هستند و دارای الگویی از هشت سیستئین می‌باشند. در این تحقیق از لحاظ نظری و تجربی نقش پروتئین‌نوترکیب دفنزین تولید شده با روش اگروباینفیلتریشن در سیستم یوکاریوتی گیاهی در جذب فلزسنگین روی هم‌چنین شرایط بهینه‌ی جذب فلز روی توسط این پروتیین بررسی شد. که طی بررسی شبیه‌سازی دینامیک مولکولی پروتئین نوترکیب در حالت غیر احیاء و حتی احیاء شده در pH= ۷ قادر به جذب فلز روی نمی‌باشد، که این امر در مطالعات عملی نیز مورد تأیید قرار گرفت، اما قادر به جذب فلز کامیوم در هر دو حالت می‌باشد. در مطالعه عملی جهت بررسی نقش پروتئین‌نوترکیب دفنزین تولید شده، پلاسمید حامل ژن هیبرید از طریق تکنیک اگروباینفیلتریشن، تحت کنترل عناصر رونویسی متفاوت و در تیمارهای برگ سالم و برگ خراش داده شده و برگ اولیه (مسن) و برگ ثانویه (جوان) به داخل برگ‌های گیاه لوبیا انتقال داده شد. بعد از چهار روز پروتئین تولید شده در برگ استخراج و اندازه‌گیری گردید و نتایج به کمک نرم افزار SPSS و SAS تجزیه و تحلیل گردیدند. بهترین بیان در برگ خراش دیده جوان برای پلاسمید ۲ به علت مناسب بودن بافت برای اگروباینفیلتریشن و تحریک تولید فنول‌های محرک ژن‌های افزایش دهنده بیان در اثر زخم مشاهده شد. پروتئین های حاصل جهت بررسی تأثیر عوامل مختلف مانند pH، غلظت پروتئین، زمان و دمای جذب بر میزان جذب فلز روی توسط پروتئین مورد مطالعه تجربی قرار گرفتند. آنالیز داده‌های به‌دست‌آمده با نرم‌افزار SAS تجزیه و مقایسه میانگین‌ها با آزمون LSD در سطح ۱٪ معنی‌دار بودن تیمار ها را نشان داد. بدین ترتیب بهترین میزان جذب روی به همراه پروتئینی با غلظت ۳۵ میکروگرم اتفاق می‌افتد که در محیطی با pH= ۶ ، و دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵۰ دقیقه انکوبه شود. در این تحقیق پروتئین نوترکیب دفنزین در حات طبیعی به عنوان یک جاذب فلز روی شناخته نشد، ولی می‌تواند تحمل گیاه را نسبت به فلز روی بالا می‌برد، از این‌رو تولید گیاه متحمل روی جهت کشت در مناطق آلوده می‌باشد.

کلمات کلیدی: اگروباینفیلتریشن، پروتئین دفنزین، حذف بیولوژیکی، فلزات سنگین

فهرست مطالب

عنوان شماره صفحه

فصل اول- مقدمه ۷

فصل دوم- بررسی منابع ۱۲

۲-۱- فلزات سنگین ۱۲

۲-۱-۱- منابع تولید کننده فلزات‌سنگین ۱۴

۲-۱-۲- اثرات زیست محیطی فلزات سنگین ۱۴

۲-۲-انواع روش‌های زیستی برای حذف فلزات‌سنگین ۱۴

۲-۲-۱- تبدیل‌زیستی ۱۵

۲-۲-۲- رسوب‌دهی زیستی ۱۵

۲-۲-۳- جذب‌زیستی ۱۵

۲-۳- انواع جاذب‌های زیستی ۱۶

۲-۳-۱- گیاهان ۱۶

۲-۳-۱-۱- واکنش‌های‌گیاهی نسبت به فلزات‌سنگین ۱۷

۲-۳-۱-۲- تنش فلزات‌سنگین: واکنش‌های مستقیم ۱۷

۲-۳-۱-۳- واکنش‌های غیرمستقیم ناشی از تنش فلزات‌سنگین در گیاهان ۱۸

۲-۳-۱-۴- مکانیسم‌های تعادل سلولی، تحمل و سم‌زدایی از یون‌های فلزی در گیاهان تحت تنش ۱۹

۲-۳-۱-۴-۱- ناقلین‌فلزی ۱۹

۲-۳-۱-۴-۲- کلات‌سازها و سم‌زدایی از یون‌های فلزی ۲۰

۲-۳-۲- جلبک‌ها ۲۱

۲-۳-۳- قارچ‌ها ۲۱

۲-۳-۴- باکتری‌ها ۲۱

۲-۳-۵- پروتئین‌های متصل‌شونده به فلزات ۲۲

۲-۳-۵-۱- متالوتیونین‌ها ۲۳

۲-۳-۵-۲- فیتوکلاتین‌ها ۲۳

۲-۳-۵-۳- دفنزین‌ها ۲۳

۲-۴- دفنزین‌گیاهی ۲۳

۲-۴-۱- خانواده‌های بزرگ چند ژنی دفنزین ۲۴

۲-۴-۲- ساختاردفنزین ۲۵

۲-۴-۳- گروه‌بندی دفنزین‌های‌گیاهی ۲۷

۲-۴-۴- فعالیت‌های بیولوژیکی دفنزین‌های گیاهی ۲۷

۲-۵- انتخاب گونه گیاهی، سیستم و استراتژی بیان ژ ۲۹

۲-۵-۱- سیستم‌های انتقال ژن ۲۹

۲-۵-۲- روش‌های وارد کردن حامل‌ها به داخل میزبان ۲۹

۲-۵-۲-۱- اگروباکتریوم ۳۰

۲-۶- پیشگویی ساختمان پروتئین ۳۲

۲-۶-۱- اهمیت تعیین ساختار سه بعدی پروتئین ۳۳

فهرست مطالب

عنوان شماره صفحه

۲-۶-۲- روش‌های تعیین ساختمان سه بعدی پروتئین ۳۳
۲-۶-۲-۱- روش‌های آزمایشگاهی ۳۳
۲-۶-۲-۲- روش‌های نظری ۳۴
۲-۷- شبیه‌سازی دینامیک‌مولکولی ۳۴
۲-۷-۱- مدل‌سازی مولکولی ۳۵
۲-۷-۲- شبیه‌سازی ۳۵
۲-۷-۳- مکانیک‌مولکولی ۳۶
۲-۷-۴- دینامیک‌مولکولی ۳۶
۲-۷-۵- شروع و اجرای شبیه‌سازی‌های دینامیک‌مولکولی ۳۸
۲-۷-۶- کاربردهای شبیه‌سازی دینامیک‌مولکولی ۳۸
۲-۸- اجمالی بر مطالعات انجام‌شده بر روی جذب فلزات‌سنگین ۳۹
فصل سوم- مواد و روش‌ها ۴۲
۳-۱- کشت گیاه ۴۲
۳-۲- باکتری‌های مورد استفاده ۴۲
۳-۳- ساختار ترکیبات پلاسمیدی ۴۴
۳- ۴- تکثیر پلاسمید ۴۴
۳-۴-۱- محیط کشت باکتری E.coli ۴۵
۳ -۴-۲- تهیه سلول مستعد (Competent cell) باکتری *E.coli* سویه DH 5α ۴۵
۳-۴-۳- ترانسفورماسیون باکتری*E.coli* ۴۶
۳-۴-۴- تایید کلونی‌های نوترکیب به روشPCR ۴۷
۳-۴-۵-استخراج پلاسمید ۴۸
۳-۴-۶- ارزیابی کمی پلاسمید استخراج شده ۵۰
۳-۴-۷- ارزیابی کیفی پلاسمید استخراج شده ۵۰
۳-۴-۸-محیط کشت باکتری*A. tumefaciens* ۵۰
۳-۴-۹ - تهیه سلول مستعد برای باکتری*A. tumefaciens* ۵۱
۳-۴-۱۰- ترانسفورماسیون باکتری *A. tumefaciens* ۵۲
۳-۴-۱۱- تأیید کلونی‌های نوترکیب به روشPCR ۵۳
۳- ۵- اگروواینفیلتریشن ۵۳
۴-۵- سوسپانسیون اگروباکتریوم ۵۳
۳- ۵- ۲- تزریق سوسپانسیون اگروباکتریوم به برگ ۵۴
۳ – ۶- بررسی پروتئین تولید شده ۵۵
۳- ۶-۱- استخراج پروتئین از برگ ۵۵
۳- ۶-۲- ارزیابی کمی پروتئین ها ۵۵
۳-۷- تجزیه و تحلیل آماری ۵۶
۳-۸- آماده‌کردن تیمار جهت اندازه‌گیری جذب در حالت پروتئین احیاءشده و غیر احیاء ۵۶

فهرست مطالب

عنوان شماره صفحه

-۸-۱- آماده کردن تیمار پروتئین‌ها جهت اندازه‌گیری جذب ۵۶
۳-۸-۲- آماده کردن تیمار pH جهت اندازه گیری جذب در حالت احیاء ۵۷
۳-۸-۳- آماده کردن تیمار زمان‌های مختلف جهت اندازه‌گیری جذب در حالت‌احیاء ۵۷
۳-۸-۴- آماده کردن تیمار دماهای مختلف جهت اندازه گیری جذب در حالت احیاء ۵۸
۳-۸-۵- آماده کردن تیمار پروتئین‌ها جهت اندازه گیری جذب در حالت احیاء ۵۹
۳-۸-۶- سنجش بادستگاه جذب اتمی (Atomic absorption) ۵۹
۳-۹- تجزیه و تحلیل آماری ۵۹
۳-۱۰- مدل‌سازی پروتئین *sd-mod* ۵۹
۳-۱۱- شبیه‌سازی دینامیک مولکولی ۶۰
فصل چهارم- نتایج و بحث ۶۱
۴-۱- شبیه‌سازی دینامیک مولکولی ساختار سه بعدی ژنSdmod ۶۱
۴-۲- شبیه‌سازی دینامیک مولکولی در حضور سدیم و کلر(فاز ۱) ۶۲
۴-۲- شبیه‌سازی دینامیک مولکولی در حضور روی و کلر(فاز۲) ۶۴
۴-۳- ترانسفورماسیون ۶۷
۴-۴- تأیید کلونی‌های نوترکیب به روش.PCR ۶۷
۴-۵- کیفیت و کمیت پلاسمید استخراج شده ۶۸
۴-۷- کمیت پروتئین فعال ۷۰
۴-۸- ارزیابی کارایی بیان‌موقت ۷۴
۴-۹- جذب فلز ۷۶
۴-۹-۱- بررسی تأثیر عامل pH محلول بافر فسفات ۷۷
۴-۹-۲- بررسی تأثیر عامل دما بر جذب ۷۹
۴-۹-۳- بررسی تأثیر عامل زمان بر جذب ۸۰
۴-۹-۴- بررسی تأثیر عامل غلظت پروتئین‌دفنزین بر جذب ۸۲
۴-۹-۵- بررسی تأثیر عامل غلظت پروتئین‌دفنزین بر جذب فلز کادمیوم حالت‌احیاء و غیراحیاء ۸۴
نتیجه‌گیری کلی ۸۶
پیشنهادات ۸۷
منابع ۹۴

فهرست پیوست‌ها

عنوان شماره صفحه

پیوست۱..... ۸۸
۱-۱- محلولهای مورد نیاز در کار با باکتری..... ۸۸
۱-۲- محلولها و بافرهای مورد استفاده در استخراج پلاسمید..... ۸۸
۱-۳- روش تهیه برخی از محلول‌های مورد نیاز در اندازه‌گیری مقدار پروتئین..... ۸۹
۱-۴- تهیه محلول‌ها و مواد مورد نیاز جهت الکتروفورز فرآورده‌هایPCR ۹۰
۱-۵- تهیه محلول‌های مورد نیاز جهت اندازه‌گیری جذب..... ۹۰
پیوست۲..... ۹۱
نقشه ژنتیکی پلاسمید..... ۹۱
پیوست۳..... ۹۲
۳-۱- تهیه استاندارد DNS..... ۹۲
۳-۲- معرفی تیمارهای پلاسمید، خراش و سن..... ۹۳

فهرست جداول

عنوان شماره صفحه

جدول ۲-۱: اثرات اصلی فلزات‌سنگین در گیاهان ۱۹
جدول۲-۲: ناقلین یون‌های فلزی در گیاهان ۲۰
جدول۳-۱: اجزاء واکنش PCR Colony ۴۷
جدول ۳-۲: مراحل واکنش PCR Colony ۴۸
جدول۳ -۳: مواد مورد نیاز برای تهیه Induction medium ۵۴
جدول ۴-۱- تغییرات خواص در ۵۰ نانو ثانیه آخر شبیه سازی در حضور سدیم ۶۲
جدول ۴-۲- تغییرات خواص در ۵۰ نانو ثانیه آخر در حضور روی(فاز۲) و کادمیوم (فاز۳) ۶۵
جدول ۴-۳: جدول تجزیه واریانس‌میزان پروتئین فعال محلول در برگ (میلی‌گرم در میلی‌لیتر) ۷۱
جدول ۴-۴: مقایسه میانگین مربوط به میزان پروتئین فعال محلول در برگ (میلی‌گرم در میلی‌لیتر) ۷۲
جدول ۴-۵: جدول تجزیه واریانس‌میزان پروتئین فعال محلول در برگ (میلی‌گرم در میلی‌لیتر) ۷۴
جدول ۴-۶: جدول تجزیه واریانس‌میزان پروتئین فعال محلول در برگ (میلی‌گرم در میلی‌لیتر) ۷۶
جدول۴-۷- تجزیه واریانس تأثیر۸ تیمار pH محلول بافر فسفات بر جذب فلز روی ۷۸
جدول۴-۸- تجزیه واریانس تأثیر ۶تیمار دمایی بر جذب فلز روی ۷۹
جدول۴-۹- تجزیه واریانس تأثیر ۷تیمار زمانی بر جذب فلز روی ۸۱
جدول۴-۱۰- تجزیه واریانس تأثیر ۶تیمار غلظت پروتئین دفنزین بر جذب فلز روی ۸۳
جدول۴-۱۱- تجزیه واریانس تأثیر ۶ تیمار غلظت پروتئین دفنزین بر جذب فلز کادمیوم ۸۴

فهرست اشکال

عنوان شماره صفحه

شکل ۲-۱- ساختمان سه بعدی برخی از دفنزین‌های گیاهی ۲۶
شکل۳-۱: شکل شماتیک ناحیه T-DNA در سه ترکیب پلاسمیدی ۴۴
شکل ۴-۱: ساختار سه بعدی پروتئین دفنزین در حضور سدیم ۶۲
شکل ۴-۲: تغییرات جذر میانگین مربعات (RMSD) اسکلت اصلی پروتئین ۶۳
شکل ۴-۳: تغییرات حداقل فاصله کلر از پروتئین ۶۳
شکل ۴-۴: تغییرات تابع توزیع شعاعی (RDF) فلز سدیم ۶۴
شکل ۴-۵: تغییرات تابع توزیع شعاعی (RDF) فلز کلر ۶۴
شکل ۴-۶: تغییرات تابع توزیع شعاعی (RDF) فلز روی ۶۵
شکل ۴-۷: تغییرات حداقل فاصله فلز روی از پروتئین ۶۶
شکل ۴-۸: تغییرات حداقل فاصله فلز کادمیوم از پروتئین ۶۶
شکل ۴-۹: تأیید کلونی‌های نوترکیب در باکتریE.coli ۶۸
شکل۴- ۱۰: ژل مربوط به ترکیبات پلاسمیدی استخراج‌شده ۶۸
شکل ۴-۱۱: تزریق سوسپانسیون اگروباکتریوم به پشت برگ گیاه لوبیا ۷۰
شکل۴-۱۲ : برگ علامتگذاری شده چهار روز پس از تزریق ۷۰
شکل ۴-۱۳: نمودار مقایسه میانگین میزان پروتئین ۷۲
شکل۴-۱۴: نمودار مقایسه میانگین میزان پروتئین فعال در برگ پایین ۷۵
شکل۴-۱۵: نمودار مقایسه میانگین میزان پروتئین فعال در برگ سالم ۷۶
شکل ۴-۱۶: مقایسه میانگین جذب فلز روی تحت تیمار pH ۷۸
شکل ۴-۱۷: مقایسه میانگین جذب فلز روی تحت تیمار دمایی ۷۹
شکل ۴-۱۸: مقایسه میانگین جذب فلز روی تحت تیمار زمان ۸۲
شکل ۴-۱۹: مقایسه میانگین جذب فلز روی تحت تیمار غلظت پروتئین دفنزین ۸۳
شکل ۴-۲۰: مقایسه میانگین جذب فلز کادمیوم تحت تیمار غلظت پروتئین دفنزین ۸۴
شکل۴-۲۱: تأثیر غلظت‌پروتئین دفنزین بر جذب فلزکادمیوم در دو حالت احیاء و غیراحیاء ۸۵

فصل اول

مقدمه

واژه‌ی فلزات‌سنگین، به فلزها و شبه‌فلزهایی که دارای چگالی بیش از ۵ گرم بر سانتی‌مترمکعب هستند، اطلاق می‌شود (آدریانو، ۲۰۰۱). سرب، روی، مس، کادمیوم، نیکل و آرسنیک، از جمله‌ی این فلزات می‌باشند. فلزات‌سنگین، از جمله آلاینده‌های زیست محیطی هستند که در تمام نقاط جوامع صنعتی یافت می‌شوند (مک‌الدونی و همکاران، ۱۹۹۳). منشأ فلزات سنگین آلوده‌کننده‌ی خاک شامل استخراج و ذوب سنگ‌های معدنی فلزدار، صنایع ریخته‌گری، لجن و رسوبات باطری اتومبیل، تمرین‌های نظامی، مناطق دفن و انباشت زباله‌ها و فاضلاب‌ها، کودهای کشاورزی و صنایع الکترونیکی می‌باشد (آلووی، ۱۹۹۵). سمیت فلزات‌سنگین و تجمع آن‌ها در زنجیره‌های غذایی یکی از اصلی‌ترین معضلات زیست محیطی و بهداشتی جوامع مدرن امروزی است (آدریانو، ۲۰۰۱). گیاهان به برخی از فلزات‌سنگین در غلظت‌های بسیار پایین نیاز دارند، اما زمانی‌که غلظت این فلزات از حد نیاز گیاه بالاتر می‌رود، منجر به بروز اختلالات متابولیکی و بازدارندگی رشد اغلب گونه‌های گیاهی می‌گردد (فرناندز و هنریکوئز، ۱۹۹۱). فلزات سنگینی مانند مس و روی، برای رشد و نمو طبیعی گیاه لازم و ضروری هستند، چراکه این فلزات جزئی از بسیاری آنزیم‌ها و پروتئین‌ها را تشکیل می‌دهند (شاه و دبی، ۱۹۹۸). بعنوان مثال، فلز روی جزء سازنده‌ی بسیاری از آنزیم‌ها شامل دهیدروژناز، پروتئیناز و پپتیداز است و در متابولیسم کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها، فسفات‌ها و اکسین‌ها و همین‌طور تشکیل ریبوزوم و RNA در گیاهان مشارکت دارد. مس در تعدادی از فرآیندهای فیزیولوژیکی گیاه شامل فتوسنتز، تنفس، توزیع کربوهیدرات‌ها، متابولسیم نیتروژن و دیواره‌ی سلولی و تولید دانه، که در مقاومت گیاه نسبت به بیماری‌ها نقش دارند، سهیم است (کاباتا-پندیاس و پندیاس، ۲۰۰۱). به هرحال، زمانی‌که این فلزات با غلظت‌های بالا در خاک موجود باشند، اثرات مخربی را بر روی سلول‌ها ایجاد خواهند نمود (بیکر و والکر،

۱۹۸۹). در گونه‌های گیاهی غیرمقاوم، فلزات‌سنگین، طیف وسیعی از فعالیت‌های سلولی گیاه شامل فتوسنتز، تنفس، تغذیه‌ی معدنی، صفات و ساختمان غشای سلولی و بیان ژن را، تحت تأثیر قرار می‌دهند (ماکسیمیک، ۱۹۹۷). کادمیوم و سرب در هیچ یک از فرآیندهای بیولوژیکی شناخته شده، نقشی بر عهده ندارند، بنابراین ممکن است که تجمع این فلزات در بدن موجودات زنده کاملاً سمی و کشنده باشد (پنگ و همکاران، ۲۰۰۶). کادمیوم (Cd^{+2}) یکی از خطرناک‌ترین آلاینده‌های خاک است، که مانع از رشد ریشه و اندام‌های هوایی گیاه شده، عملکرد محصول را به شدت کاهش داده، جذب عناصر غذایی و تعادل زیستی (Homeostasis) گیاه را تحت تأثیر قرار داده و غالباً به‌واسطه‌ی تجمع در محصولات زراعی مهم و متعاقباً ورود به زنجیره‌های غذایی، معضلات بسیار جدی را برای سلامت و بهداشت انسان‌ها، ایجاد می‌کند (دی‌تاپی و گابریلی، ۱۹۹۹). کادمیوم در کلیه‌ها تجمع یافته و در ایجاد تعدادی از بیماری‌های کلیوی نقش دارد (سازمان بهداشت جهانی، ۱۹۹۷). استفاده از لجن فاضلاب، زباله‌های شهری و کودهای شیمیایی حاوی کادمیوم (مانند کودهای فسفره)، باعث افزایش غلظت کادمیوم در خاک می‌شود (ویلیامز و دیوید، ۱۹۷۳). سرب (Pb^{+2})، یکی دیگر از فلزات‌سنگین است که دارای کارکرد زیستی مشخصی نمی‌باشد و از پتانسیل ایجاد مسمومیت برای گیاهان و سایر موجودات زنده، برخوردار است. این فلز، به‌دلیل پراکنش گسترده در مناطق شهری و صنعتی و خطر بالقوه‌ی آن برای محیط زیست و سلامت انسان‌ها و حیوانات، منشأ نگرانی‌های متعددی گردیده است. سرب، نه تنها فعالیت میکروارگانیسم‌های خاک را تحت تأثیر قرار داده و سبب از دست رفتن حاصلخیزی خاک می‌شود، بلکه باعث بروز تغییر در شاخص‌های فیزیولوژیکی رشد گیاهان و در نهایت کاهش عملکرد آن‌ها نیز، می‌گردد (ماجر و همکاران، ۲۰۰۲). این فلز به‌واسطه‌ی ورود به زنجیره‌های غذایی، در بدن انسان‌ها و حیوانات تجمع می‌یابد و سلامتی آن‌ها را به مخاطره می‌اندازد (لیو و همکاران، ۲۰۰۳). مسمومیت ناشی از سرب در کودکان باعث آسیب‌های عصبی می‌شود که این صدمات عصبی منجر به کاهش ضریب هوشی، از دست دادن حافظه‌ی کوتاه مدت، ناتوانی در یادگیری و اختلالات هماهنگی اعضاء می‌گردند.

روش‌های مختلفی برای حذف یون‌های فلزی وجود دارد از جمله: ۱- اسمز معکوس: در این فرایند از یک غشای نیمه تراوا تحت فشاری بیش از فشار اسمزی استفاده می‌شود. عیب این روش هزینه بالای آن است. ۲ - Electro dialysis: با بکارگیری از پتانسیل الکتریکی ، کاتیون‌ها و آنیون‌های موجود در محلول به سوی الکترودها حرکت می‌کنند. در این روش امکان تشکیل هیدروکسیدهای فلزی وجود دارد.۳- Ultrafiltration: مشکل این روش در تولید لجن است. ۴- تبادل یونی: در اینجا ، یون‌های فلزی با یون‌های روی رزین تعویض می‌شوند. هزینه بالا و حذف جزئی یون‌های خاص از جمله معایب این روش است. در تبادل‌یونی دیواره سلولی میکروارگانیزم‌ها حاوی پلی ساکاریدها و یون‌های فلزی دو ظرفیتی‌اند که می‌توانند با یون‌های دیگر تعویض شوند. برای مثال آلژینات جلبک دریایی بصورت نمک‌های سدیم ، پتاسیم ، کلسیم ، منیزیم وجود دارد. این یون‌ها می‌توانند با یون‌هایی مانند کبالت، روی، مس، کادمیوم مبادله شوند. جذب‌زیستی مس توسط قارچ *Ganoderma lucidium* و *niger Aspergillus* از این طریق انجام می‌شود. ۵- رسوب‌دهی شیمیایی: این روش با افزودن عوامل رسوب‌دهنده مانند زاج سفید ، آهک، نمک‌های آهن و... انجام می‌شود. فرایند رسوب‌دهی می‌تواند وابسته یا مستقل از متابولیسم انجام شود. اگر میکروارگانیزم ترکیباتی تولید کند که منجر به رسوب گذاری فلز شود ، در این حالت مکانیزم وابسته به متابولیسم سلولی است. ولی اگر رسوب‌گذاری پس از واکنش شیمیایی بین فلز و سطح سلول انجام شود ، مستقل از متابولیسم سلولی خواهد

بود. ۶- گیاه‌پالایی: در این روش از گیاهان ویژه‌ای برای پاکسازی استفاده می‌شود. عیب این روش ، زمان‌بر بودن و سخت بودن احیای گیاه برای جذب‌زیستی است. ۷- جذب‌سطحی فیزیکی : این نوع جذب با کمک نیروهای واندروالس انجام می‌شود. میانکنش‌های الکتروستاتیکی نشان می‌دهند که مسئول جذب‌زیستی مس توسط جلبک *Chiarella vulgaris* و نیز کروم توسط قارچ *Ganoderma lucidum* و *Aspergillus niger* از این راه انجام می‌شود ۸- تجمع : حذف فلز از محلول با تشکیل کمپلکس‌هایی بر روی سطح سلول پس از میانکنش میان فلز و گروه‌های فعال می‌تواند انجام‌شود. این فرایند تنها مکانیزمی است که مسئول جمع‌آوری کادمیوم، روی، مس و جیوه توسط *Pseudomonas syringae* می‌باشد.

بنابراین روش‌های مختلفی برای حذف یون‌های فلزی وجود دارد که از جمله مهمترین این روش‌ها: جذب‌زیستی (Bioabsorption) است، این روش عبارت است از: توانایی توده‌زیستی در جمع‌آوری فلزات‌سنگین از پساب‌ها از طریق فعالیت‌های متابولیکی غیر مستقیم یا راه‌های فیزیکوشیمیایی جذب. این روش دارای فواید عمده‌ای از جمله هزینه پائین، کارایی بالا، عدم نیاز به مواد مغذی فراوان، امکان احیای جاذب و امکان بازیافت فلز می‌باشد.

جلبک‌ها، کپک‌ها، مخمرها، باکتری‌ها، قارچ‌ها و گیاهان از جمله این جاذب‌ها هستند. ساختار پیچیده جاذب‌های زیستی آن‌ها را توانمند می‌کند تا به طرق مختلف فلزات را جذب کنند. در واقع جذب‌زیستی می‌تواند توسط عوامل مختلف زیستی صورت گیرد، از جمله: **۱**- تجمع فلزات درون میکروارگانیزم‌ها ۲- جذب شیمیایی ۳- گیاه پالایی

علاوه بر این عوامل محیطی مختلفی نیز بر میزان جذب‌زیستی مؤثر می‌باشد که از آن جمله می‌توان به موارد زیر اشاره کرد :۱- دما ۲- غلظت‌های نمکی ۳- pH ۴- غلظت توده‌زیستی. ظاهراً روش‌های زیستی یکی از راه‌حل‌های بالقوه برای جذب فلزات‌سنگین می‌باشند، چون معمولاً این روش‌ها فلزات‌سنگین را از آلاینده جذب می‌کنند، بدون اینکه آلودگی ثانویه‌ای را برجای بگذارند (گاد و همکاران، ۱۹۹۸). چون فلزات‌سنگین نمی‌توانند به صورت زیستی تخریب گردند، اغلب اوقات جذب آن‌ها با استفاده از راهکارهای زیستی به منظور حذف فلزات‌سنگین اتفاق می‌افتد (وولسکی و هلن، ۱۹۹۵).

استفاده از پروتئین‌های متصل شونده به فلزات یا پپتیدهای توسعه یافته موجودات مقاوم به فلزات به منظور بالا بردن مقاومت یا توانایی انباشتن فلزات در یک میزبان در چندین تحقیق مورد مطالعه قرارگرفته‌اند (کسانگور و همکاران، ۲۰۰۵). پروتئین‌هایی با توانایی اتصال به فلزات‌سنگین مانند متالوتیونین‌ها (علی محمدی و همکاران، ۲۰۰۵)، فیتوکلاتین‌ها (کایانو و همکاران، ۲۰۰۶) درموجودات مختلف شناخته شده‌اند و از لحاظ ژنتیکی در باکتری‌ها و گیاهان بیان شده‌اند (کسانگور و همکاران، ۲۰۰۵). اخیراً چندین پپتید متصل‌شونده به فلزات که پپتیدهای غنی از سیستئین و هیستدین هستند در باکتری إکلای یا گونه‌های مخمر نیز بیان شده‌اند (پاموگلو و کرجی، ۲۰۰۶؛ چوو و همکاران، ۲۰۰۴؛ کومار و همکاران، ۲۰۰۶؛ کسانگور و همکاران، ۲۰۰۵). این پپتیدها و قطعات پروتئینی با اندازه‌های مختلف، حاوی چندین گروه جاذب فلزات در زنجیره‌های جانبی خود هستند که برای اتصال به فلزات مناسب می باشند. این پپتیدهای کوچک متصل شونده به فلزات دارای توالی غنی از سیستئین می‌باشند که قادر به جذب فلزات سنگین می‌باشند. این پپتیدها در سطح سلول‌های یوکاریوتی ظاهر می‌شوند و به عنوان جاذب مواد عمل می‌کنند. در بسیاری از موارد نشان داده شده که بیشینه جذب فلزات موقعی اتفاق می‌افتد که این پروتئین‌ها در سطح سلول بیان

می‌شوند (چوو و همکاران، ۲۰۰۴). موجودات عالی مانند گیاهان و حیوانات عموماً بوسیله تولید پپتیدهای غنی از سیستئین مانند متالوتیونین‌ها، فیتوکلاتین‌ها و دفنزین‌ها و اتصال آن‌ها به یون‌های فلزی به حضور فلزات‌سنگین پاسخ می‌دهند (ورنروس و استال، ۲۰۰۴). پروتئین‌های مختلفی که مشابه متالوتیونین‌ها، غنی از سیستئین هستند مانند دفنزین‌ها از گونه‌های مختلف گیاهی جدا شده‌اند. دفنزین‌های گیاهی فعالیت‌های زیستی متفاوتی از جمله: بازدارنده انتقال پروتئین، فعالیت ضدمیکروبی، تغییردهنده دامنه تحمل فلز در گیاهان، بلوکه‌کننده کانال‌های یونی و غیره را دارا می باشند که نوع و میزان فعالیت‌ها با تغیرات ساختار اولیه آن‌ها مرتبط می‌باشد.

تقریباً همه فرایندهای زیستی که توسط پروتئین‌ها انجام می‌شوند به ویژگی‌های ساختاری پروتئین‌ها از جمله دینامیک و انعطاف‌پذیری آن‌ها بستگی دارد. باوجود پیشرفت روش‌های تجربی درسال‌های اخیر به کمک این روش‌ها دینامیک پروتئین‌ها با جزئیات اتمی قابل بررسی نیست، به همین دلیل از شبیه‌سازی رایانه‌ای جهت فهم بهتر جنبه‌های اساسی عملکرد پروتئین‌ها استفاده می‌شود، در واقع شبیه‌سازی رایانه‌ای روشی مکمل برای فهم نتایج تجربی به حساب می‌آید (مک کامون و همکاران، ۱۹۹۷ و آندریونای و همکاران، ۲۰۰۱). شبیه‌سازی دینامیک مولکولی روشی مناسب برای مدل‌سازی میکروسکوپی در مقیاس اتمی و مولکولی فراهم می‌کند. به کمک شبیه‌سازی‌های رایانه‌ای خواص سیستم‌های مورد مطالعه با ارزیابی نیروها و انرژی‌های بین مولکولی، که معمولاً توسط مدل‌های نظری تعریف می‌شوند، تعیین می‌گردند. دینامیک مولکولی شکلی از شبیه‌سازی کامپیوتری است که در آن اتم‌ها و مولکول‌ها اجازه دارند برای یک دوره از زمان تحت قوانین شناخته شده فیزیک باهم بر هم‌کنش کنند و چشم‌اندازی از حرکت اتم‌ها بدهند. از آن‌جائی‌که سیستم‌های مولکولی عموماً شامل تعداد زیادی از ذرات هستند امکان‌پذیر نیست که ویژگی‌های سیستم‌های پیچیده را بطور تحلیلی بدست‌آوریم. شبیه‌سازی دینامیک مولکولی این مساله را با به‌کار بردن روش محاسباتی حل می‌کند. این روش یک واسطه بین تجربیات آزمایشگاهی و نظریه ایجاد می‌کند و به عنوان یک آزمایش مجازی در نظر گرفته می‌شود. دینامیک مولکولی روابط بین ساختار مولکول‌ها، حرکت مولکول‌ها را بررسی می‌کند. دینامیک مولکولی یک روش منظم چندگانه است. قوانین و نظریه‌های آن از ریاضیات، فیزیک و شیمی به‌دست می‌آید و الگوریتم‌هایی را از علم رایانه و نظریه اطلاعات به‌کار می‌برد. شبیه‌سازی‌های دینامیک مولکولی ابزار مهمی در درک اساس فیزیکی ساختمان و عملکرد ماکرومولکول‌های زیستی هستند. شبیه‌سازی‌ها می‌توانند سؤالات ویژه‌ای را در مورد ویژگی‌های سیستم‌های مدل پاسخ بدهند جنبه دیگر اهمیت شبیه‌سازی این است که با این‌که میدان‌های نیرویی که درشبیه‌سازی‌ها استفاده می‌شود تقریبی است ولی کاملاً تحت کنترل می‌باشد (کارپلوس و همکاران، ۲۰۰۱). شبیه سازی ملکولی یکی از موضوعات علم بیوفیزیک محاسباتی است. مواردی چون: بررسی پایداری پروتئین‌ها، تغییرات ساختاری تاخوردگی پروتئین‌ها، بررسی تغییرات ساختار مولکولی DNA، غشاءها، کمپلکس‌ها و انتقال یون درسامانه‌های زیستی از جمله مواردی هستند که توسط این روش بررسی و پیش‌بینی می‌گردند (گوهرشادی و همکاران، ۲۰۰۸). هر چند شبیه‌سازی دینامیک مولکولی نمی‌تواند جایگزین روش‌های تجربی شود، اما می‌تواند مکمل آن باشد و به تحلیل نتایج تجربی کمک بسیاری کند.

ژن *Sdmod* یک ژن دستکاری شده‌است، که به منظور به دست آوردن رنج وسیع فعالیت علیه میکروب‌ها ساخته شده است و در آن تغییراتی بر اساس توالی ژن دفنزین آفتابگردان (*SD2*) بر اساس ژن دفنزین

اسفناج (*SO-D2*) که متعلق به گروه چهارم دفنزین‌ها و ژن دفنزین سیب‌زمینی، (*ST-PTH1*) که متعلق به گروه سوم می‌باشد اعمال شده‌است. این ژن پس از انتقال به مخمر در سیستم یوکاریوتی، خاصیت ضدمیکروبی گروه سوم و چهارم دفنزین‌ها را از خود نشان داد (سوتچنکو و همکاران، ۲۰۰۵). باتوجه به امکان کارایی احتمالی دفنزین سنتزی *Sdmod* در جذب فلزات سنگین، هدف از انجام این مطالعه بیان این ژن در یک سیستم یوکاریوتی از طریق تکنیک *Agroinfiltration* و استخراج پروتئین آن به‌منظور بررسی جذب فلز سنگین می‌باشد در واقع کارهای انجام گرفته در این مطالعه به دو بخش نظری و تجربی تقسیم می‌شود که در بخش نظری به شبیه‌سازی دینامیک‌مولکولی بر روی پپتید و در بخش تجربی بیان و کلون‌سازی ژن دفنزین در سیستم یوکاریوتی پرداخته شده است. که در این بخش به منظور بررسی نقش پروتئین دفنزین تولید شده در سیستم یوکاریوتی گیاهی در جذب فلزسنگین روی بعد از استخراج این پروتئین از برگ لوبیا و بهینه‌سازی شرایط جذب فلز روی به منظور بررسی تأثیر فاکتورهای مختلف بر جذب فلز روی توسط پروتئین، این آزمایش را برای pHهای مختلف، غلظت‌های مختلف پروتئین، مدت زمان‌های مختلف قرارگیری در انکوباتور و دماهای مختلف انکوباتور نیز (رانپینگ و همکاران، ۲۰۰۶) مورد بررسی قرار می‌گیرد. اهداف این مطالعه عبارتند از:

۱- تولید پروتئین دفنزین در سیستم یوکاریوتی گیاهی

۲- بررسی امکان جذب فلزات‌سنگین توسط پروتئین حاصل از بیان ژن دفنزین جدید در سیستم یوکاریوتی

۳- بررسی امکان جذب فلزات‌سنگین توسط پروتئین دفنزین با استفاده از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

۴- بررسی مقادیر جذب فلز روی و کادمیوم و عوامل مؤثر بر میزان جذب فلز

فصل دوم

بررسی منابع

در میان روش‌های فیزیکی و شیمیایی روش‌های رسوب‌دهی شیمیایی، تصفیه، تبادل‌یونی، روش الکتروشیمیایی، اسمزمعکوس، جذب‌سطحی توسط کربن فعال و تبخیر از متداول‌ترین روش‌های حذف یون فلزات‌سنگین از محیط‌های آبی می‌باشند. از طرفی رسوب‌دهی شیمیایی و روش‌های الکتروشیمیایی در غلظت‌های پایین یون فلزی به خصوص در محدوده غلظت ۱۰۰-۱ میلی‌گرم بر لیتر بی‌اثر بوده و باعث تولید مقدار بسیار زیاد لجن می‌شود که مشکلات بسیاری به همراه خواهد داشت. هم‌چنین تبادل‌یونی، اسمزمعکوس و جذب‌سطحی توسط کربن فعال نیز در غلظت‌های بسیار پایین یون فلزی پرخرج هستند و صرفه اقتصادی ندارند (وولسکی، ۲۰۰۱). از این رو در سال‌های اخیر روش‌های زیستی در کنترل و حذف فلزات‌سنگین بسیار مورد توجه بوده‌است.

۲-۱- فلزات سنگین

تاکنون تعاریف متعددی برای فلزات‌سنگین ارائه شده‌است. فلزات‌سنگین به گروهی از عناصر گفته می‌شود که دارای وزن مخصوصی بیشتر از ۵/۳ گرم بر سانتی‌متر مکعب باشند. با این تعریف حدود ۴۰ عنصر، فلزسنگین محسوب می‌شوند که به شکل‌های پراکنده در تشکیلات معدنی قراردارند (داداشی پور. م، ۱۳۷۷). رند تعریف دیگری از فلز سنگین ارائه می‌کند. بدین صورت که فلزات‌سنگین عناصری هستند که وزن اتمی آن‌ها بیش از ۴۰ باشد (رند، ۱۹۹۵). به هرحال تاکنون تعریف مشخصی از فلزات‌سنگین ارائه نشده است. آنچه که اهمیت دارد، این است که فلزات‌سنگین معمولا سمی و یا حتی سرطان‌زا هستند و در بسیاری از پساب‌های صنعتی کم و بیش یافت می‌شوند (جرسرائی. ع، ۱۳۷۵). درجه سمی بودن فلزات‌سنگین را از روی الکترونگاتیویته آن‌ها می‌توان طبقه‌بندی کرد (دپلگ وهمکاران،) به‌طور کلی فلزات‌سنگین شامل فلزات قلیایی خاکی مانند کلسیم و منیزیم، لانتانیده‌ها و اکتانیدها مانند اورانیم و متالوئیدها شامل آرسنیک می‌باشند. در سیستم‌های آبی فلزات‌سنگین مانند مس،روی، کادمیم و جیوه، سرب و نیکل وجود دارند. این

عناصر برای موجودات زنده سمی هستند اما بسیاری از آن‌ها مانند مس و روی در غلظت‌های بسیار کم برای سوخت‌وساز سلول‌ها ضروری هستند. در حالی که تاکنون برای کادمیم و سرب فعالیت زیستی خاصی شناخته نشده است (رند، ۱۹۹۵). نگرانی‌های انسان هنگامی افزون می‌شود که روش‌های تصفیه موجود برای چنین پساب‌هایی نتواند رعایت قوانین استانداردهای زیست‌محیطی را تضمین کند. از این رو به‌نظر می‌رسد که با ادامه استخراج منابع معدنی و انباشت محیطی مواد خطرناک باید روش‌هایی با کارایی بالاتر در سم زدایی و بازیابی چنین فلزاتی لحاظ شود (فورنس و همکاران، ۱۹۹۰). از این‌رو حذف این فلزات از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است روش‌های اصلی حذف فلزات‌سنگین در محیط آبی، روش‌فیزیکی، شیمیایی و زیستی است. روش‌های فیزیکی عمدتا شامل تصفیه، جذب‌سطحی، اسمزمعکوس (جداسازی غشایی) وتبخیر (بیشتر برای تصفیه آب) می‌شوند (فورنس و همکاران، ۱۹۹۰ و برام، ۱۹۹۴). در روش تصفیه از فیلترهای شنی و ذغالی استفاده می‌شود که اندازه منافذ آن‌ها عامل مهمی در حذف آلاینده‌هاست. جذب‌سطحی از روش‌های معمول جذب‌فیزیکی است که در آن از جاذب‌های طبیعی مانند زغال سنگ فعال شده، پوست کاج، ساقه گندم (کاه)، ذرات شن، خاکستر وغیره برای جذب‌فیزیکی فلزات‌سنگین استفاده می‌شود (سیاح زاده ا.ح، ۱۳۸۱). جذب‌سطحی کربن فعال بیشتر در جهت حذف مواد آلی از فاضلاب به‌کار رفته‌است و استفاده از آن جهت حذف فلزات‌سنگین نیز در حال پیشرفت است (کادیرولوو، ۲۰۰۱). برای استفاده از روش‌های فیزیکی لازم است که ابتدا فرایندهای ته نشینی و تصفیه به منظور جذب اولیه فلزات‌سنگین صورت گیرد. بنابراین از کربن فعال بیشتر جهت تکمیل فرایند تصفیه استفاده می‌شود. در دهه اخیر برای جذب سطحی از موارد ارزان قیمت و قابل دسترس استفاده شده‌است (شریعت پناهی م ، ۱۳۶۸). روش‌های شیمیایی متعددی برای حذف فلزات‌سنگین ارائه شده که می‌توان به رسوب‌دهی شیمیایی، اکسایش و کاهش و تبادل‌یونی اشاره کرد (تونی، ۱۹۹۴و جورجنسن و همکاران، ۱۹۸۱). اکثر فلزات‌سنگین در شرایط اسیدی، محلول می‌باشند و تحت شرایط معینی از pH قلیایی به صورت رسوب در می‌آیند (إکن‌فیلدر، ۱۹۸۹). رسوب‌دهی شیمیایی به دو روش هیدروکسیدی وسولفیدی انجام می‌شود. انحلال‌پذیری فلزات در pH های مختلف متفاوت است به طوری که در pH اسیدی، محلول و در pH قلیایی نامحلول هستند. در رسوب‌دهی هیدروکسیدی سعی می‌شود که با ایجاد محیط قلیایی رسوب نامحلول هیدروکسید فلز تشکیل شود. pH بهینه برای تشکیل رسوب فلزی به عوامل متعددی از قبیل نوع فلز، نوع رسوبی که تشکیل می‌شود به حضور مواد کمپلکس‌دهنده بستگی دارد. در روش رسوب‌دهی سولفیدی از این ویژگی استفاده می‌شود که انحلال‌پذیری رسوب سولفید فلز بسیار کمتر از انحلال‌پذیری رسوب هیدروکسید می‌باشد. این خاصیت موجب شده‌است که تشکیل رسوب با بنیان سولفید از فلز، یکی از روش‌های موثر برای حذف فلزات‌سنگین باشد. اساس روش الکتروشیمیایی آن است که یون‌های فلزی محلول در آب به صورت کاتیون هستند. بنابراین از طریق الکترولیز و روش های اکسایش و کاهش، تبدیل آن‌ها به اتم خنثی و در نتیجه حذف آن‌ها امکان‌پذیر است. به دلیل اندازه بسیار کوچک ابعاد یون‌های فلزات‌سنگین می‌توان از عوامل شیمیایی شلات‌کننده استفاده کرد. یون‌های فلزی به مولکول‌های بزرگتر متصل و بی‌تحرک می‌شوند و می‌توان آن‌ها را به راحتی جدا کرد. از منعقدکننده‌های شیمیایی مانند آهن، آلومینیم و نمک‌های فریک نیز در صنعت برای حذف فلزات‌سنگین استفاده می‌شود (گراو هیل و فیلدر، ۱۹۸۹).

۲-۱-۱- منابع تولید کننده فلزات‌سنگین

آلودگی محیط زیست به وسیله فلزات سمی، ناشی از برخی کارخانه‌های صنعتی، فعالیت‌های کشاورزی و پساب‌های حاصل از استخراج معادن است. به‌عنوان مثال، پساب‌های که از صنایع استخراج معادن و کارخانه‌های مختلفی نظیر صنایع آبکاری خارج می‌شوند، حاوی مقادیر نسبتا زیادی فلزات سمی می‌باشند. اگر تخلیه چنین پساب‌هایی بدون تصفیه صورت گیرد باعث صدمات جبران ناپذیری به محیط زیست می‌شود (افتخاریان.م،ع، ۱۳۷۴ و نیومن و مکینتوش، ۱۹۹۱).

۲-۱-۲- اثرات زیست محیطی فلزات سنگین

این آلاینده‌ها عمدتا به صورت ذرات و یا محلول وارد اتمسفر، محیط آبی و زیستگاه‌های خاکی می‌شوند و در محل ورود به محیط تراکم‌های خیلی بالایی از آن‌ها دیده می‌شود. فرم محلول در آب فلزات‌سنگین به دلیل انتقال سریع‌تر توسط موجودات زنده بسیار خطرناک‌تر است. اثرات فلزات بر عملکرد اکوسیستم به اشکال گوناگون بروز می‌کند و کنترل آن به لحاظ اقتصادی و بهداشت عمومی حائز اهمیت است.

انباشت فلزات سمی و سنگین درخاک‌های مرغوب کشاورزی تقریبا آن‌ها را بدون استفاده می‌کنند و جذب‌زیستی آن‌ها توسط گیاهان و به دنبال آن انباشت در زنجیره‌غذایی، اثرات نامطلوبی بر تمام سطوح زنجیره‌های غذایی و در نهایت انسان می‌گذارد. اغلب فلزات‌سنگین در واکنش‌های زیستی سلول‌های موجودات زنده، تداخل کرده حتی مانع برخی از واکنش‌های زیست شیمیایی سلول‌ها می‌شوند. وجود فلزات‌سنگین در پساب‌های شهری درسیستم تصفیه پساپ اختلال ایجاد می‌کند و باعث کاهش بازدهی تصفیه و در موارد حاد، باعث توقف فعالیت‌های زیستی سیستم‌های تصفیه می‌شود. میزان سمیت فلزات‌سنگین درشرایط مختلف فرق می‌کند و تابع عواملی مانند غلظت، مدت تماس و سایر عوامل فیزیکی، شیمیایی و زیستی است (جرسرائی ع، ۱۳۷۵). یون‌های فلزی در بسیاری از فرایندهای زیستی مانند تنفس و رشد ضروری هستند، درصورتی‌که تجمع فلزات ضروری مانند روی، مس یا فلزات غیرضروری سمی مانندکادمیم وجیوه خطرساز است. روی در غلظت فیزیولوژکی فعالیت کاهشی ندارد و سمیت آن کمتر از مس است ولی در غلظت‌های بالا، با پروتئین‌ها پیوندهای نامناسب تشکیل می‌دهد (پیس کاپوزین و همکاران، ۲۰۰۶). کادمیم از فلزات غیرضروری و بر خلاف مس و روی حتی درغلظت پایین سمی است. کادمیوم آنتی‌اکسیدان‌ها را نیز از بین می‌برد. کروم و کادمیم از معمول‌ترین آلوده کننده‌ها در آب طبیعی و فاضلاب هستند. تجمع کادمیوم باعث اختلالات کلیوی، نارسایی در دستگاه تنفس، سرطان و فشار خون می‌شود. محدوده مجاز کادمیوم در فاضلاب و آب آشامیدنی بین ۰.۱- ۰.۰۵ میلی‌گرم بر لیتر است (فورست و همکاران، ۱۹۹۴).

۲-۲- انواع روش‌های زیستی برای حذف فلزات‌سنگین

از آن‌جایی‌که روش‌های رایج فیزیکوشیمیایی ذکر شده در غلظت‌های پایین فلزات‌سنگین کارایی ندارند و بسیارگران و پرهزینه هستند و نیز با توجه به اینکه صنعت به دنبال روش‌های ارزان و مناسب برای جذب و حذف فلزات است، بنابراین در چند سال اخیر به روش‌های زیستی متوسل شده‌اند. در روش‌های زیست فناوری از این فرایندهای طبیعی به منظور حذف هر چه بهتر پسماندهای خاص استفاده می‌شود. سه فرایند مشخص زیست فناوری شامل جذب‌سطحی از طریق زیستی، تشکیل رسوب خارجی سلولی و جذب شدن از

طریق پلیمرهای خالص شده، برای پاکسازی پساب‌های حاوی فلزات‌سنگین وجود دارد که منحصر به فرد نبوده و ممکن است فرایندهای فیزیکوشیمیایی و زیست‌شناختی متعددی در آن دخالت داشته باشند (بیتون، ۱۹۹۹). روش‌های زیستی میکروبی حذف فلزات سنگین که تاکنون مورد مطالعه قرار گرفته‌اند شامل تبدیل‌زیستی، رسوب‌دهی زیستی و جذب‌زیستی می‌باشند.

۲-۲-۱- تبدیل‌زیستی

در این روش، میکروب‌ها برخی از فلزات یا شبه‌فلزات را به عنوان‌دهنده یا پذیرنده الکترون در سوخت و ساز انرژی به‌کار می‌برند. در این فرایند ممکن است که یک فلز سمی به یک فلز با سمیت کمتر یا کاملاً غیر سمی تبدیل شود. به‌عنوان مثال از باکتری‌های احیاءکننده سولفات استفاده می‌شود. سولفیدهیدروژن تولیدی توسط باکتری را معمولاً با نیتروژن مخلوط می‌کنند و وارد فاضلاب می‌نمایند در نتیجه فلز آهن به صورت سولفید رسوب می‌کند. سولفیدهای آهن را می‌توان در میدان مغناطیسی قوی جذب و جدا کرد (رند، ۱۹۹۵).

۲-۲-۲- رسوب‌دهی زیستی

بعضی از میکروب‌ها اعم از زنده و غیرزنده مانند زیست‌توده مرده یا سلول از پیش تیمارشده قادرند فلزات را به صورت کاتیون‌هایی در سطح سلول در یک فرایند غیر فعال انباشت نمایند. مورد اخیر مزیت‌های بیشتری دارد که از آن جمله می‌توان به عدم محدودیت غلظت فلزسنگین برای مسمومیت سلول اشاره‌کرد (کاپور و ویراغوان، ۱۹۹۷). مارین و همکارانش در سال ۱۹۹۷، زیست‌توده زنده و مرده (۲۱ قارچ) را به عنوان جاذب در نظر گرفتند و بیشترین مقدار جذب سرب را برای زیست‌توده مرده ۱۰۰میلی‌گرم بر گرم و مقدار ۳۱۰ میلی‌گرم برگرم را برای *آگاریکوس کالسوس* زنده گزارش‌کردند. در جای دیگر از جلبک‌سبزمرده *کلرلاولگاریس* به عنوان جاذب استفاده شده ومقدار جذب (میلی‌گرم برگرم)۳ /۴۲ گزارش داده شده‌است (دومیز و همکاران، ۱۹۹۹). به‌هرحال رسوب‌دهی زیستی جهت کنترل و بازیافت فلزات‌سنگین بخصوص در غلظت‌های پایین قابل استفاده می‌باشد.

۲-۲-۳- جذب‌زیستی

مکانیسم‌های جذب‌زیستی فلزات‌سنگین و سمی در میکروارگانیسم‌های مختلف به دو دسته تقسیم می‌شود (چن و ویلسون، ۱۹۹۷): الف- جذب زیست‌شناختی مستقیم: اصطلاح جذب‌سطحی به طریق زیستی برای جذب‌پیرامونی توسط زیست‌توده‌ی زنده یا مرده به‌کارمی‌رود. این جذب سطحی مستقیم از طریق مکانیسم‌های فیزیکوشیمیایی نظیر جذب‌سطحی یا تبادل‌یونی صورت می‌گیرد. وقتی از زیست‌توده‌ی زنده استفاده می‌شود، مکانیزم‌های جذب متابولیکی ممکن است دراین فرایند دخالت داشته باشند. سلول‌های زنده نیزممکن است بر اثر خاصیت سمی فلز غیرفعال شوند. از این‌رو بیشتر سیستم‌های سلولی زنده که تاکنون مورد استفاده قرار گرفته‌اند، برای رفع آلودگی پساب‌هایی بوده‌است که غلظت موجود در آن کمتر از حد غلظت سمی است. در کارخانه‌های بزرگتر می‌توان مخلوطی از میکروارگانیسم‌ها را به‌کار برد. برای مثال اضافه‌کردن جلبک‌ها و توده‌ی سیانوباکتری‌ها به پساب معادن در حال استخراج فلزات، مقدار جیوه، کادمیم، مس و نیکل را در آن به میزان زیادی کاهش می‌دهد. فراورده‌های تولیدی مشتق از سلول‌های میکروبی مانند