

ارزیابی میزان جذب زیستی فلز سنگین منگنز توسط اسپیرولینا پلاتنسیس از پساب های صنعتی و مطالعه ژنتیکی ژنهای جذب کننده فلزات سنگین

الهه تقیان^{۱*}، داریوش نباتی^۲، محمد رعایایی اردکانی^۳

^۱ دانشجوی دکتری ژنتیک و بهنژادی گیاهی، دانشگاه تهران، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، کرج، ایران

^۲ دانشیار گروه اصلاح نباتات، دانشگاه شهید چمران، دانشکده کشاورزی، اهواز، ایران

^۳ استاد گروه زیست شناسی، دانشگاه شهید چمران، دانشکده علوم، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۲۴؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۲/۱۰

چکیده

زمینه و هدف: حذف فلز سنگین منگنز از پساب های صنعتی، برای کارشناسان محیط زیست همواره از موضوعات چالش برانگیز بوده است. مشخص شده است که در تصفیه پساب صنعتی جهت حذف فلزات سنگین می توان از گونه های مختلف ریزجلبک از جمله اسپیرولینا پلاتنسیس بهره گرفت. هدف اصلی این پژوهش کاهش و یا حذف فلز سنگین منگنز از پساب صنعتی کارخانه ها توسط ریزجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس می باشد.

مواد و روش ها: در این تحقیق ۸ نوع پساب صنعتی از کارخانجات مختلف جمع آوری شد و بعد از رسیدن جلبک به فاز لگاریمی مجاورسازی با پساب های صنعتی صورت گرفت. سپس غلظت فلز منگنز، میزان جذب فلز و درصد کارایی پاکسازی ریزجلبک به وسیله سنجش جذب اتمی انجام شد. همچنین، برای توالی یابی نوکلئوتیدی ژن زیر واحد آلفا فیکوسیانین از ریزجلبک اسپیرولینا، آنزیم های برشی طراحی شد. سپس برای تأیید آغازگرها از نرم افزار Clonewin استفاده شد و قطعه مورد نظر به صورت مجازی درون ناقل بیانی قرار گرفت.

یافته ها: نتایج ارزیابی جذب اتمی نشان داد که پس از مجاورسازی اسپیرولینا با پساب های صنعتی به مدت یک ساعت، کاهش معناداری در حجم فلز سنگین منگنز اتفاق افتاد که با افزایش مدت زمان مجاورسازی به میزان ۳ ساعت، جذب زیستی بیشتری توسط اسپیرولینا از پساب های صنعتی صورت گرفت. همچنین نتیجه توالی ژن زیر واحد آلفا فیکوسیانین، ۱۰۰٪ همولوژی با توالی ژن زیر واحد آلفا فیکوسیانین موجود در بانک ژن را نشان داد.

نتیجه گیری: بنابراین، اسپیرولینا پلاتنسیس توانایی جذب فلز منگنز در پساب صنعتی حاصل از کارخانجات را دارد و جهت همسان سازی و بیان ژن های زیر واحد آلفا می توان از ناقل های بیانی متفاوت استفاده کرد.

کلید واژه: اسپیرولینا پلاتنسیس، زیست پالایی، فلز منگنز، پساب

مشکل اساسی، جذب فلزات به وسیله زنجیره غذایی است؛ بنابراین ارزیابی و کنترل غلظت فلزات سنگین در پساب‌های صنعتی، قبل از تخلیه به محیط‌های طبیعی اهمیت ویژه‌ای دارد. در بحث حذف فلزات سنگین از محیط‌های آبی، راهبردهای فیزیکوشیمیایی زیادی مانند فیلتراسیون، جذب سطحی، ترکیب شیمیایی، تصفیه الکتروشیمیایی، اکسیداسیون / احیا، تبادل یون، تکنولوژی غشائی، اسمز معکوس، استخراج با حلال و بازیافت تبخیری توسعه یافته است.^۸ با این حال اکثر این روش‌ها دارای معایبی مانند، نیاز به تجهیزات فنی و سیستم‌های پاشی، مصرف زیاد انرژی، عدم توجیه اقتصادی، کارایی پایین، مشکلات بهره برداری، عدم انتخابی عمل کردن فرایند تصفیه، عدم جداسازی کامل فلزات و برجای گذاشتن باقیمانده‌های آلوده کننده، هستند.^۸ اما در اصلاح زیستی از مواد طبیعی مختلف با منشأ بیولوژیکی مانند باکتری، قارچ، جلبک و مخمر استفاده می‌شود و جایگزین مناسبی برای سایر روش‌ها است.^{۹، ۱۰، ۱۱} تکنیک‌های بیولوژیکی در سمیت‌زدایی نسبت به روش‌های معمول آن‌ها، دارای مزیت‌هایی نیز است؛ مثلاً روش‌های زیستی معمولاً برای محیط زیست خطری ندارند و باعث ایجاد آلودگی نمی‌شوند. همچنین می‌توان فعالیت‌های زیستی را در محل آلودگی^۲ انجام داد و علاوه بر این‌ها، مقرون به صرفه نیز هستند و کار به صورت ۲۴ ساعته صورت می‌گیرد.^{۱۲، ۱۳} بنابراین، با توجه به به موارد مذکور، هدف از انجام این پژوهش، بررسی میزان جذب زیستی فلز سنگین منگنز توسط ریزجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس برای افزایش کارایی و استفاده مجدد از پساب‌های آلوده کارخانه‌جات صنعتی است. همچنین، هدف دیگر این پژوهش، مطالعه ژنتیکی ژن‌های جذب کننده فلزات سنگین در این ریزجلبک می‌باشد.

مقدمه

اسپیرولینا پلاتنسیس^۱، نوعی جلبک سبزآبی از خانواده سیانوباکترها است. این جلبک به صورت مارپیچ و منظم در زیر میکروسکوپ دیده می‌شود.^{۱، ۲} و از ابتدایی‌ترین اشکال حیات بر روی کره زمین به شمار می‌رود. فلزات سنگین، از آلاینده‌های زیست‌محیطی هستند که مواجهه انسان با بعضی از آن‌ها از طریق آب و مواد غذایی، می‌تواند مسمومیت‌های مزمن و بعضاً حاد خطرناکی را ایجاد نمایند؛ که از جمله آنها می‌توان به فلزاتی نظیر سرب، کادمیوم، جیوه، نیکل، منگنز و روی اشاره کرد.^{۳، ۴} منگنز یک ترکیب شیمیایی معمول است که در تمام قسمت‌های کره زمین یافت می‌شود و سومین عنصر شیمیایی از لحاظ سمی بودن به حساب می‌آید. بنابراین، از طرفی، مقدار اندک منگنز برای بقای انسان مورد نیاز است و از طرف دیگر، زمانی که غلظت منگنز از حد معمول خود تجاوز کند و بالا برود، موجب بروز مشکلاتی برای دستگاه تنفسی و مغز می‌شود. علائم مسمومیت با منگنز شامل توهم، فراموشی و آسیب‌های عصبی است. همچنین، مسمومیت منگنز باعث بروز بیماری پارکینسون، مشکلات ریه و برونشیت می‌شود.^۵ فعالیت‌های کشاورزی و صنعتی منجر به آزادسازی مقادیر بالایی از فلزات سنگین به محیط می‌شود. این موضوع می‌تواند به عنوان خطری جدی برای سلامتی اکوسیستم و انسان مطرح باشد.^۶ آلودگی هوا، آب‌های زیرزمینی و سطحی با فلزات سمی، یک مشکل جدی و جهانی محسوب می‌شود. در رابطه با ارزیابی خطر آب‌های آلوده با فلزات سنگین،

^۲. in situ

^۱. *Spirulina platensis*

مختلف منگنز تهیه شد و به محیط کشت افزوده گردید. بعد از تلقیح محیط های حاوی محلول فلزی در شرایط رشد استاندارد برای ریزجلبک شامل دمای ۲۷ درجه سانتیگراد، دور شیکر rpm ۱۵۰ و ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در انکوباتور قرار گرفتند. در پایان دوره ۱۵-۱۰ روزه، بر اساس نتایج حاصل از مقدار رشد ریزجلبک و جداسازی نمونه های رشد نیافته در غلظت های بالا و کشت مجدد آن ها در محیط فاقد استرس فلز در محیط کشت زاروک داری آگار (محیط جامد) قرار گرفتند و بعد از سنجش مقدار رشد نمونه ها در دوره ۸ تا ۱۰ روزه، مقدار دو فاکتور حداقل غلظت مهار و حداقل غلظت کشندگی تعیین گردید. لازم به ذکر است که همه تیمارها دارای ۳ تکرار بودند ۱۵، ۱۶، ۱۷، ۱۸، ۱۹، ۲۰.

تهیه نمونه برای سنجش جذب اتمی فلز

در ابتدا بعد از رسیدن جلبک به فاز لگاریتمی، حجم مشخصی از ریزجلبک های کشت داده شده را از محیط کشت جدا کردیم. این کار را با ریختن حجمی از محیط کشت درون فالكون و سانتریفیوژ کردن آن، انجام می شد. بعد از سانتریفیوژ، جلبک در ته فالكون رسوب می داد و با جداسازی مایع به حجم ۰/۳ گرم از وزن تر جلبک ها درون میکروتیوب قرار داده می شد و آن ها به مدت ۲۴ ساعت درون یخچال قرار می گرفتند تا مایع رویی به خوبی از جلبک جدا گردد. سپس جلبک ها به پساب های حاوی محلول های فلزی به حجم cc ۳۰ که از قبل ساخته و رقیق شده بودند، اضافه شده و به مدت ۱ ساعت و ۳ ساعت بر روی شیکر با دور rpm ۱۵۰ و در دمای ۳۲ درجه سانتیگراد قرار می گرفتند. بعد از گذشت زمان مذکور، عمل جداسازی مجدد ریزجلبک از محلول فلزی نمونه ها، توسط سرنگ و فیلتر ۰/۲۲ میکرون صورت می پذیرفت و نمونه های جداسازی شده برای کدگذاری و ارسال به شرکت زاگرس آبشناس فارس، شهر شیراز برای سنجش میزان جذب اتمی صورت گرفته، آماده می شدند ۲۱، ۲۲، ۲۳، ۲۴، ۲۵.

مواد و روش کار

کشت و نحوه نمونه برداری ریزجلبک اسپیرولینا

پلاتنسیس

ریز جلبک اسپیرولینا به عنوان منبع اولیه برای تلقیح، کشت و تکثیر، از مرکز تحقیقات میگو (بوشهر) خریداری گردید و از آن در کل مسیر پژوهش تکثیر و نگهداری به عمل آمد. کشت ریزجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس به منظور تکثیر از آن در این آزمایش، دمای ۲۷ درجه سانتیگراد و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دور شیکر rpm ۱۵۰ و غلظت PH ۸/۵ طراحی شده است و در محیطی کاملاً ایزوله و زیر هود و در کنار شعله، صورت می گرفت. مقدار حجم مایع تلقیح کننده شامل ۱٪ از حجم محیط کشت زاروک ۳ در نظر گرفته شده بود. بعد از تهیه محیط کشت در تاریخ های مشخص، اولین نمونه گیری ۲۴ ساعت بعد از تلقیح صورت می پذیرفت و سایر نمونه گیری ها هر ۴۸ ساعت یک بار تکرار می شد و داده های بدست آمده جمع آوری و مورد تجزیه و تحلیل قرار می گرفت. در هر نوبت از نمونه برداری، همه نمونه ها به زیر هود منتقل و در کنار شعله برای جلوگیری از آلوده شدن نمونه ها، از محیط کشت ریزجلبک حجم cc ۱ برداشت و در میکروتیوب ریخته می شد.

بررسی مقاومت ریزجلبک اسپیرولینا با روش

حداقل غلظت مهاري MIC) و حداقل غلظت

کشندگی MBC)

کشت ریزجلبک اسپیرولینا با کدورت ۰/۵ مک فارلند انجام شد^{۱۴} و محیط زاروک به حجم ۱۰۰ سی سی در ارلن هایی به حجم ۲۰۰ سی سی ساخته شد و نمونه هایی از غلظت های

^۲ . Zarrouk

^۴ . Minimum Inhibitory Concentration

^۵ . Minimum Bacteriocidal Concentration

دهد، معرف حداکثر میزان جذب فلز توسط جلبک می باشد^{۲۶}
۲۷، ۳۰، ۳۱، ۳۲.

استخراج توالی ژن های زیر واحد آلفا

فیکوسیاینین از بانک ژن

توالی نوکلئوتیدی ژن زیر واحد آلفا فیکوسیاینین ۷ با شماره دسترسی AY804216.1 از بانک ژن استخراج گردید.

به منظور همسانه سازی ژن های زیر واحد آلفا به طور جداگانه در ناقل بیانی، در آغازگرها محل های برشی آنزیم های NdeI و NotI برای برش طراحی شد. سپس در برنامه نرم افزاری اولیگوآنالایزر^۸ و بلاست^۹ بررسی شده و از اختصاصی بودن اتصال آغازگرهای طراحی شده اطمینان حاصل گردید و در نهایت جهت تأیید عمل آغازگرها از نرم افزار کلون وین^{۱۰} جهت انجام همسانه سازی مجازی استفاده شد و قطعه مورد نظر به صورت مجازی در داخل ناقل بیانی قرار گرفت. آغازگرهای طراحی شده از طریق شرکت تکاپوزیست تهیه شدند.

استخراج ژنوم

اسپیرولینا پلاتنسیس در محیط اختصاصی زاروک کشت داده شد و در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد با دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی انکوبه شد. پس از رسیدن به مرحله رشد لگاریتمی جهت استخراج ژنوم توده سلولی با سانتریفیوژ جمع آوری و سپس به میکروتیوب حاوی این توده ۴۰۰ میکرولیتر بافر استخراج، افزوده شد. نمونه به مدت ۱۵ دقیقه در فریزر ۷۰- قرار داده شد. پس از آن توده سلولی با استفاده از روش های فیزیکی در بافر استخراج، کاملاً حل شد. سوسپانسیون بدست آمده به مدت ۳۰ دقیقه در دمای

نحوه سنجش میزان جذب فلز و محاسبات

میزان جذب فلز

میزان فلز در فاز رویی حاصل از سانتریفیوژ، به منظور تعیین درصد کاهش غلظت فلز نسبت به محلول اولیه (کارایی پاکسازی) یا (RE %) به کمک دستگاه جذب اتمی ۶ مورد سنجش قرار گرفت و میزان فلز جذب شده به بیومس با کسر فلز مایع رویی از میزان اولیه، محاسبه شد.

پس از رسم منحنی استاندارد و تعیین غلظت فلز در فاز رویی هر یک از نمونه ها، جهت محاسبه میزان جذب فلز توسط بیومس های موجود، از فرمول $q = V(C_i - C_f) / S$ استفاده شد. پارامتر q معرف میزان جذب فلز توسط بیومس است که با واحد میلی گرم فلز جذب شده در هر گرم وزن خشک جلبک (mg/gdw) گزارش می گردد. پارامتر V معرف حجم محلول مجاور سازی بر حسب لیتر، C_i غلظت اولیه محلول فلزی بر حسب mg/l، C_f غلظت فلز پس از مجاور سازی بر حسب mg/l و پارامتر S، وزن خشک بیومس با واحد گرم است. وزن خشک جلبک ها با قرار دادن آن ها در آون ۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت بدست آمده است^{۲۶، ۲۷، ۲۸، ۲۹}.

محاسبه درصد کارایی فلز

میزان فلز در فاز رویی حاصل از سانتریفیوژ، به منظور پس از تعیین غلظت فلز در فاز رویی هر یک از نمونه ها، جهت محاسبه میزان کارایی پاکسازی فلز توسط بیومس های موجود، از فرمول $RE = (C_i - C_f) \times 100 / C_i$ استفاده شد که در آن پارامتر C_i معرف غلظت اولیه ی محلول فلزی بر حسب mg/l است و C_f غلظت فلز پس از مجاور سازی بر حسب mg/l را نشان می دهد. بدین ترتیب نمونه ای که حداکثر کاهش درصد غلظت فلزی را در محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ نشان می

^۷ . Alpha-phycoyanin

^۸ . Oligoanalyzer

^۹ . BLAST

^{۱۰} . Clonewin

^۶ . A.A.S

یک ژنوم بزرگ را که قابل دستیابی و دستورزی است، به صورت انبوه تکثیر و تولید نمود. عواملی که در یک واکنش PCR موثرند عبارتند از: آنزیم پلیمرازی، یون Mg^{+2} ، DNA الگو، آغازگرهای اختصاصی، dNTP و دستگاه ترموسایکلر^{۳۴}.

۶۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. پس از این مدت نمونه کاملاً یکنواخت گردید. در این مرحله استخراج با کلروفرم با حجمی برابر با حجم نمونه صورت گرفت. استخراج با کلروفرم بیش از یکبار انجام شد. پس از افزودن کلروفرم ۱۱، نمونه به آرامی مخلوط شده و ۶ دقیقه در دور ۶۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. فاز آبی به میکروتیوب جدید منتقل شد و حجم برابر آن ایزوپروپانول^{۱۲} به آن افزوده شد. توده DNA در این مرحله رسوب نمود. این توده با سانتریفیوژ در دور ۱۲۰۰۰ و به مدت ۵ دقیقه جمع آوری شد. مایع رویی دور ریخته شد و به توده ژنوم ۴۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل افزوده شد. سپس به ترتیب به میزان ۰/۱ حجم، استات سدیم ۳ مولار و ۲ برابر حجم اتانل به نمونه اضافه گردید. رسوب DNA با سانتریفیوژ دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه جمع آوری و سپس در زیر هود خشک شد. DNA استخراج شده در ۲۰۰ میکرولیتر بافر TE حل شد^{۳۳}. کمیت و کیفیت با استفاده از دستگاه نانودراپ^{۱۳} والکتروفورز^{۱۴}، ۱ میکرولیتر از آن بر روی ژل آگارز مورد ارزیابی قرار گرفت. نگهداری ژنوم در فریزر ۲۰- صورت پذیرفت. همچنین از ژنوم استخراج شده به عنوان الگو در PCR استفاده شد.

تکثیر ژن زیرواحد آلفا فیکوسیاینین به روش

PCR

واکنش زنجیره ای پلیمراز، سنتز نمائی قسمت معینی از DNA را با استفاده از دو قطعه کوچک DNA (آغازگرها یا الیگونوکلوئوتیدها) که به طور اختصاصی طراحی شده اند، امکان پذیر می کند^{۳۴}. این واکنش کاملاً اختصاصی است و این ویژگی توسط اتصال صحیح آغازگرها به ناحیه خاصی از DNA الگو تعیین می گردد. بنابراین می توان قطعه کوچکی از

^{۱۱}. chloroform

^{۱۲}. Isopropanol

^{۱۳}. Nanodrop

^{۱۴}. Electrophoresis

^{۱۵}. Thermocycler

جدول ۱- اجزا مخلوط واکنش PCR در نمونه ۲۵ میکرولیتری

مواد مورد نیاز	غلظت نهایی در حجم ۲۵ (میکرولیتر)	حجم مورد استفاده در واکنش (میکرولیتر)
بافر PCR (۱۰X)	۱X	۲/۵
(۵۰ mM) MgCl ₂	۱/۵ میلی مولار	۰/۷۵
dNTPs (۱۰ mM)	۰/۲ میلی مولار	۰/۵
آغازگر رفت (۱۰ μM)	۰/۴ میکرومولار	۱
آغازگر برگشت (۱۰ μM)	۰/۴ میکرومولار	۱
DNA پلیمراز Taq (۵ u/μl)	۱/۵ واحد	۰/۳
DNA الگو	۱۰۰ نانوگرم	۰/۵
آب مقطر دیونیزه استریل	-	۱۸/۴۵

mM = milli Molar , μM = micromolar , μl = microlitres , u/μl = unit per μl

تجزیه تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل نتایج در تمام مراحل بوسیله نرم افزار اکسل برای بدست آوردن میانگین داده‌ها و رسم نمودار و از نرم افزار اس پی اس اس^{۱۶} به منظور بررسی سطح معنی داری داده‌ها استفاده شد.

نتایج

بررسی مقاومت بر اساس حداقل غلظت

مهارى و حداقل غلظت کشندگی

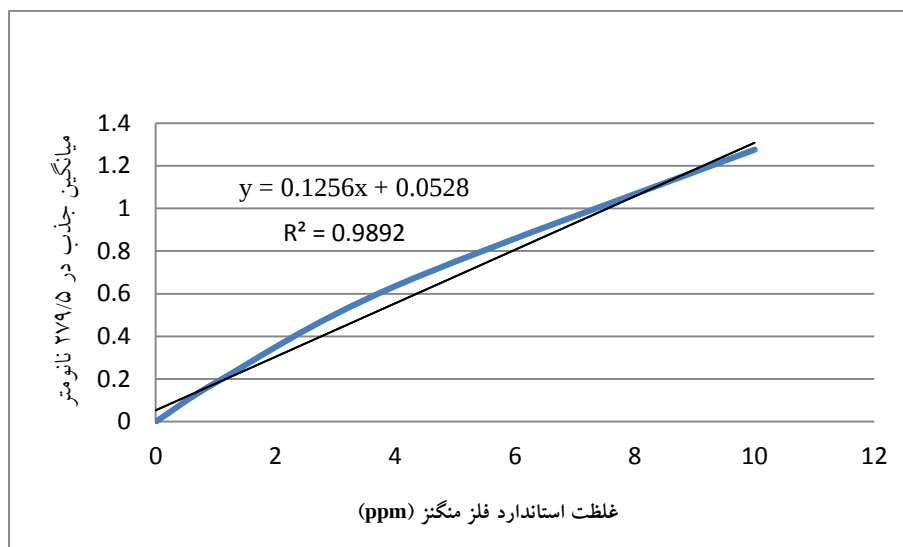
در این بخش از آزمایش، به وسیله نمک کلرید منگنز^{۱۷} محلول‌های فلزی با غلظت‌های ۳۲، ۱۶، ۸، ۴، ۲ و ۰/۵ تهیه شد و به محیط‌های کشت زاروک اضافه گردید. لازم به ذکر است که در این بخش به دلیل این که غلظت‌های حساس از فلز منگنز برای ریزجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس به طور دقیق مشخص گردد در دو مرحله ۶ تیمار غلظتی از فلز منگنز تعریف گردید. با توجه به رشد ریزجلبک در غلظت-های مذکور در یک دوره ۱۵ روزه، ۶ تیمار غلظتی دوم تعیین

رسم منحنی استاندارد جذب فلز

منحنی استاندارد جذب فلز منگنز، پس از تهیه غلظت‌های مناسب خوانش در ۲۷۹/۵ نانومتر رسم گردید. آزمایش سه بار تکرار شد و طبق میانگین‌های به دست آمده، رسم منحنی انجام گرفت و معادله خط $y = 0.1256x + 0.0528$ برای آن به دست آمد. این مقادیر در نمودار ۱ نشان داده شده است.

^{۱۶}. IBM SPSS

^{۱۷}. MNC12



نمودار ۱- منحنی استاندارد جذب فلز منگنز

ریزجلبک نمونه های کدگذاری شده به آزمایشگاه زاگرس آبشناس فارس ارسال گردید. بر این اساس میزان جذب فلز و درصد کارایی پاکسازی ریزجلبک اسپیرولینا در جدول ۲ محاسبه شده است.

نتایج حاصل از بدست آوردن میزان کمی

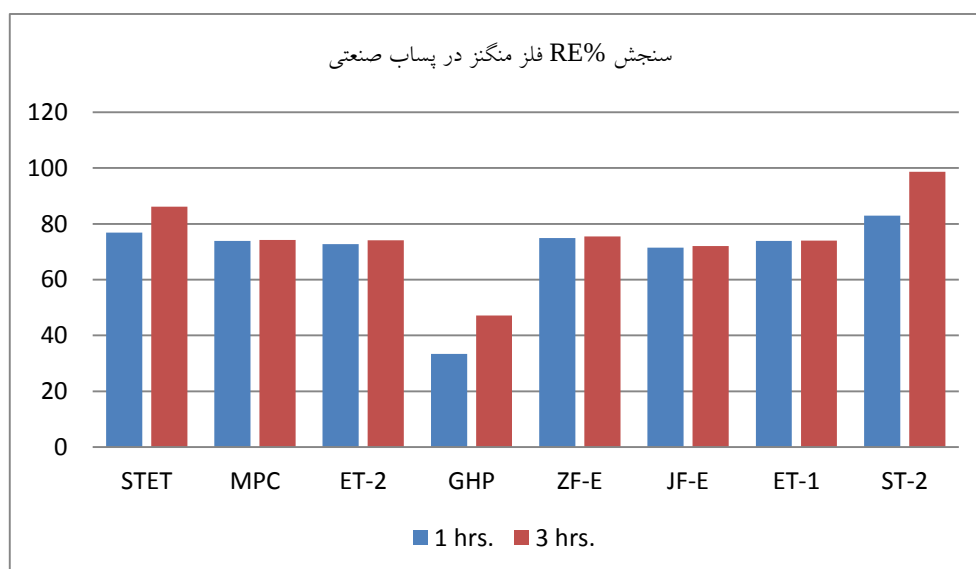
جذب فلز و درصد کارایی پاکسازی

همانطور که نحوه آماده سازی و مجاورسازی ریزجلبک اسپیرولینا با پساب ها بیان شد، بعد از جداسازی پساب ها از

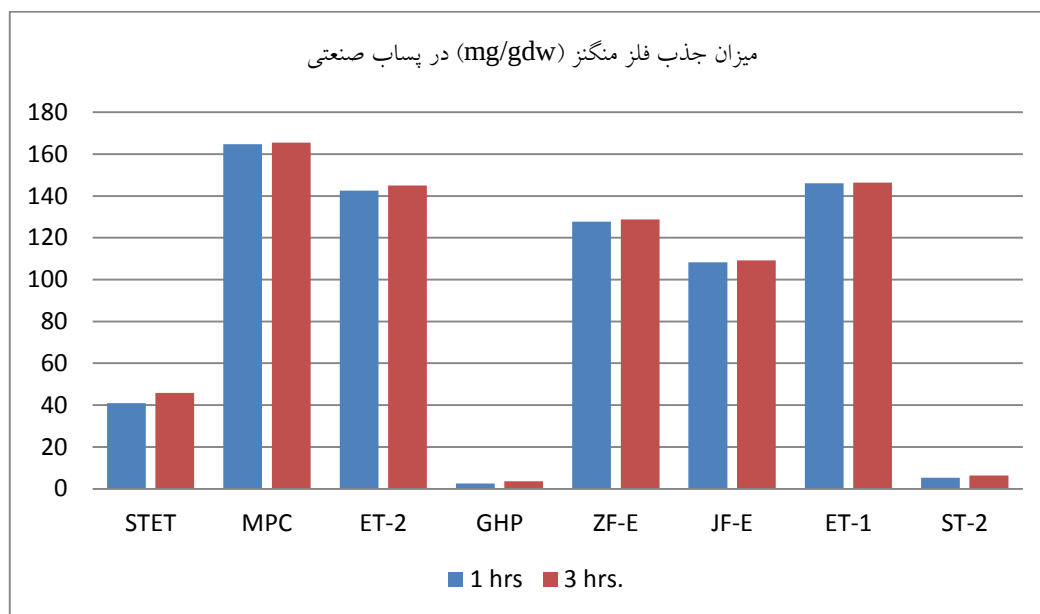
جدول ۲- میزان جذب فلز و درصد کارایی پاکسازی و میزان اولیه فلز منگنز

RE%		s. (mg/gdw)		غلظت نهایی فلز (ppm)		دما (°C)	PH	غلظت اولیه فلز (ppm)	Sample
3 hrs.	1 hrs.	3 hrs.	1 hrs.	3 hrs.	1 hrs.				
۰/۸۶/۷۹۶۱۷	۰/۷۶/۳۷۹۵	۴۶/۲۴۵	۴۰/۶۹۵	۰/۴۶۹	۰/۸۳۹	۲۵ °C	۸/۲۲	۳/۵۵۲	STET
۰/۸۱/۷۵۶۷۶	۰/۷۵/۱۴۰۷۷	۴۳/۵۶	۴۰/۰۳۵	۰/۶۴۸	۰/۸۸۳	۳۵ °C			
۰/۸۹/۷۵۲۲۵	۰/۷۹/۱۶۶۶۷	۴۷/۸۲	۴۲/۱۸	۰/۳۶۴	۰/۷۴	۴۵ °C			
۰/۸۶/۱۰۱۷۳	۰/۷۶/۸۹۵۶۵	۴۵/۸۷۵	۴۰/۹۷	۰/۴۹۳	۰/۸۲	—		میانگین	
۰/۷۳/۷۶۵۰۷	۰/۷۳/۶۷۴۳۹	۱۶۴/۵۶۹۵	۱۶۴/۳۸۹۵	۳/۹۰۲	۳/۹۱۴	۲۵ °C	۶/۳۵	۱۴/۸۷۳۳	MPC
۰/۷۴/۵۵۸۴۴	۰/۷۲/۷۶۳۲۷	۱۶۶/۳۳۹۵	۱۶۲/۳۳۴۵	۳/۷۸۳	۴/۰۵۱	۳۵ °C			
۰/۷۴/۲۱۵۵۴	۰/۷۵/۰۸۹۵۹	۱۶۵/۵۷۴۵	۱۶۷/۵۲۴۵	۳/۸۳۵	۳/۷۰۵	۴۵ °C			
۰/۷۴/۱۷۹۶۸	۰/۷۳/۸۴۵۷۵	۱۶۵/۴۹۴۵	۱۶۴/۷۴۹۵	۰/۸۴۰	۸۹,۳	—		میانگین	
۰/۷۳/۲۰۸۲۷	۰/۷۱/۹۰۶۵۸	۱۴۳/۴۱۵	۱۴۰/۸۶۵	۳/۴۹۹	۳/۶۶۹	۲۵ °C	۶/۸۲	۱۳/۰۶	ET-2
۰/۷۶/۴۲۴۲	۰/۷۰/۵۲۰۶۷	۱۴۹/۷۱۵	۱۳۸/۱۵	۳/۰۷۹	۳/۸۵	۳۵ °C			
۰/۷۲/۵۰۳۸۳	۰/۷۵/۸۴۲۲۷	۱۴۲/۰۳۵	۱۴۸/۵۷۵	۳/۵۹۱	۳/۱۵۵	۴۵ °C			
۰/۷۴/۰۴۵۴۳	۰/۷۲/۷۵۶۵۱	۱۴۵/۰۵۵	۱۴۲/۵۳	۰/۳۸۹	۳/۵۵۸			میانگین	

۲۵ °C	۰/۳۷۸	۰/۳۷۱	۱/۹۸	۲/۰۸۵	٪۲۵/۸۸۲۳۵	٪۲۷/۲۵۴۹	۹/۷۵	۰/۵۱	GHP
۳۵ °C	۰/۲۸۹	۰/۱۹۲	۳/۳۱۵	۷۷,۴	٪۴۳/۳۲۳۳	٪۶۲/۳۵۲۹۴			
۴۵ °C	۰/۳۵۲	۰/۲۴۶	۲/۳۷	۳/۹۶	٪۳۰/۹۸۰۳۹	٪۵۱/۷۶۴۷۱			
-	۰/۳۳۹	۰/۲۶۹	۲/۵۵۵	۳/۶۰۵	٪۳۳/۳۹۸۶۹	٪۴۷/۱۲۴۱۸		میانگین	
۲۵ °C	۲/۹۲۱	۲/۷۸۶	۱۲۶/۷۸۴۹۵	۱۲۸/۸۱	٪۷۴/۳۱۷۱۱	٪۷۵/۵۰۴۱	۸/۱۸	۱۱/۳۷۳۳۳	ZF-E
۳۵ °C	۲/۷۷۲	۲/۶۷۵	۱۲۹/۰۲	۱۳۰/۴۷۵	٪۷۵/۶۲۷۱۹	٪۷۶/۴۸۰۰۶			
۴۵ °C	۲/۸۹	۲/۹۱۱	۱۲۷/۲۵	۱۲۶/۹۳۵	٪۷۴/۵۸۹۶۸	٪۷۴/۴۰۵۰۳			
-	۲/۸۶۱	۲/۷۹۰	۱۲۷/۶۸۵	۱۲۸/۴۷	٪۷۴/۸۴۴۶۶	٪۷۲/۴۶۳۰۶		میانگین	
۲۵ °C	۳/۰۶۹	۲/۸۴۷	۱۰۵/۶۰۴۹۵	۱۰۸/۹۳۵	٪۶۹/۶۴۱۹۱	٪۷۱/۸۳۷۹	۷/۳۴	۱۰/۱۰۹۳۳	JF-E
۳۵ °C	۲/۸۷۵	۲/۷۰۷	۱۰۸/۵۱۵	۱۱۱/۰۳۵	٪۷۱/۵۶۰۹۲	٪۷۳/۲۲۲۷۶			
۴۵ °C	۲/۷۲	۲/۹۲۴	۱۱۰/۸۴	۱۰۷/۷۸	٪۷۳/۰۹۴۱۶	٪۷۱/۰۷۶۲۲			
-	۲/۸۸۸	۲/۸۲۶	۱۰۸/۳۲	۱۰۹/۲۵	٪۷۱/۴۳۲۳۳	٪۷۴/۰۴۵۶۳		میانگین	
۲۵ °C	۳/۳۸	۳/۰۸۳	۱۴۶/۹۴۹۹	۱۵۱/۴۰۴۹	٪۷۴/۳۴۸۵۸	٪۷۶/۶۰۲۵۷	۷/۸۱	۱۳/۱۷۶۶۶	ET-1
۳۵ °C	۳/۳۹۷	۳/۵۲۲	۱۴۶/۶۹۴۹	۱۴۴/۸۱۹۹	٪۷۴/۲۱۹۵۷	٪۷۳/۲۷۰۹۲			
۴۵ °C	۳/۵۵۲	۳/۶۶۱	۱۴۴/۳۶۹۹	۱۴۲/۷۳۴۹	٪۷۳/۰۴۳۲۴	٪۷۲/۲۱۶۰۲			
-	۳/۴۴۳	۳/۴۲۲	۱۴۶/۰۰۴۹	۱۴۶/۳۱۹۹	٪۷۳/۸۷۰۴۶	٪۷۴/۰۲۹۸۴		میانگین	
۲۵ °C	۰/۰۱۳	۰	۶/۲۱۹۹۹	۶/۴۱۴۹۹	٪۹۶/۹۶۰۲۴	٪۱۰۰	۱۰/۹۲	۰/۴۲۷۶۶۶	ST-2
۳۵ °C	۰/۰۵۵	۰/۰۱۳	۵/۵۸۹۹۹	۶/۲۱۴۹۹	٪۸۷/۱۳۹۵	٪۹۶/۹۶۰۲۴			
۴۵ °C	۰/۱۵۱	۰/۰۰۵	۴/۱۴۹۹۹	۶/۳۳۴۹۹	٪/۶۴/۶۹۲۰۷	٪۹۸/۸۳۰۸۶			
-	۰/۰۷۳	۰/۰۰۶	۵/۳۱۹۹۹	۶/۳۲۴۹۹	٪۸۲/۹۳۰۶	٪۹۸/۵۹۷۰۴		میانگین	



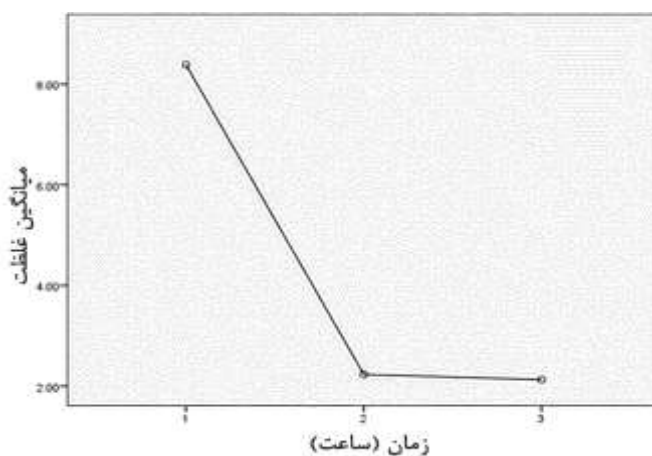
نمودار ۲- نمودار سنجش RE% فلز منگنز در پساب صنعتی



نمودار ۳- نمودار میزان جذب فلز منگنز در پساب صنعتی

جدول ۳- بررسی معنی داری داده های حاصل از غلظت فلز منگنز در زمان های مختلف (۰hrs، ۱hrs، ۳hrs) در پساب صنعتی

ارزش p	درجه آزادی	t	تفاوت دو گروه همبسته					زمان
			بازه اطمینان ۹۵٪		بازه اطمینان ۹۵٪	انحراف استاندارد	میانگین	
			بالا تر	پایین تر				
۰/۰۰۱	۲۳	۷/۱۷۲	۷/۹۲۵	۴/۳۷۶	۰/۸۵۸	۴/۲۰۱	۶/۱۵۱	زمان ۰ تا ۱
۰/۰۴۱	۲۳	۲/۱۶۸	۰/۲۰۴	۰/۰۰۵	۰/۰۴۸	۰/۲۳۶	۰/۱۰۴	زمان ۱ تا ۳

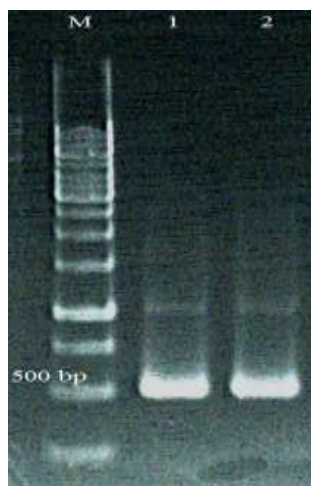


نمودار ۴- نمودار بررسی تفاوت غلظت فلز منگنز در ۳ زمان مختلف (۰hrs، ۱hrs، ۳hrs)

تکثیر ژن زیرواحد آلفا فیکوسیانیین

ژن زیرواحد آلفا فیکوسیانیین با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده و ژنوم استخراج شده به عنوان الگو تکثیر گردید. جهت تکثیر قطعه مورد نظر، با توجه به گرادیان دمایی استفاده شده در واکنش PCR، دمای بهینه ۶۴ درجه

سانتیگراد جهت اتصال آغازگر ژن زیرواحد آلفا فیکوسیانیین به رشته الگو بدست آمد. با توجه به توالی آنکور در پرایمر همان طور که انتظار می رفت، قطعه تکثیر یافته حدود ۵۱۳ جفت باز طول داشت.



تصویر ۱- محصول PCR ژن زیرواحد آلفا، چاهک M: نشانگر مولکولی ۱ Kb، چاهک ۱ و ۲: محصول حاصل از تکثیر ژن زیرواحد آلفا فیکوسیانیین

تعیین توالی

جهت تأیید نهایی، ژن زیرواحد آلفا فیکوسیانیین تعیین توالی شد. نتیجه تعیین توالی پس از هم ردیفی با توالی ژن زیر واحد آلفا فیکوسیانیین توسط نرم افزار مگافورپس از بلاست ۱۰۰٪ همولوژی با توالی ژن زیرواحد آلفا فیکوسیانیین موجود در بانک ژن را نشان داد.

بحث

یکی از مهم ترین و خطرناک ترین تهدیدهای زیست محیطی، آلودگی های ناشی از یون های فلزات سنگین موجود در پساب های واحدهای صنعتی می باشد. در بسیاری از کشورهای جهان سوم و همچنین کشورهای در حال توسعه، کنترل مناسبی بر سیستم های خروجی پساب کارخانجات، صورت نمی گیرد. همین امر به آلودگی های حاد و مزمن زیستی اعم از جمعیت

گیاهی، حیوانی و انسانی منجر می شود^{۳۵}. همچنین، در صورت حذف آلاینده های فلزی از پساب های صنعتی، می توان آب حاصل را مجدداً در چرخه کشاورزی و یا صنعتی به کار گرفت. بدین ترتیب، علاوه بر کاهش آلودگی های زیست محیطی، می توان در مصرف آب نیز صرفه جویی کرد. سال هاست که روش های متعددی از جمله رسوب دادن شیمیایی، تعویض یونی، تقطیر، استخراج با حلال، جذب سطحی آهک زنی، کاربرد صافی های شنی و کربنی و... جهت تصفیه آب به کار گرفته می شوند. تصفیه بیولوژیکی یکی از روش های استاندارد و قابل قبول در سطح جهان است که در جهت استفاده مجدد و بازیافت پساب های صنعتی از آن استفاده می شود. روش های ذکر شده در بالا در مقایسه با روش های تصفیه بیولوژیکی بسیار گران هستند. در این راستا، پژوهشگران به بررسی تصفیه بیولوژیکی فاضلاب ها توسط باکتری ها،

قارچ ها، تک سلولی ها، جلبک ها و پروتوزوآها برای تبدیل پساب های صنعتی به حالتی بی ضرر پرداخته اند و البته اخیراً جلبک ها به علت توانایی بالا در تصفیه پساب ها بیشتر مورد توجه قرار گرفته اند.^{۳۷} به همین دلیل این پژوهش در راستای کمک به محیط زیست و حذف فلزات سنگین توسط ریزجلبک اسپیرولینا برای ادامه حیات بشر و همه موجودات زنده و افزایش کیفیت آب های این کره خاکی، طراحی شده است.

بررسی مقاومت با روش حداقل غلظت مهاري

و حداقل غلظت کشندگی

حداقل غلظت مهاري به عنوان کمترین غلظت فلز در محیط است که از رشد میکروارگانیسم جلوگیری می کند و حداقل غلظت کشندگی به عنوان کمترین غلظت فلز در محیط است که باعث از بین رفتن میکروارگانیسم می گردد.^{۳۸، ۳۹} در این بخش از آزمایش، برای تعیین مقدار غلظت های فلز منگنز به عنوان تیمارهای اعمالی برای تعیین مقدار MIC و MBC در دو مرحله اجرا گردید. در مرحله اول غلظت های ۳۲، ۱۶، ۸، ۴، ۲ و ۰/۰۵ از فلز منگنز هر کدام به ۱۰۰ سی سی از محیط کشت زاروک اعمال شد و بعد از تلقیح با ۰/۵ مک فارلند از ریزجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد، دور شیکر ۱۵۰ rpm، PH ۸/۸ و دوره ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و در ۳ تکرار قرار داده شدند. بعد از یک دوره ۱۵ روزه مقدار رشد ریزجلبک در مقایسه با محیط شاهد مورد بررسی قرار گرفت. براساس مشاهدات صورت گرفته ریزجلبک اسپیرولینا در محیط های حاوی غلظت های ۰/۵ ppm، ۲ ppm، ۴ ppm، ۸ ppm و ۱۶ از فلز منگنز، به ترتیب از غلظت کم به زیاد، رشد خوبی از خود نشان داد. همچنین در مرحله دوم از همین بخش، غلظت های جدیدی از فلز منگنز، شامل ۳۵ ppm، ۴۵ ppm، ۵۵ ppm، ۶۵ ppm و ۷۵ ppm و ۱۰۰ ppm تعیین گردید

و مجدداً بعد از تلقیح و گذشت یک دوره ۱۵ روزه دیگر، نتایج حاصل شده شامل رشد محیط های حاوی غلظت های ۳۵ ppm، ۴۵ ppm و ۵۵ ppm بود؛ اما در غلظت ۶۵ ppm از فلز منگنز رشدی از ریزجلبک اسپیرولینا مشاهده نشد. سپس محیط هایی که فاقد رشد بودند، یعنی غلظت های فلزی ۶۵ ppm، ۷۵ ppm و ۱۰۰ ppm به محیط کشت جامد (محیط کشت زاروک حاوی آگار) انتقال داده شدند تا در یک دوره ۱۰ روزه، میزان رشد ریزجلبک بر غلظت های مذکور، بررسی و ثبت شود. مشاهدات رشدی صورت گرفته، نشان داد که در غلظت ۶۵ ppm از فلز منگنز، ریزجلبک اسپیرولینا رشد کرد ولی در غلظت ۱۰۰ ppm هیچ اثری از رشد ریز - جلبک بر محیط کشت، مشاهده نشد. بر این اساس مقدار MIC برابر با ۶۵ ppm و مقدار MBC برابر با ۱۰۰ ppm برای ریزجلبک اسپیرولینا در محیط کشت حاوی فلز منگنز تعیین شد.^{۴۰}

بررسی شرایط جذب فلز منگنز

بر اساس پژوهش های انجام شده توسط اسماعیلی، بیرامی، روستاییان،^{۴۱} همچنین چوچانکا، و همکارانش^{۴۲} در بررسی جذب فلز توسط جلبک ها به ویژه ریزجلبک اسپیرولینا، می توان اذعان داشت که فاکتورهای مهم برای جذب فلز شامل میزان PH، اثر جرم جاذب، اثر غلظت محلول فلزی و زمان است. که با توجه به مطالعه چوچانکا و همکارانش^{۴۲} در مورد جذب فلزات سنگین توسط ریزجلبک اسپیرولینا، مهم ترین عامل مقدار PH می باشد. براساس نتایج به دست آمده از این پژوهش، به طور چشم گیری می توان میزان کاهش فلز منگنز را در پساب صنعتی، بعد از مجاورسازی با ریزجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس در مدت زمان ۱ ساعت مشاهده نمود. همچنین در بررسی صورت گرفته در مجاورسازی ریزجلبک اسپیرولینا به مدت ۳ ساعت، غلظت فلز منگنز مجدداً کاهش یافته است که این امر نشانگر این

موضوع است که با افزایش مدت زمان مجاورسازی ریزجلبک و پساب حاوی فلز، سهم بیشتری از فلز منگنز در پساب صنعتی کاهش می‌یابد.

بررسی تعیین توالی ژن زیرواحد آلفا فیکوسیانین

علی رغم سادگی استخراج ژنوم از اغلب ارگانیسم‌ها، استخراج ژنوم سیانوباکترها به خصوص اسپیرولینا به دلیل میزان کم DNA نسبت به وزن خشک سلول، غنی بودن از موادی مانند پلی‌ساکاریدها و پلی‌فنل‌ها و دارا بودن اندونوکلاز - های مهم، با مشکلاتی مواجه است^{۳۳}. قلی پور و همکاران^{۳۳} طی بررسی چندین روش استخراج DNA از سیانوباکترها، روش تغییر یافته دوپل^{۱۸} را مناسب معرفی کردند. این روش جهت جداسازی DNA از بافت‌های گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرد که در آن از CTAB به منظور حذف پلی‌ساکاریدها و ماکرومولکول‌ها استفاده می‌شود. از این رو به دلیل استفاده از مواد ارزان قیمت و سادگی روش، در این پژوهش به منظور استخراج DNA اسپیرولینا، از این روش استفاده شد. پس از جداسازی ژن‌های رمزکننده زیرواحد‌های آلفافیکوسیانین با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و ژنوم استخراج شده از اسپیرولینا پلاتنسیس، جهت همسانه‌سازی و بیان ژن‌های زیر واحد آلفا می‌توان از ناقل‌های بیانی متفاوت استفاده کرد. این ناقل‌ها دارای مزیت‌های زیادی بوده و از این رو به فراوانی در انتقال ژن جهت بیان در باکتری اشرشیاکلی مورد استفاده قرار گرفته است. ما در طراحی پرایمرها از توالی‌هایی استفاده کردیم تا بعداً امکان همسانه‌سازی و کلونینگ وجود داشته باشد. این‌ها شامل سایت‌های برشی سازگار با ناقلین بیانی مناسب می‌باشند.

به منظور پیش‌بینی فرآیند شناسایی و تخلیص پروتئینی که در پژوهش‌های آتی تولید خواهد شد، توالی آنزیم‌های

برشی به گونه‌ای انتخاب شد که توالی‌های نشانه^{۱۹} در انتهای ژن زیرواحد آلفا اضافه گردد. انتهای پروتئین حاصل از بیان این ژن در آینده، دارای ۶ اسید آمینه هیستیدین^{۲۰} بوده و توسط آنزیم آنتی‌هیس تگ^{۲۱} از سایر پروتئین‌های باکتریایی قابل جداسازی می‌باشد. در این صورت پروتئین نوترکیب تولید شده بصورت متصل به هیس تگ را می‌توان با گذراندن از ستون‌های کروماتوگرافی ویژه، خالص سازی کرد. این توالی‌ها به دلیل کوچک بودن، تغییری در ساختار بیوشیمیایی پروتئین نوترکیب ایجاد نمی‌کنند.

19 . tag

20 . Histidine

21 . Anti-His tag

18 . Doyle

References

1. Kumar M, Tomar M, Punia S, Dhakane-Lad J, Dhumal S, Changan S, Senapathy M, Berwal MK, Sampathrajan V, Sayed AA, Chandran D. Plant-based proteins and their multifaceted industrial applications. *Lwt*. 2022 Jan 15;154:112620.
2. Tomaselli L. Morphology, ultrastructure and taxonomy of *Arthrospira* (*Spirulina*) *maxima* and *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*. *Spirulina platensis* (*Arthrospira*): physiology, cell-biology and biotechnology. 1997 May 21:1-6.
3. Alloway BJ. Sources of heavy metals and metalloids in soils. *Heavy metals in soils: trace metals and metalloids in soils and their bioavailability*. 2013:11-50.
4. Briffa J, Sinagra E, Blundell R. Heavy metal pollution in the environment and their toxicological effects on humans. *Heliyon*. 2020 Sep 1;6(9):e04691.
5. Olanow CW. Manganese- induced parkinsonism and Parkinson's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2004 Mar;1012(1):209-23.
6. Hu G, Rana A, Mian HR, Saleem S, Mohseni M, Jasim S, Hewage K, Sadiq R. Human health risk-based life cycle assessment of drinking water treatment for heavy metal (loids) removal. *Journal of Cleaner Production*. 2020 Sep 10;267:121980.
7. Yang S, Qu Y, Ma J, Liu L, Wu H, Liu Q, Gong Y, Chen Y, Wu Y. Comparison of the concentrations, sources, and distributions of heavy metal (loid) s in agricultural soils of two provinces in the Yangtze River Delta, China. *Environmental pollution*. 2020 Sep 1;264:114688.
8. Guo H, Luo S, Chen L, Xiao X, Xi Q, Wei W, Zeng G, Liu C, Wan Y, Chen J, He Y. Bioremediation of heavy metals by growing hyperaccumulaor endophytic bacterium *Bacillus* sp. L14. *Bioresource technology*. 2010 Nov 1;101(22):8599-605.
9. Mesfin A. School of Graduate Studies Chemical Engineering Program (Doctoral dissertation, Addis Ababa University).
10. Mulaba-Bafubiandi AF, Dlamini NP, Mamba BB. Biosorption of cobalt and copper from hydrometallurgical solutions mediated by *Pseudomona* spp. In *Hydrometallurgy Conference* 2009 Feb 24 (pp. 101-110).
11. Li H, Watson J, Zhang Y, Lu H, Liu Z. Environment-enhancing process for algal wastewater treatment, heavy metal control and hydrothermal biofuel production: A critical review. *Bioresource technology*. 2020 Feb 1;298:122421.
12. Ayele A, Haile S, Alemu D, Kamaraj M. Comparative utilization of dead and live fungal biomass for the removal of heavy metal: a concise review. *The Scientific World Journal*. 2021 Apr 8;2021.
13. Vijayaraghavan K, Yun YS. Bacterial biosorbents and biosorption. *Biotechnology advances*. 2008 May 1;26(3):266-91.
14. Bhuvaneswari GR, Shukla SP, Makesh M, Thirumalaiselvan S, Sudhagar SA, Kothari DC, Singh A. Antibacterial activity of spirulina (*Arthrospira platensis* geitler) against bacterial pathogens in Aquaculture. *Isr. J. Aquac.-Bamidgeh*. 2013 Jan 1;932:1-8.
15. Chen X, Shi J, Chen Y, Xu X, Xu S, Wang Y. Tolerance and biosorption of copper and zinc by *Pseudomonas putida* CZ1 isolated from metal-polluted soil. *Canadian journal of microbiology*. 2006 Apr 1;52(4):308-16.
16. Leedj  r  v A, Ivask A, Virta M. Interplay of different transporters in the mediation of divalent heavy metal resistance in *Pseudomonas putida* KT2440.
17. Rathgeber C, Yurkova N, Stackebrandt E, Beatty JT, Yurkov V. Isolation of tellurite-and selenite-resistant bacteria from hydrothermal vents of the Juan de Fuca Ridge in the Pacific Ocean. *Applied and environmental microbiology*. 2002 Sep;68(9):4613-22.
18. Rathnayake IV, Megharaj M, Bolan N, Naidu R. Tolerance of heavy metals by gram positive soil bacteria. *International Journal of Bioengineering and Life Sciences*. 2009 May 21;3(5):270-4.
19. Ruanchaiman S, Kumsopa A, Boontanon N, Prapagdee B. Dispersion of cadmium-resistant bacteria in cadmium-contaminated soils at Mae Sot district, Tak province. *Applied Environmental Research*. 2009;31(2):35-48.
20. Sarin C, Sarin S. Removal of cadmium and zinc from soil using immobilized cell of biosurfactant producing bacteria. *EnvironmentAsia*. 2010;3(2):49-53.
21. Amozegar MA, Ghazanfari NS. Investigating the biosorption of lead and cadmium by the relative halophyte bacterium *Halomonas eurihalina* strain D. *Journal of environmental science and technology*. 2009; 11(4): 4. (In Persian)

22. Andreoni V, Colombo M, Colombo A, Vecchio A, Finoli C. Cadmium and zinc removal by growing cells of *Pseudomonas putida* strain B14 isolated from a metal-impacted soil. *Annals of microbiology*. 2003 Jan 1;53(2):135-48.
23. Duca G, Zinicovscaia I, Grozdov D. Biosorption of Metal Ions by *Spirulina plantensis* Microalga. *Russian Journal of General Chemistry*. 2020 Dec;90:2546-51.
24. Keramati P, Hoodaji M, Tahmourespour A. Multi-metal resistance study of bacteria highly resistant to mercury isolated from dental clinic effluent. *Afr J Microbiol Res*. 2011 Apr 4;5(7):831-7.
25. Nasrazadani A, Tahmourespour A, Hoodaji M. Determination of bacteria resistance threshold to lead, zinc and cadmium in three industrial wastewater samples.
26. Amin P. Microbial absorption and storage of cadmium. Master's thesis in the field of microbiology from Al-Zahra University, Tehran. 2002; 38812(11). (In Persian)
27. Ghorbani F, Yoonesi H. Biosorption of cadmium ions from aqueous solutions using *Saccharomyces cerevisiae* biomass. *Journal of water and sewage*. 2008; 18(33). (In Persian)
28. Hetzer A, Daughney CJ, Morgan HW. Cadmium ion biosorption by the thermophilic bacteria *Geobacillus stearothermophilus* and *G. thermocatenulatus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006 Jun;72(6):4020-7.
29. Narasimhulu K, Rao PS. Studies on removal of toxic metals from wastewater using *Pseudomonas* species. *ARPJ Journal of Engineering and Applied Sciences*. 2009;4(7):58-63.
30. Tali Dalir S. Screening, isolation and identification of lead absorbing bacteria from industrial effluents and optimization of absorption conditions. Master's thesis in the field of microbiology from Al-Zahra University, Tehran. 2003; 47834:111. (In Persian)
31. Rao KS, Mohapatra M, Anand S, Venkateswarlu P. Review on cadmium removal from aqueous solutions. *International journal of engineering, science and technology*. 2010;2(7).
32. Wierzba S. Heavy metals biosorption from aqueous solution by *Pseudomonas* sp. G1. *Proceedings of ECOpole*. 2010;4.
33. Gholipoor Shahraki M. Isolation and identification of some cyanobacteria of the Persian Gulf and investigation of the production of some metabolites or metabolic abilities of these isolates. Master's thesis of Shahid Chamran University of Ahvaz. 2010. (In Persian)
34. Sun D, Zang X, Guo Y, Xiao D, Cao X, Liu Z, Zhang F, Jin Y, Shi J, Wang Z, Li R. Cloning of *pcB* and *pcA* Gene from *Gracilariopsis lemaneiformis* and Expression of a Fluorescent Phycocyanin in Heterologous Host. *Genes*. 2019 Apr 26;10(5):322.
35. Sambrook J, Russell DW. Preparation and transformation of competent *E. coli* using calcium chloride. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2006 Jun 1;2006(1):pdb-rot3932.
36. Rakhshaei R. Investigation and optimization of Pb, Cd, Ni, Zn removal conditions of heavy metals from wastewater by *Azolla aquatic* fern. PhD thesis, Islamic Azad University, North Tehran. 2005; (2). (In Persian)
37. Tabibi B. Investigating the ability of freshwater algae to absorb heavy metals copper and zinc and the possibility of using it in water environments containing sewage. Master's thesis, Islamic Azad University - North Tehran. 2006; 23-27. (in Persian)
38. Khanaferi A, Shirdom R, Tabatabaei A. Isolation and identification of bacteria with the ability to reduce the three metals cadmium, vanadium and nickel from the Anzali lagoon for biological purification. *Environmental Scientific Quarterly*. 2002; 44(3). (In Persian)
39. Giri S. Isolation and biochemical characterization of mercury resistant bacteria (MRB) from soil samples of industrially contaminated area of Rourkela, Orissa (Doctoral dissertation).
40. Giri S. Isolation and biochemical characterization of mercury resistant bacteria (MRB) from soil samples of industrially contaminated area of Rourkela, Orissa (Doctoral dissertation).
41. Esmaeili, Birami, Roostaeiyan. Investigating the biological absorption of ion Co (II) from aqueous solutions by *Gracilaria* algae. Islamic Azad University, North Tehran. 2010; 21-28. (In Persian)
42. Chojnacka K, Chojnacki A, Gorecka H. Biosorption of Cr^{3+} , Cd^{2+} and Cu^{2+} ions by blue-green algae *Spirulina* sp.: kinetics, equilibrium and the mechanism of the process. *Chemosphere*. 2005 Mar 1;59(1):75-84.

43. Morin, R.D., Johnson, N.A., Severson, T.M., Mungall, A.J., An, J., Goya, R., Paul, J.E., Boyle, M., Woolcock, B.W., Kuchenbauer, F. and Yap, D., 2010. Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. Nature genetics, 42(2), pp.181-185.

Evaluation of manganese biodegradation rate by *Spirulina platensis* from industrial effluents and genetic study of heavy metal absorbing genes

Elaheh Taghian^{1*}, Dariush Nabati Ahmadi², Mohammad Roayai Ardakani³

¹ Ph.D. student of genetics and plant breeding, University of Tehran, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Karaj, Iran

² Associate Professor, Department of Plant Breeding, Shahid Chamran University, Faculty of Agriculture, Ahvaz, Iran

³ Professor of Biology Department, Shahid Chamran University, Faculty of Science, Ahvaz, Iran

Email : elahetaghian8@yahoo.com

Received: 15 March 2023, Accepted: 30 April 2023

ABSTRACT

Background & purpose: The remediation of heavy metal manganese from industrial wastewaters has always been a challenging issue for environmental experts. It has been found that different species of microalgae, including *Spirulina platensis*, can be used in industrial wastewater treatment to remove heavy metals. The main goal of this research is to reduce or remove the heavy metal manganese from the industrial wastewaters of factories by microalgae *Spirulina platensis*.

Materials & Methods: In this research, 8 types of industrial wastewaters were collected from different factories and after the algae reached the logarithmic phase, they were mixed with industrial wastewaters. Then, the concentration of manganese metal, the amount of metal absorption and the percentage of microalgae cleaning efficiency were determined by atomic absorption measurement. Also, cutting enzymes were designed for nucleotide sequencing of α -phycocyanin subunit gene from *Spirulina* microalgae. Then Clonewin software was used to confirm the primers and the target fragment was placed in the expression vector.

Findings: The results of atomic absorption evaluation showed that after exposure of spirulina to industrial wastewater for one hour, a significant decrease in the volume of the heavy metal manganese occurred. Also, the result of the α -phycocyanin subunit gene sequence showed 100% homology with the α -phycocyanin subunit gene sequence in the gene bank.

Conclusion: Therefore, *Spirulina platensis* has the ability to absorb manganese metal in industrial wastewaters from factories, and different expression vectors can be used for homogenization and expression of alpha subunit genes.

Keywords: *Spirulina platensis*, wastewater, manganese, biodegradation

Evaluation of manganese biodegradation rate by *Spirulina platensis* from industrial effluents and genetic study of heavy metal absorbing genes

Elaheh Taghian^{1*}, Dariush Nabati Ahmadi², Mohammad Roayai Ardakani³

¹ Ph.D. student of genetics and plant breeding, University of Tehran, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Karaj, Iran

² Associate Professor, Department of Plant Breeding, Shahid Chamran University, Faculty of Agriculture, Ahvaz, Iran

³ Professor of Biology Department, Shahid Chamran University, Faculty of Science, Ahvaz, Iran

Email : elahetaghian8@yahoo.com

Received: 15 March 2023, Accepted: 30 April 2023

ABSTRACT

Background & purpose: The remediation of heavy metal manganese from industrial wastewaters has always been a challenging issue for environmental experts. It has been found that different species of microalgae, including *Spirulina platensis*, can be used in industrial wastewater treatment to remove heavy metals. The main goal of this research is to reduce or remove the heavy metal manganese from the industrial wastewaters of factories by microalgae *Spirulina platensis*.

Materials & Methods: In this research, 8 types of industrial wastewaters were collected from different factories and after the algae reached the logarithmic phase, they were mixed with industrial wastewaters. Then, the concentration of manganese metal, the amount of metal absorption and the percentage of microalgae cleaning efficiency were determined by atomic absorption measurement. Also, cutting enzymes were designed for nucleotide sequencing of α -phycocyanin subunit gene from *Spirulina* microalgae. Then Clonewin software was used to confirm the primers and the target fragment was placed in the expression vector.

Findings: The results of atomic absorption evaluation showed that after exposure of spirulina to industrial wastewater for one hour, a significant decrease in the volume of the heavy metal manganese occurred. Also, the result of the α -phycocyanin subunit gene sequence showed 100% homology with the α -phycocyanin subunit gene sequence in the gene bank.

Conclusion: Therefore, *Spirulina platensis* has the ability to absorb manganese metal in industrial wastewaters from factories, and different expression vectors can be used for homogenization and expression of alpha subunit genes.

Keywords: *Spirulina platensis*, wastewater, manganese, biodegradation