جذب طلا توسط پلي ساكاريدهاي استخراج شده از ديواره سلولهاي توتون (*Nicotiana tobacum* cv. burley 21) در شرايط *in vitro*

راضيه رجبي[۱]، فائزه فناني*[۱]، حسين نادري‌منش[۱]، خديجه خرمي‌شاد[۱]، اعظم افشار نادري[۲]
[۱] بخش زيست‌شناسي، دانشكده علوم‌پايه ، دانشگاه تربيت مدرس، تهران، ايران
[۲] بخش بيوشيمي، دانشكده علوم پزشكي ، دانشگاه تربيت مدرس، تهران، ايران
* مسئول مكاتبات- ص. پ. ۱۷۵- ۱۴۱۵۵، آدرس الكترونيكي: *ghangia@modares.ac.ir*
(دريافت: ۸۳/۱۰/۱۴ ؛ پذيرش:۸۴/۲/۶)

چكيده

اخيراً از گياهان و مولكول‌هاي زيستي به منظور حذف فلزات سنگين از محيط زيست به عنوان روشي ارزان و مهربان با طبيعت استفاده مي شود. در اين تحقيق ابتدا مواد زمينه اي پلي ساكاريدي ديواره سلول هاي توتون استخراج شد و سپس اجزاي پلي ساكاريدي آن شامل پكتين، همي سلولز A، همي سلولز B و سلولز جداسازي و تخليص گرديد. مواد زمينه اي و اجزاي پلي ساكاريدي ديواره با محلول كلريد طلا با غلظت ppb ۱۰۰ در سه pH (اسيدي، تقريبا خنثي و بازي)و دو زمان متفاوت (۱و ۱۲ ساعت) تيمار شدند. بر مبناي نتايج بدست آمده از GFAAS تمام اجزاي پلي ساكاريدي ديواره قادر به جذب طلا در تمامpH ها و زمان هاي مورد آزمايش بودند. در بين اجزاي پلي ساكاريدي ديواره، سلولز در pH هاي تقريبا خنثي و بازي و همي سلولز A در pH اسيدي كمترين ميزان جذب طلا رانشان دادند. همي سلولز B در تمام pH ها بيشترين مقدار جذب طلا را طي ۱ ساعت تيمار نشان داد. با افزايش زمان تيمار نمونه ها با محلول كلريد طلا ميزان جذب طلا افزايش يافت، جز در مورد همي سلولز B كه با افزايش زمان، ميزان جذب طلا كاهش قابل توجهي را نشان داد.

واژه‌هاي‌كليدي: *Phytoremediation*، سلولهاي‌توتون، محيط‌كشت LS، ماتريس پلي‌ساكاريدي ديواره، سلولز، پكتين، همي‌سلولز A، همي‌سلولز B.

مقدمه

آلودگي‌زدايي با استفاده از گياهان (Phytoremediation) فناوري نويني‌است‌كه از آن براي‌حذف آلاينده‌هاي‌محيط (نظير فلزات سنگين و مواد آلي) استفاده مي‌شود (Lasat 2000, Garbisu 2001). مطالعات متعدد نشان داده است كه برخي از گونه‌هاي گياهي قادر به جذب فلزات سنگين از محيط‌زيست هستند (Gardea-Torresdey *et al.* 2002). ابتدا محققان بر اين باور بودند كه فقط گياهان زنده قادر به جذب فلزات سنگين از زيستگاه خود هستند، اما در سالهاي اخير ثابت شده كه بخش‌هاي مرده برخي از باكتري‌ها، قارچ‌ها، جلبك‌ها و گياهان عالي نيز قادر به جذب فلزات سنگين هستند (Gardea-Torresdey *et al.* 1996، Sarret *et al.* 1998، Ball 2002, Sastry *et al.* 2003). در تحقيقات گذشته اشاره شده كه ديواره سلولي در جذب و اتصال با فلزات نقش مهمي دارد (Garbisu 2001). ولي تاكنون در زمينه تعيين ميزان جذب فلزات به وسيله اجزاي اصلي ديواره سلولي و مقايسه توان جذب آنها تحقيقات گسترده اي صورت نگرفته است.

هدف پژوهش حاضر، تعيين ميزان جذب طلا توسط ماتريس پلي ساكاريدي ديواره سلول‌هاي توتون و اجزاي ديواره‌اي در شرايط در زيوه (*in vitro*) مي‌باشد. استفاده از اجزاي پلي-ساكاريدي ديواره سلولهاي گياهي مي‌تواند ابزاري نوين براي جذب طلاي موجود در پساب‌ها و فاضلاب‌هاي معدني باشد.

مواد و روشها

الف) كشت سلول هاي توتون در محيط كشت LS: از محيط كشت تعديل شده LS فاقد گليسين و داراي ۳% سوكروز و ۰/۱ ميلي مولار بوريک اسيد (pH ۵/۸)براي واكشت توده‌هاي كالوس استفاده گرديد. توده‌هاي كالوس تقريباً هر۱۴- ۲۱ روز يكبار در زير هود لامينار به محيط‌هاي جديد منتقل و در اتاق كشت سترون و دماي°C ۲±۲۷ و در شرايط تاريكي نگهداري شدند. توده‌هاي كالوس هر۱۴-۲۱ روز برداشت و بر روي نايلون مش (۴۲ µm) و قيف بوخنر ۳ مرتبه با آب مقطر (۴ برابر حجم كالوس) شسته و با استفاده از پمپ خلأ آب‌گيري شدند. توده كيک مانند حاصل بلافاصله با نيتروژن مايع (۱۹۲°C-) تثبيت و در فريزر با دماي ۸۰°C - نگهداري شد.

ب) استخراج ماده زمينه اي پلي ساكاريدي ديواره: براي حذف تركيبات محلول در آب سلول‌ها، توده منجمد شده پس از توزين، درون هاون با استفاده از بافر سديم فسفات با pH ۶/۸ و غلظت

۵۰ ميلي مولار ساييده شد. پس از همگن شدن، به مـدت بيسـت دقيقه دو بار با بيست حجم از همان بافر بـر روي لرزاننـده تكـان داده شده و بر روي نايلون مش صاف گرديد. براي حذف چربي‌هـا و پروتئينهاي موجود در سلول‌ها، توده حاصل از مرحله قبل دوبار با ٤ و١٠ حجم (V/W) اتانول مطلق به ترتيب به مدت دو دقيقه و يک ساعت شسته و با استفاده از خلأ سبک صاف شد. سپس به توده حاصل ١٠حجم استون افزوده و پس از يک ساعت صاف شد. توده جامد حاصل به مدت يک شب درون محلول كلروفرم: متانول (به نسبت حجمي ١:٢) قرار گرفت. در نهايت پس از صاف كـردن بر روي نايلون مش، توده سفيد رنگي حاصل گرديد. اين توده كـه عمدتاً پلي ساكاريدي است در زيرهود به مدت ٣-٤ ساعت خشک شد. پودر حاصل تا زمان اسـتفاده در داخـل دسـيكاتور نگهـداري گرديد (Ghanati 2002).

ج) جداسازي تركيبات پلي ساكاريدي ديواره: براي استخراج پلي ساكاريدهاي ديواره از روش Nevins و Sakurai (١٩٩٧) استفاده شد. بر روي ماده زمينه‌اي پلي‌ساكاريدي ديواره به ترتيب اعمال زير انجام شد. ابتدا به منظور استخراج پكتين موجود در ماده زمينه‌اي پلي‌ساكاريدي از EDTA داغ (٥٠ ميلي مولار EDTA در٥٠ ميلي‌مولار بافر سديم فسفات با ٦/٨ pH و دماي°C ١٠٠) استفاده شد و عمل استخراج سه بار تكرار و پس از هر بار بر روي نايلون مش صاف گرديد. محلول حاصل درون كيسه ديااليز (MWCO 8000) ريخته شد و به مدت٢٤ ساعت درون ظرف حاوي دو ليتر آب مقطر قرارگرفت و درطي اين مدت، آب ظرف ٤-٦ مرتبه تعويض شد. به منظور استخراج همي سلولز به بخش باقيمانده، محلول غليظ قلیایي % ١٧/٥ NaOH شامل ٠/٠٢ درصد NaBH4 اضافه شد. اين عمل دو بار تكرار شد و طي مدت زمان ١٨ ساعت انجام گرفت. همي سلولز پس از صاف شدن بر روي نايلون مش و در قيف بوخنر با افزودن نيم حجم اسيد استيک گلاسيال خنثي شد و سپس با قرار گرفتن درکيسه ديااليز به مدت ٢٤ ساعت با چندين بار تعويض آب مقطر، تخليص شد. براي جدا كردن همي سلولز A و همي سلولز B از سانتريفوژ به مدت ٢٠ دقيقه با سرعت g ×١٤٠٠٠ و دماي ١٠°C استفاده شد. پس از سانتريفوژ، همي‌سلولز A به صورت رسوب و همي‌سلولز B به صورت بخش بر رو شناور جدا گرديد. بخش باقيمانده از ديواره پس از استخراج همي سلولزها، دو مرتبه با اتانول: اتر (به نسبت حجمي ١:١) شسته و بر روي صافي شيشه‌اي صاف شد. بخش موجود بر روي صافي شيشه‌اي، سلولز است (Ghanati 2002). به منظور خشک كردن سلولز و همي‌سلولز A از هود استفاده شد، ولي پكتين و همي‌سلولز B درون فريزر°٨٠- منجمد شده و با استفاده از دستگاهFreeze-drier مدل Snijders Scientific b.v. Tilburg ساخت هلند خشک شدند.

د) تهيه محلول كلريد طلا با غلظت ppb ١٠٠: ذخيره‌هايي از نمك كلريد طلا با غلظت ppb ١٠٠ با آب ديونيزه به طور جداگانه در سه pH مختلف ٣، ٦/٨ و ٨/٥ تهيه شدند. لازم به ذكر است كه pH ذخيره‌ها با استفاده از NaOH و HCl ٠/٠٠١ نرمال تنظيم گرديد. اين ذخاير در هر بار آزمايش بصورت تازه تهيه شد.

ه) تيمار اجزاي پلي ساكاريدي با محلول كلريـد طـلا: مقـدار ٢٠ ميلي‌گرم از مواد زمينه‌اي پلي‌ساكاريدي و هريک از اجزاي آن بـه طور جداگانه در معرض ١٠ ميلي ليتـر محلـول كلريـد طـلا قـرار گرفتند. تيمار با طلا براي هر جز پلي- ساكاريدي در سـه pH ٣ ، ٦/٨ و ٨/٥ و براي هر pH در دو زمان يك ساعت و دوازده ساعت انجـام شـد. بعـد از اتمـام زمـان تيمـار، نمونـه‌هـا بـا سـرعت g ×١٠٠٠٠، در دمـاي١٠°C و بـه مـدت ٢٥ دقيقـه سـانتريفوژ شدند. بعد از سانتريفوژ و صاف كردن بر روي نايلون مـش، بخـش مايع از جامد جدا شد.

بخش‌هاي جامد هر يک با دو ميلي ليتر آب ديـونيزه شسـته و طبق برنامه قبل سـانتريفوژ شـدند. بعـد از سـانتريفوژ، بخشـهاي محلول از بخش‌هاي جامد جـدا شـده و بخـش‌هـاي جامـد درون اپندورف‌هاي تميز ريخته و درون فريزر°٨٠- قرار داده شـدند و پـس از منجمـد شـدن بـا اسـتفاده از دسـتگاه Freeze - drier خشک شدند و سپس ميزان طلاي موجود در آنها به روشهاي زير سنجيده شد.

و) سنجش ميزان جذب طلا: به منظور تعيين مقدار طلاي جـذب شـده در هـر جـز، از دسـتگاه Graphite Furnace Absorption (Atomic Spectroscopy) ، مدل Shimadzu AA 670 G ساخت ژاپن با دقت ppb ١٦٠٠- استفاده شد. به طور خلاصـه روش كـار به شرح زير بود:

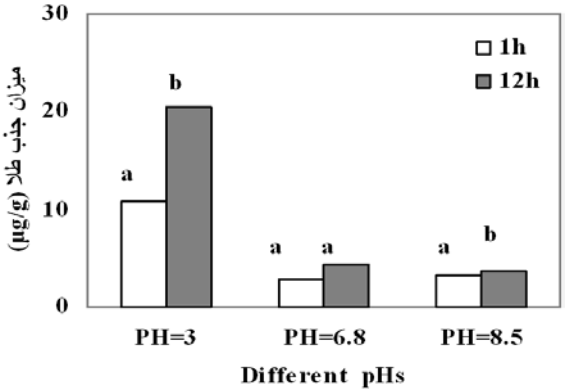
نمونه‌ها پس از توزين و ريختن درون كـروزه‌هـا، داخـل كـوره تحت دماي °C ٣٠٠ و °C ٥٠٠ به ترتيب بـه مـدت دو سـاعت و سه ساعت قرار گرفتند تا در نهايت خاكستر سـفيد حاصـل شـود. پس از بيرون آوردن كروزه‌ها از درون كوره و خنک شدن آنهـا بـه هر يك مقـدار يـک ميلـي ليتـر محلـول H_2O : HCl بـه نسـبت حجمي١:١ اضافه گرديد و بر روي حمام شـن بـا دمـاي °C ١١٠ خشك شد. پس از خشک شدن كامل و سرد شدن كروزه‌ها به هر يک مقدار ٥ ميلي ليتر اسيد كلريدريک N ١ اضافه و محلول‌هـاي حاصل درون ظروف پلاستيكي نگهداري شدند. لازم بـه ذكراسـت اسـتانداردهاي طـلا در غلظتهـاي ppb ١٠-١٠٠ تهيـه و مـورد استفاده قرار گرفت.

ز) سنجش قند کل و یورونیک اسید: مقدار قند کـل و یورونیـک اسید موجود در پکتین، همي‌سلولز A و همي‌سـلولزB بـه ترتیـب طبق روشهاي فنل- سولفوریک اسید (Kakagawa *et al.* 2000) و متا- هیدروکسي بي فنیل (Nishitani 1992) اندازه‌گیري شد.

ح) روشهاي آماري: کلیه آزمایش‌ها در سه تکرار انجـام گرفـت. از نرم افزار Excel، آنالیز واریـانس و t.Test بـراي رسـم نمودارهـا، تجزیه و تحلیل آماري و تعیین معني‌دار بودن تفاوت‌هـا در سـطح $P \leq ۰/۰۵$ استفاده شد.

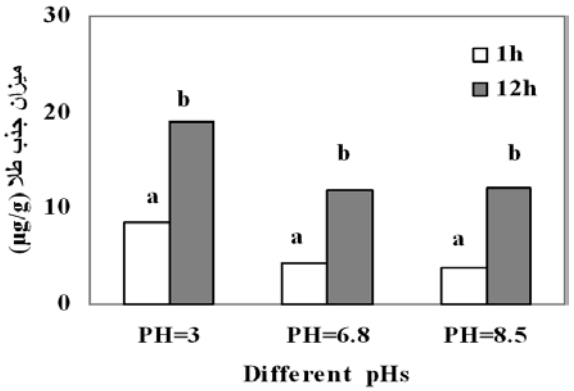
نتایج

نتایج نشان مي دهد که همه اجزاي پلي ساکاریدي دیواره در تمام pHهاي به کار رفته قابلیت جذب طلا را دارند. میانگین نتایج حاصل از GFAAS نشان داد که سلولز (شکل ۱) و پکتین (شکل ۲) و همي سلولز A (شکل ۳) در ۳ pH و زمان۱۲ ساعت مقدار طلاي بیشتري جذب کردند. این اجزاي پلي‌ساکاریدي در دیگر pH ها نیز در مدت زمان۱۲ ساعت نسبت به ۱ ساعت مقدار بیشتري طلا جذب کردند و تفاوت مقدار جذب طلا در دو زمان مختلف، بجز۶/۸ pH براي سلولز، معني دار بود. تفاوت مقدار جذب طلا بوسیله سلولز پس از ۱۲ ساعت گر چه بسیار کم اما معني دار بود.

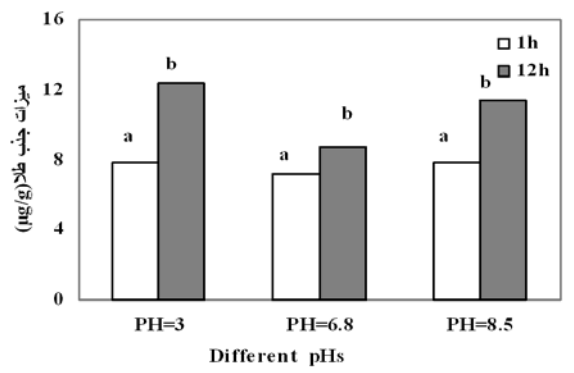


شکل ۱ - میزان جذب طلا بوسیله سلولز در زمانهـا و pH-هاي متفاوت. حروف غیریکسان درهرستون نماینده تفاوت معني‌دار درسطح p<۰/۰۰۱ مي‌باشد. داده‌ها نماینـده سـه تکرار مي‌باشند. SD به دلیل کوچـک بـودن، نمـایش داده نشده است.

همان‌گونه که درشکلها دیده مي‌شود، بیشترین مقدار طلاي جذب شده توسط همي‌سلولز B در pH ۸/۵ و مدت زمان یك سـاعت و در دیگر pH ها نیز بیشترین مقدار جذب طلا در مدت زمان یـك ساعت بود (شکل ٤).



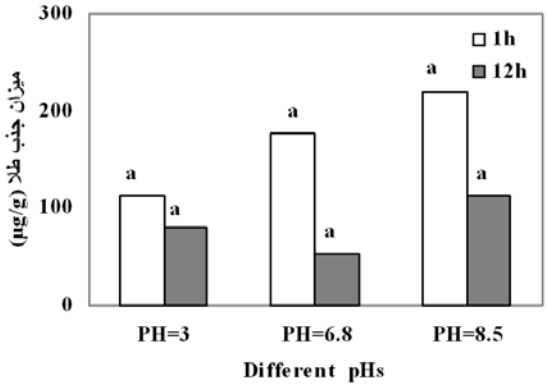
شکل۲- میزان جذب‌طلا بوسیله پکتـین در زمانهـا و pH-هاي متفاوت. حروف غیریکسان در هرستون نماینده تفاوت معني‌دار درسطح p<۰/۰۰۱ مي‌باشد. داده‌ها نماینـده سـه تکرار مي‌باشند. SD به‌دلیل کوچک‌بودن، نمایش‌داده نشده است.



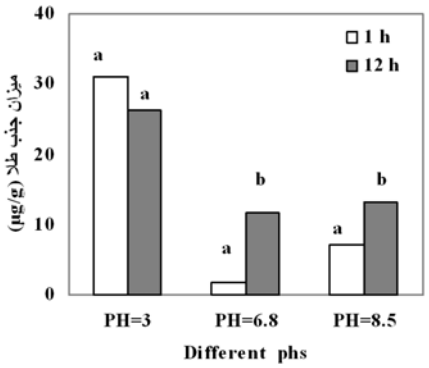
شکل۳ - میزان جذب طلا بوسیله همي سلولز A در زمانها و pH هاي متفاوت. حروف غیریکسان درهرستون نماینده تفاوت معني‌دار درسطح p<۰/۰۰۱ مي‌باشد. داده‌ها نماینده سه تکرار مي‌باشند. SD به دلیل کوچک بودن، نمایش داده نشده است.

گرچه تفاوت مقدار جذب طلا در دو زمان مختلف، معني دار نبود اماکاهش میزان طلاي جذب شده بوسیله همي- سلولز پس از۱۲ ساعت درمقایسه با ۱ساعت (شکل ٤) نشان داد که بخشي از جذب طلا بوسیله همي‌سلولز به صورت سطحي و فیزیکي است که با گذشت زمان سست شده و به محیط پس‌داده مي‌شود.

با توجه به شکل ۵ بهترین pH و زمان به منظور جذب بیشتر طلا توسط ماده زمینه اي پلي ساکاریدي pH برابر ۳ و زمان یك ساعت بود. در دو pH دیگر با افزایش زمان تیمار به ۱۲ ساعت، میزان جذب در سطح معني داري نسبت به ۱ ساعت، افزایش یافت.



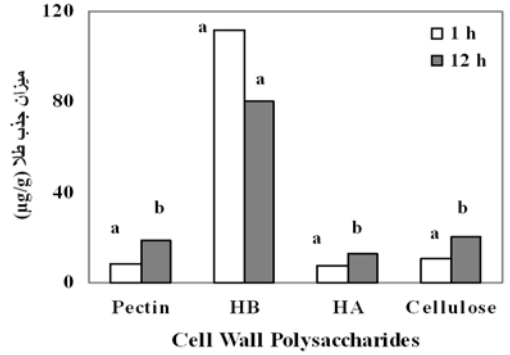
شكل٤- ميزان جذب طلا بوسيله همي‌سلولز B در زمان‌هـا و pH هاي متفاوت. حروف يكسان درهرستون نماينـده غيرمعنـي‌دار بودن داده‌ها مي‌باشد. داده‌ها نماينده سه تكرار مـي‌باشـند.SD به‌دليل كوچك بودن، نمايش داده نشده است.



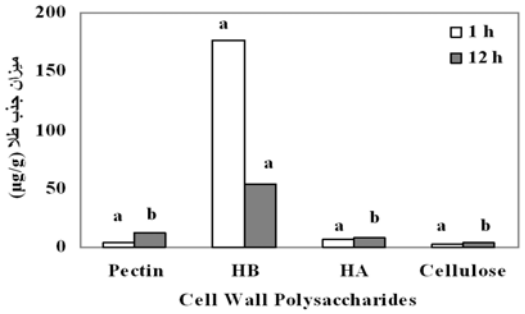
شكل ۵- ميزان جذب طلا بوسيله ماده زمينه‌اي پلي‌سـاكاريدي در زمانها و pH هاي متفاوت. حروف غير يكسـان درهـر سـتون نماينده تفاوت معني‌دار در سـطح p<۰/۰۰۱ مـي‌باشـد. داده‌هـا نماينده سه‌تكرار مي‌باشند. SD به دليل كوچك بـودن، نمـايش داده نشده است.

در pH اسيدي و زمان يك ساعت، همي‌سلولز B درمقايسه با ساير اجزاي پلي‌ساكاريدي ديواره درمقدار بيشتري طلا جذب كرد (شكل ۶). سلولز، پكتين و همي سلولز A در زمان ۱۲ ساعت جذب بيشتري نشان دادند.

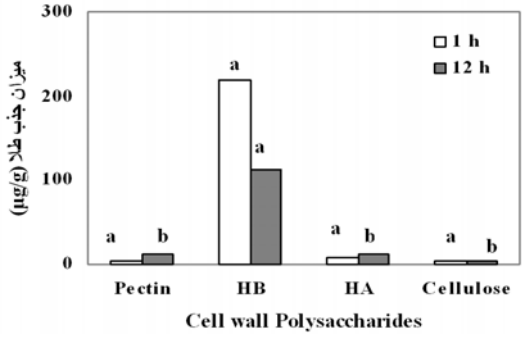
در pH هاي تقريباً خنثي و قليايي، همي سلولزB در زمان يك ساعت در مقايسه با ساير اجزاي پلي ساكاريدي ديواره قادر به جذب مقدار بيشتري طلا بود. ميزان جذب طلا در ساير اجزا در مقايسه با همي سلولز B ناچيز بود (شكلهاي۷ و ۸).



شكل۶- مقايسه اجزاي پلي‌ساكاريدي ديواره از نظر ميزان جذب طلا در ۳ pH . حروف غير يكسـان درهرگـروه نماينـده تفـاوت معني‌دار در سطح p<۰/۰۰۱ مي‌باشد. (داده‌ها نماينده سه تكرار مي‌باشند. SD به دليل كوچك بودن، نمايش داده نشده است).



شكل۷- مقايسه اجزاي پلي‌سـاكاريدي ديـواره از نظـر ميـزان جذب طلا در ۶/۸ pH. حروف غير يكسـان درهرگـروه نماينـده تفاوت معني‌دار درسطح p<۰/۰۰۱ مي‌باشد. (داده‌ها نماينده سـه تكرار مي‌باشند. SD به دليل كوچك بـودن، نمـايش داده نشـده است).



شكل۸- مقايسه اجزاي پلي‌سـاكاريدي ديـواره از نظـر ميـزان جذب طلا در ۸/۵ pH. حروف غير يكسان در هرگـروه نماينـده تفاوت معني‌دار در سطح p<۰/۰۰۱ مي‌باشد. (داده‌ها نماينده سه تكرار مي‌باشند. SD به دليل كوچك بـودن، نمـايش داده نشـده است).

بحث

در تحقيقات متعدد پيشنهاد شده استكه ديواره يكي از مكانهاي اصلي سميت زدايي فلزات سنگين و اولين بخش سلول گياهي است كه با فلزات اتصال برقرار مي‌كند (Schomhl 2000 Matsumoto 2000). نتايج حاصل از تحقيق حاضر نشان داد كه ماتريس پلي ساكاريدي و همه اجزاي پلي ساكاريدي آن (پكتين، همي سلولز و سلولز) داراي جايگاههاي جذب براي ايجاد پيوند با طلا مي‌باشند. اين اجزا در تمام pH ها و زمان ها قادر به جذب طلا بودند. سلولز در pH اسيدي و مدت زمان ۱۲ ساعت مقدار بيشتري طلا جذب كرد (شكل ۱). با توجه به ساختار سلولز و واحدهاي تشكيل دهنده آن، به نظر مي‌رسد كه جايگاههاي جذب در سلولز، گروههاي هيدروكسيلي موجود بر روي گلوكز باشد كه با افزايش زمان تيمار، بيشتر اين جايگاهها اشغال مي‌شوند. احتمالاً از يك طرف پروتون‌دار شدن و در نتيجه، مثبت شدن بار الكتريكي عوامل هيدروكسيلي سلولز در pH اسيدي (برهم كنش‌هاي الكتروستاتيك بين بار هاي ناهمنام) و از طرف ديگر وجود زوج الكترون‌هاي آزاد اكسيژن و خالي يا نيمه پربودن اربيتال‌هاي طلا، باعث كوردينه شدن اكسيژن با طلا (ايجاد پيوند داتيو) در اين pH و سبب جذب بيشتر طلا شده است (Gamez 2000). پكتين نيز در شرايط *in vitro* قادر به جذب طلا بود (شكل ۲) و در pH اسيدي در مقايسه با pH هاي ديگر مقدار بيشتري طلا جذب كرد. در مدت زمان يك ساعت نيز تمام جايگاههاي جذب پكتين اشغال نشده است، لذا در تمام pHها با افزايش زمان تيمار مقدار بيشتري طلا جذب كرد. با توجه به جدول۱، پكتين عمدتاً متشكل از اسيدهاي يورونيك بوده، بنابراين احتمالاً گروههاي كربوكسيلي آن در جذب و اتصال با طلا نقش اصلي را ايفا كرده‌اند.

با توجه به شكل ۳ همي سلولز A نيز در شرايط *in vitro* قادر به جذب طلا بود و مشابه پكتين و سلولز در pH اسيدي و زمان ۱۲ ساعت مقدار بيشتري طلا جذب كرد. همي سلولز A از نظر ساختاري مقدار بيشتري زايلان دارد و اسيدي است. طبق جدول۱، مقدار اسيدهاي يورونيك موجود در آن بيشتر از قندهاي خنثي است، بنابراين شبيه پكتين احتمالاً اكثر جايگاههاي جذب آن گروههاي كربوكسيلي بوده است. با توجه به نتايج بدست آمده ميزان جذب و اتصال با طلا در همه اجزاي پلي ساكاريدي به دو عامل pH و زمان بستگي داشت و براي همه اجزا به جز همي سلولز B، pH اسيدي و زمان ۱۲ ساعت مناسب تر بود.

مطابق شكل ۴ همي سلولز B قادر به جذب مقدار زيادي طلا بود. جذب طلا در pH ۸/۵ و زمان يك ساعت بيشتر بود. كاهش مقدار جذب طلا با افزايش زمان تيمار احتمالاً به دليل اتصالات سست و فيزيكي بوده كه با افزايش زمان تيمار مقداري از طلا به محلول پس داده شده است. با توجه به جدول۱ اكثر جايگاههاي جذب همي سلولزB ، گروههاي هيدروكسيلي و به مقدار اندك گروههاي كربوكسيلي است.

اتصال طلا به اجزاي پلي ساكاريدي اتصال كاملاً فيزيكي نيست، زيرا بخشي از طلا پس از شستشو و سانتريفوژ اجزاي پلي ساكاريدي در آن باقي مي‌ماند. اين اتصال به واسطه فرايندهاي زيستي (آنزيمي) نيز نبوده بلكه احتمالاً به دليل اتصال شيميايي طلا به گروههاي عملكردي (CHOH, COH، COOH و COOCH3) اجزاي پلي ساكاريدي بوده است (Gardea-Torresdey *et al.* 2002). بنابراين با توجه به نتايج، بين طلا و جايگاههاي جذب اجزاي پلي ساكاريدي پيوند برقرار شده است و احتمالاً طلا تحت دو عامل برهم كنش‌هاي الكتروستاتيك و كورديناسيون جذب شده است. بررسي دقيق جايگاههاي اتصال و برقراري پيوندها بين مواد پلي ساكاريدي ديواره سلولي با طلا به روشهاي متفاوت از جمله متيلاسيون عوامل كربوكسيلي يااشباع سازي عوامل هيدروكسيلي و نيز چگونگي كاهش ميزان جذب طلا بوسيله همي سلولز B با افزايش زمان نياز به پژوهشهاي تكميلي دارد.

جدول۱- مقايسه ميزان قند خنثي و يورونيک اسيد در برخي از اجزاي ديواره.

(UA (µg /ml)	TS/UA	Cell wall Components	TS (µg /ml
Pectin	71.8	370	0.19
HB	77	75.6	1.02
HA	69.4	120	0.58

TS: Total Sugar, UA: Uronic Acid.
HB: Hemicellulose B.
HA: Hemicellulose A

منابع:

Ball Ph. 2002: Fungus with the midas touch. *Chem. Biochem*. **5:** 461-463.

Gamez G., Gardea-Torresdey J.L., Tiemann K.J. 2000: Chemical processes involved in Au (III) binding and bioreduction by Alfalfa biomass. Proceeding of the 10th Conference on Hazardous Waste Rersearch, pp: 41-46.

Garbisu C., Alkorta I. 2001: Phytoextraction: a cost-effective plant- based technology for the removal of metal from the environment. *Biores. Tech*. **77:** 229-236.

Gardea-Torresdey J.L., Tiemann K.J., Gonzalez J.H., 2000: Ability of *Medicago sativa* (alfalfa) to remove nickel ions from aqueous solution. Proceeding of the 10th Conference on Hazardous Waste Rersearch, pp: 239-248.

Gardea-Torresdey J.L., Cano-Aguilera I., Webb R. 1996: Copper adsorption by inactivated cells *Mucor rouxii*: effect of estrification of carboxyl group. *J. Haz. Mat.* **48:** 171-180.

Gardea-Torresdey J.L., Tiemann K.J., Parsons J.G. 2002: Characterization of trace level Au (III) Characterization of trace level Au (III) binding to alfalfa biomass (*Medicago sativa*) by GFAAS. *Adv. Environ. Res.* **6:** 313-323.

Ghanati F. 2002: Studies on boron tolerance mechanism of suspension-cultured Tobacco cells. Shizouka University; Japan, PhD dissertation.

Kakagawa K., Edashige Y., Ishii T. 2000: Metabolism of cell wall polysaccharides in cell suspension cultures of *Populus alba* in relation to cell growth. *Physiol. Pl.* **108:** 420-425.

Lasat M.M. 2000: Phytoextraction of metals from contaminated soil: a review of plant/soil/metal interaction and assessment of pertinent Agronomic issues. *J. Haz. Subst. Res.* **2:** 1-25.

Matsumoto H. 2000: Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants. *Int. Rev. Cytol.* **200:** 1-46.

Nishitani K.T.R. 1992: Endoxyloglucan transferase, a novel class of glycosyltransferase that catalyses transfer of a segment of xyloglucan molecule to another xyloglucan molecule. *J. Biol. Chem.* **267:** 21058-21064.

Sakuraii S., Nevins D.J. 1997 Relationship between fruit softening and cell wall polysaccharides in avocado (*Persea americana* Mill.) mesocarp tissues. *Pl. Cell Physiol.* **38:** 603-610.

Sarret G., Manceau A.. Ilazemann J.L. 1998: Structural determination of Zn and Pb binding sites in *Penicillium chrysogenum* cell walls by EXAFS spectroscopy. *Environ. Sci. Technol*. **32:** 1648-1655.

Sastry M., Ahmad A., Khan M.I. 2003: Biosynthesis of metal nanoparticles using fungi and actinomycete. *Curr. Sci.* **85(2):** 162-170.

Schomhl N., Horst W.J. 2000: Cell wall pectin content modulates aluminium sensitivity in *Zea mays* (L.) cells grown in suspension culture. *Pl. Cell Environ.* **23:** 735-742.