

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΡΗΤΗΣ



ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ



ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΟΡΩΝ & ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΤΟΜΕΑΣ: ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ : Περιβαλλοντικής Χημείας και Βιοχημικών Διεργασιών

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΝΙΚΕΛΙΟΥ ΣΤΟ
ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΤΙΚΟ ΑΛΓΟΣ *CHLAMYDOMONAS
REINHARDTII***

Γωνιωτάκη Μαρία Σαρλότε

Επιβλέπων καθηγητής : **Νίκος Λυδάκης-Σημαντήρης**

ΧΑΝΙΑ 2017

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα καταρχάς να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν με οποιοδήποτε τρόπο στην επιτυχή εκπόνηση αυτής της διπλωματικής εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή μου κ.Λυδάκη-Σημαντήρη κυρίως για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, και την υπομονή που έκανε κατά τη διάρκεια υλοποίησης της πτυχιακής εργασίας και για την ευκαιρία που μου έδωσε να την εκπονήσω στο εργαστήριο Περιβαλλοντικής Χημείας και Βιοχημικών διεργασιών. Όπως επίσης και για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση του για την επίλυση διάφορων θεμάτων.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα. Ε. Κατσίβελα στο Τμήμα Μηχανικών Φυσικών Πόρων και Περιβάλλοντος του ΤΕΙ Κρήτης για τις γνώσεις και εμπειρία της γύρω από την διαδικασία του πειράματος και την Δρ. Δέσποινα Πεντάρη, Επίκουρη Καθηγήτρια στο Τμήμα Μηχανικών Ορυκτών Πόρων του Πολυτεχνείου Κρήτης.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την φίλη πάνω από όλα και συνεργάτιδα του εργαστηρίου MSc κ. Ραΐση Λουΐζα η οποία ήταν διπλά μου καθ' όλη την διάρκεια της εκπόνησης της πτυχιακής εργασίας και απατώντας σε κάθε μου απορία.

Βέβαια, το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στην οικογένεια μου, της οποίας η πίστη στις δυνατότητες μου αποτέλεσε αρωγό σε όλους τους στόχους και τα όνειρά μου.

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Εξεταστής Δρ. Ν. Λυδάκης-Σημαντήρης, Αναπληρωτής Καθηγητής - Επιβλέπων
2. Εξεταστής Δρ. Καλδέρης Δημήτριος, Επίκουρος Καθηγητής
3. Εξεταστής Δρ. Κατσίβελα Ελευθερία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα φωτοσυνθετικά άλγη έχουν σημαντικό ρόλο στην περιβαλλοντική βιωσιμότητα, αφού αποτελούν τη βάση της τροφικής αλυσίδας. Η έκθεση των φωτοσυνθετικών αλγών σε περιβάλλοντα, τα οποία είναι εκτεθειμένα σε βαρέα μέταλλα έχει ως αποτέλεσμα την συσσώρευση των μετάλλων σε αυτά. Η συσσώρευση του μετάλλου γίνεται με δύο τρόπους. Η απορρόφηση των μετάλλων στα άλγη μπορεί να γίνει είτε μέσω προσρόφησης στα κυτταρικά τοιχώματα, είτε με εισαγωγή τους μέσα στα κύτταρα. Η μελέτη της συσσώρευσης των βαρέων μετάλλων στα άλγη έχει δυο σημαντικές εκδοχές: μια είναι οι πληροφορίες που παρέχει σχετικά με την κατάσταση του οικοσυστήματος και η δεύτερη αφορά στην πιθανή εκμετάλλευση αυτών των οργανισμών για την αποκατάσταση των φυσικών υδάτων μέσω βιοφίλτρων, τα οποία θα μπορούν να έχουν πολλές μελλοντικές εφαρμογές.

Σε αυτή την μελέτη ερευνάται η συσσώρευση του μετάλλου στο άλγος γλυκού νερού *Chlamydomonas reinhardtii*, το οποίο καλλιεργήθηκε σε γνώστες συγκεντρώσεις νικελίου. Η ανθεκτικότητα του οργανισμού στο Νικέλιο εξετάστηκε και δημιουργήθηκαν οι διαφορετικές καμπύλες ανάπτυξης του οργανισμού ανάλογα με την συγκέντρωση του νικελίου. Επίσης, μελετήθηκε ποσοτικά η συσσώρευση του νικελίου στα κύτταρα *Chlamydomonas reinhardtii* με φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης και υπολογίστηκε η επί τοις εκατό προσρόφηση του μετάλλου στα κυτταρικά τοιχώματα προς τη συνολική ποσότητα μετάλλου που μετρήθηκε στα κύτταρα.

ABSTRACT

Photosynthetic algae play an important role for the environment's viability, because they constitute the basis of the nutrition chain. Being exposed to environments that contain or are polluted with heavy metals may be affected due to their toxicity. Also, heavy metals can be absorbed by them. Accumulation of the metals takes place through two different ways. Algae can absorb heavy metals, either by adsorption on the cell walls or through direct import into the cell. Studying the accumulation of heavy metals in algae is important. Through the determination of their content of heavy metals we can assess the pollution levels of their living environment, and also because of their ability to accumulate significant amount of these metals they exhibit high potential to be used as bioremediation agents (biofilters). In this thesis research took place to determine the accumulation capacity of *Chlamydomonas reinhardtii* cells for nickel. For this, cells cultures were exposed, and cells were produced in nutrient solutions which contained several levels of Nickel.

Tolerance of *Chlamydomonas reinhardtii* to Nickel was examined and different growth curves were made to show the results of how the algae grew in each case.

Furthermore, using atomic absorption spectrometry we studied the accumulation of Nickel at *Chlamydomonas reinhardtii* cells quantitative and we calculated the percentage of the absorbed at cell walls metal to the total accumulated metal.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	3
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.....	8
1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.2 Η ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i>	9
1.3 ΤΡΟΦΗ.....	10
1.4 ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΟΥ <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i>	10
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.....	14
2.1 ΒΑΡΕΑ ΜΕΤΑΛΛΑ.....	14
2.1.1 ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΒΑΡΕΩΝ ΜΕΤΑΛΛΩΝ	15
2.1.2 ΒΑΡΕΑ ΜΕΤΑΛΛΑ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ.....	16
2.1.3 ΒΑΡΕΑ ΜΕΤΑΛΛΑ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ	17
2.1.4 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΩΝ.....	18
2.2 ΝΙΚΕΛΙΟ	19
2.2.1 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΝΙΚΕΛΙΟΥ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ	20
2.2.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΝΙΚΕΛΙΟΥ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ.....	22
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.....	23
3.1 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΑΤΟΜΙΚΗΣ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ	23
3.1.1 ΠΩΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΕΙ Η ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΑΤΟΜΙΚΗΣ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ	23
3.2 ΟΠΤΙΚΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΟΡΑΤΟΥ	26
3.2.1 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΟΠΤΙΚΩΝ ΟΡΓΑΝΩΝ	26
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....	28
4.1.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	28
4.1 ΠΡΟΠΕΙΡΑΜΑ.....	28
4.2 ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	31
4.3 ΧΩΝΕΥΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	31
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5.....	34
5.1 ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΟΥ <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i> CC 1690	34
5.2 ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ ΑΤΟΜΙΚΗΣ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ ΧΩΡΙΣ EDTA	39
5.3 ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ ΑΤΟΜΙΚΗΣ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ ΜΕ EDTA	45
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6.....	53
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	53
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	56
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	58

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Κατά την διάρκεια των σπουδών μου στο Τμήμα Μηχανικών Φυσικών Πόρων και Περιβάλλοντος, στη σχολή Εφαρμοσμένων Επιστημών του ΤΕΙ Κρήτης ήμουν εργαστηριακός βοηθός στο εργαστήριο Περιβαλλοντικής Χημείας και Βιοχημικών Διεργασιών. Εκεί διαπίστωσα ότι με ενδιαφέρει να ασχοληθώ με το εργαστήριο σε ερευνητικό επίπεδο, οπότε αποφάσισα για αρχή να εκπονήσω την πτυχιακή μου εργασία στον τομέα της Περιβαλλοντικής Τεχνολογίας. Η πτυχιακή εργασία είναι μέρος του ερευνητικού έργου “ Συγκριτική μελέτη της συσσώρευσης βαρέων μετάλλων από φυτοπλακτονικούς οργανισμούς επιφανειακών και θαλάσσιων νερών. (Α) Μηχανισμοί αλληλεπίδρασης βαρέων μετάλλων-πρωτεϊνών, (Β) Χρήση των φωτοσυνθετικών αλγών ως βιοδείκτες ρύπανσης από βαρέα μέταλλα και/ή ως παράγοντας βιοαποκατάστασης” το οποίο εκπονήθηκε στα πλαίσια του προγράμματος Αρχιμήδης ΙΙΙ. Μου ανατέθηκε λοιπόν η καλλιέργεια του άλγους *Chlamydomonas reinhardtii* σε διαφορετικές συγκεντρώσεις νικελίου. Ο σκοπός της εργασίας είναι η μελέτη της επίδρασης του Νί στο άλγος *Chlamydomonas reinhardtii* και πόσο ποσοστό βαρέως μετάλλου εισέρχεται στο εσωτερικό του κυττάρου. Για να ολοκληρώσω το πειραματικό μέρος της πτυχιακής μου εργασίας χρειάστηκαν περίπου 5 μήνες πειραμάτων. Το πειραματικό μέρος της πτυχιακής εργασίας πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Περιβαλλοντικής Χημείας και Βιοχημικών Διεργασιών εκτός από τις μετρήσεις της Ατομικής Απορρόφησής με φασματοσκοπία οι οποίες έγιναν στο Εργαστήριο Ανόργανης Γεωχημείας, Οργανικής Γεωχημείας και Οργανικής Πετρογραφίας του Τμήματος Μηχανικών Ορυκτών Πόρων του Πολυτεχνείου Κρήτης. Όλο αυτό τον καιρό με βοήθησαν και τους ευχαριστώ ξεχωριστά η συνεργάτιδα Λουΐζα Ραΐση, ο επιβλέπων καθηγητής Νίκος Λυδάκης Σημαντήρης και η υπεύθυνη του εργαστηρίου Ελευθερία Κατσίβελα.

Στο πρώτο κεφάλαιο της πτυχιακής εργασίας περιγράφεται αναλυτικά το μονοκύτταρο φωτοσυνθετικό άλγος *Chlamydomonas reinhardtii* που χρησιμοποιήθηκε για την πειραματική διαδικασία, η μορφολογία του και ο κύκλος ζωής του. Στο δεύτερο κεφάλαιο υπάρχει μια μικρή αναφορά στα μέταλλα γενικά και ειδικά στο Νικέλιο. Την επίδραση που έχουν στον άνθρωπο και στο περιβάλλον. Στο τρίτο κεφάλαιο αναφέρονται οι βασικές μέθοδοι φασματοσκοπίας που χρησιμοποιήθηκαν. Στο τέταρτο κεφάλαιο της πτυχιακής εργασίας περιγράφεται λεπτομερώς η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε καθώς και το πως παρασκευάζεται το κάθε αντιδραστήριο που χρησιμοποιήθηκε. Το πέμπτο κεφάλαιο αποτελείται από όλα τα διαγράμματα αναλυτικά από τα αποτελέσματα και το έκτο κεφάλαιο έχει τα συνοπτικά διαγράμματα. Τέλος στο κεφάλαιο Συμπεράσματα αναφέρονται οι παρατηρήσεις από την

πειραματική διαδικασία και τα συμπεράσματα από τα διαγράμματα του έκτου κεφαλαίου.
Έπειτα ακολουθεί η βιβλιογραφία.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το γένος *Chlamydomonas* χρησιμοποιείται πλέον ως γενικός όρος για συγκεκριμένους μαστιγοφόρους μονοκύτταρους οργανισμούς και ονομάστηκε έτσι από το C.G. Ehrenberg το 1838.[28] Ο *Chlamydomonas* ανήκει στο γένος των μονοκύτταρων οργανισμών (*Chlorophyta*) και το μέγεθος του δεν ξεπερνάει τα 10 μικρόμετρα. Αυτά τα άλγη μπορούν να βρεθούν σε όλο τον κόσμο, στο έδαφος, στο φρέσκο νερό, στους ωκεανούς ακόμα και στο χιόνι των βουνοκορφών. Τα φύκια του γένους αυτού έχουν ένα κυτταρικό τοίχωμα, ένα χλωροπλάστη, ένα « μάτι » που αντιλαμβάνεται το φως, και δύο πρόσθια μαστίγια, ίσου μεγέθους, με τα οποία μπορούν να κολυμπήσουν χρησιμοποιώντας τα σαν να κολυμπούν σε πρόσθιο. Περισσότερα από 500 διαφορετικά είδη *Chlamydomonas* έχουν καταγραφεί, αλλά οι περισσότεροι επιστήμονες εργάζονται με μόνο μερικά από αυτά (137C, C9, CC-125, CC-1690, CC-1691, CC-2290).[14] Στα εργαστήρια χρησιμοποιείται ως επί το πλείστον το στέλεχος *Chlamydomonas reinhardtii*. Η σχετική προσαρμοστικότητα και ο χρόνος που χρειάζεται για αναπαραγωγή, ο οποίος είναι σχετικά μικρός (λιγότερο από 5 μέρες) έχει κάνει το *Chlamydomonas reinhardtii* ένα σημαντικό μοντέλο για τη βιολογική έρευνα. Με το πέρασμα των χρόνων μελέτες με το *Chlamydomonas reinhardtii* έχουν παράσχει σημαντικές πληροφορίες στους τομείς της φωτοσύνθεσης και της μοριακής βιολογίας. Σε κανονικές συνθήκες παράγουν ενέργεια μέσα από την φωτοσύνθεση όμως με μια εναλλακτική πηγή άνθρακα το στέλεχος *Chlamydomonas reinhardtii* μπορεί να ευδοκιμήσει και σε απόλυτο σκοτάδι .[15]

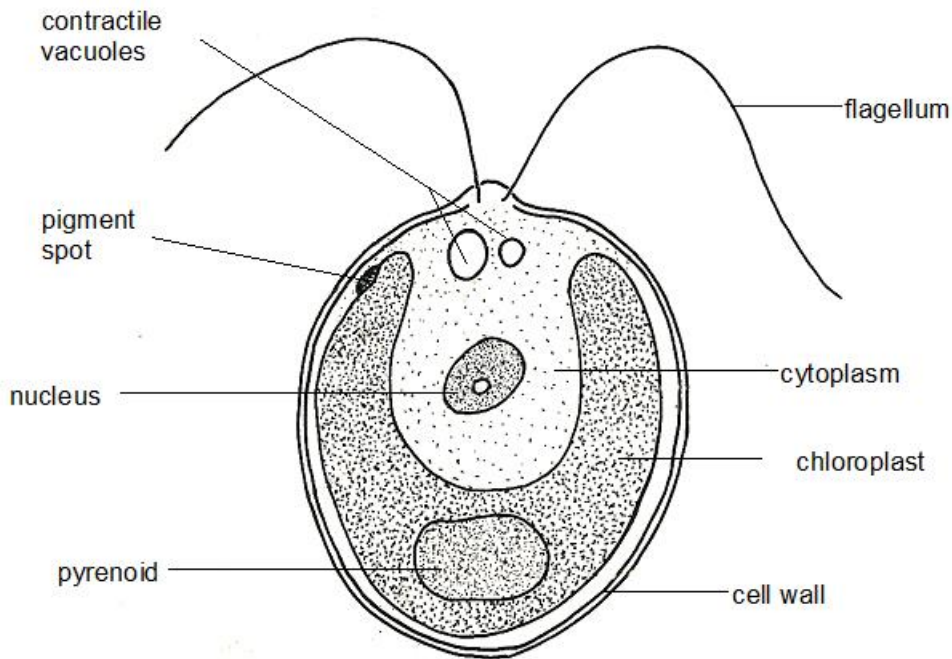
Ο *Chlamydomonas* είναι απλοειδής οργανισμός και έχει ελεγχόμενο σεξουαλικό κύκλο. [16]

Ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός του είναι στενά συνδεδεμένος με εκείνο των αγγειακών φυτών, είναι επίσης ένας ευκαρυωτικός οργανισμός, με γονίδια φωτοσυνθετικά που κωδικοποιούνται από τα δύο γονιδιώματα, του πυρήνα και του χλωροπλάστη.[16] Όπως τα κύτταρα των φυτών, το κύτταρο του *Chlamydomonas* έχει ένα κυτταρικό τοίχωμα το οποίο είναι κυρίως γλυκοπρωτεϊνικής σύστασης.

Τα *Chlamydomonas* έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται ετερότροφα (δηλαδή με παροχή οργανικού άνθρακα στο θρεπτικό υλικό) έτσι είναι δυνατή η απομόνωση βιώσιμων μεταλλαγμάτων που δεν είναι σε θέση να φωτοσύνθεσουν. Ο *Chlamydomonas* έχει μαστίγια που του επιτρέπουν να πραγματοποιήσει κινήσεις που ονομάζονται φωτοταξίες, δηλαδή είναι κινήσεις που κάνει προς ή μακριά από το φως για την καλύτερη δυνατή φωτοσύνθεση και την

ελαχιστοποίηση της φωτογήρανσης. Το άλγος *Chlamydomonas* μπορεί να υιοθετήσει αναερόβιο μεταβολισμό, και να παράγει αέριο υδρογόνο, τα προϊόντα του μεταβολισμού αυτού να είναι το μυρμηκικό οξύ (μεθανικό οξύ) και η αιθανόλη. Ο *Chlamydomonas* είναι ο μόνος γνωστός ευκαρυωτικός οργανισμός στο οποίο γίνεται να μετατραπεί το γονιδιωμα του στον πυρήνα, στους χλωροπλάστες και στα μιτοχόνδρια. Έτσι ο *Chlamydomonas* αποτελεί ένα ισχυρό και ευέλικτο σύστημα για τη μελέτη μιας ποικιλίας μοριακών και κυτταρικών διαδικασιών.

1.2 Η ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*



Chlamydomonas

Εικόνα 1

Ξεκινώντας από τα αριστερά και πάνω βλέπουμε το κυστίδιο με το υγρό (κεντρικό χυμοτόπιο), το “μάτι” που αντιλαμβάνεται το φως, τον πυρήνα, ο πυρηνίσκος, το κυτταρικό τοίχωμα, οι χλωροπλάστες, το κυτόπλασμα και τέλος τα μαστίγια του *Chlamydomonas reinhardtii*.

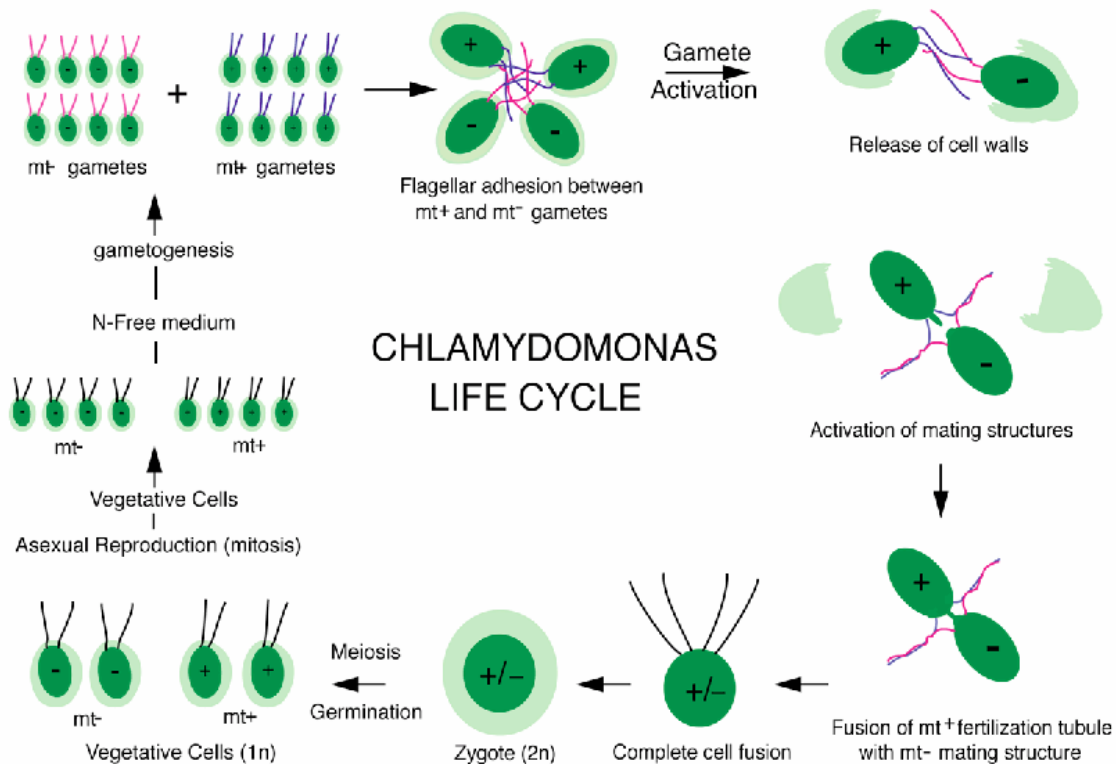
Το κύτταρο του *Chlamydomonas reinhardtii* περιβάλλεται εξωτερικά από γλυκοπρωτεϊνικό τοίχωμα (όχι κυτταρινικής σύστασης). Στο εσωτερικό του κυττάρου παρατηρείται ένας κυπελλοειδής χλωροπλάστης που περιέχει το πυρηνοειδές, ενδοκυτταρική δομή όπου αποθηκεύεται το άμυλο που σχηματίζεται κατά τη φωτοσύνθεση. Στην περιοχή κοντά στα μαστίγια υπάρχουν δύο μικρά συσταλτά κενοτόπια και ένα φωτοευαίσθητο ερυθρό στίγμα (“μάτι”) με το οποίο εξασφαλίζεται η μετακίνηση του κυττάρου προς το φως. Ο θετικός

φωτοτακτισμός που εκδηλώνουν τα άτομα *Chlamydomonas* προάγει τις φωτοσυνθετικές τους λειτουργίες.

1.3 ΤΡΟΦΗ

Ο *Chlamydomonas* φτιάχνει την τροφή του όπως ακριβώς τα φυτά χωρίς φυσικά να έχει το πολύπλοκο ριζικό σύστημα, δηλαδή τον κορμό και τα φύλλα όπως έχουν τα εξελιγμένα φυτά. Περιβάλλεται όμως από νερό το οποίο περιέχει διοξείδιο του άνθρακα και άλατα, έτσι όταν είναι εκτεθειμένο σε φως και με την βοήθεια του χλωροπλάστη μπορεί να παράγει άμυλο μέσω της φωτοσύνθεσης. Από τους υδατάνθρακες με κάποια πρόσθετα στοιχεία μπορούν να συνθέσουν όλα τα υπόλοιπα μόρια που απαιτούνται για την ύπαρξή τους.[19]

1.4 ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΟΥ *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*



Εικόνα 2 : Αναπαραγωγική διαδικασία του *Chlamydomonas*

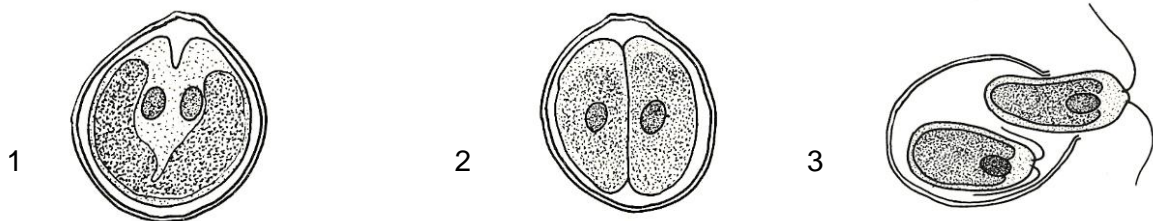
Πηγή : <http://www.chlamycollection.org/images/lifecycle.gif>

Ο *Chlamydomonas* αναπαράγεται και μέσω της επαφής αλλά και με μονογονεϊκή αναπαραγωγή.

Μονογονεϊκή αναπαραγωγή

Σε ευνοϊκές συνθήκες ο *Chlamydomonas* θα συνεχίσει να αυξάνεται και στη συνέχεια όταν φτάσει σε ένα ορισμένο μέγεθος θα αρχίσει να αναπαράγεται με κυτταρική διαίρεση. Τα δυο μαστίγια αποσύρονται, το κυτταρόπλασμα συρρικνώνεται ελαφρώς εντός του τοιχώματος του κυττάρου, στη συνέχεια ο πυρήνας και το κυτταρόπλασμα διαιρείται μία, δύο ή και σε σπάνιες περιπτώσεις έως και τρεις φορές ώστε να δώσει δύο, τέσσερα ή έξι ξεχωριστά κύτταρα που περιέχουν το καθένα ξεχωριστά ένα κυτταρόπλασμα ένα πυρήνα και χλωροπλάστη. Κάθε ένα από αυτά τα κύτταρα σχηματίζει ένα νέο κυτταρικό τοίχωμα και ένα νέο ζεύγος μαστίγιων. Το αρχικό κυτταρικό τοίχωμα τότε σκάει και ελευθερώνει τα νέα κύτταρα του *Chlamydomonas*. [20] Αυτός ο διαχωρισμός μπορεί να συμβεί μία φορά την ημέρα οπότε η γρήγορη αναπαραγωγή των *Chlamydomonas* μπορεί να παρατηρηθεί πολύ γρήγορα με γυμνό μάτι ειδικά όταν παρατηρούμε την αλλαγή χρώματος του νερού από διαφανές σε ελαφρό πράσινο αρχικά και όταν φτάσει τη μέγιστη αναπαραγωγή σε σκούρο πράσινο .

Σε μη ευνοϊκές συνθήκες λαμβάνει χώρα η ίδια διαδικασία όπως την παραπάνω με την διαφορά ότι δεν αναπτύσσονται τα μαστίγια και το αρχικό κυτταρικό τοίχωμα δεν σκάει και δεν ελευθερώνει τα νέα κύτταρα μέχρι οι συνθήκες να είναι ευνοϊκές ξανά. Σε αυτή τη μορφή τα κύτταρα ονομάζονται ζυγοσπόρια. [20]



Εικόνα 3: Κυτταρική διαίρεση, εδώ απεικονίζεται πως διαιρείται το κύτταρο και από ένα κύτταρο παράγονται δυο ξεχωριστά.

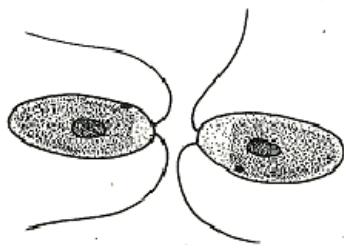
Μέσω τις αναπαραγωγικής διαδικασίας

Υπάρχουν τρεις κατηγορίες:

- Ισογαμική: μεταξύ δυο ίσου μεγέθους κύτταρων διαφορετικού φύλου
- Ανισογαμική: μορφολογικά ίδιοι γαμέτες διαφέρουν εμφανώς σε μέγεθος τα κύτταρα αλλά είναι μεταξύ δυο διαφορετικών φυλών
- Ωαριογαμική: σε αυτή την περίπτωση ο θηλυκός γαμέτης είναι ακίνητος ενώ ο αρσενικός είναι κινητός και συνήθως μικρότερος σε μέγεθος κατά την διαδικασία αυτή ο θηλυκός γαμέτης χάνει το κυτταρικό του τοίχωμα και ενώνεται με το μαστιγοφόρο γαμέτη [28]

Η αναπαραγωγή από δυο διαφορετικούς σεξουαλικά γαμέτες γίνεται με την διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω, απλά στο τέλος δημιουργούνται έως και 16 νέα κύτταρα τα οποία δεν έχουν κυτταρικό τοίχωμα. Όταν απελευθερωθούν από το αρχικό κύτταρο “κολυμπούν” έτσι ώστε να βρουν άλλους μεμονωμένους γαμέτες για να ενωθούν ανά ζευγάρια ώστε να δημιουργήσουν ένα ζυγωτό. Το ζυγωτό που δημιουργείται στρογγυλεύει σιγά σιγά και αποσύρει τα μαστίγια, παράγει ένα παχύ τοίχωμα γύρω από το κυτόπλασμα έτσι ώστε να δημιουργήσει ένα ζυγοσπόριο, το οποίο θα βουλιάξει στο πυθμένα της λίμνης για παράδειγμα. Σε αυτή την μορφή μπορεί να αντισταθεί σε ακραίες θερμοκρασίες και να επιβιώσει ακόμα και εάν αποξηρανθεί η λίμνη. Όταν είναι σε μορφή ζυγοσπόριου μπορεί να μεταφερθεί μέσω της σκόνης ή της λάσπης και έτσι να πρέπει να αντιμετωπίσει νέες καταστάσεις. Όταν οι συνθήκες θα είναι ευνοϊκές το κυτόπλασμα μαζί με το ζυγοσπόριο θα διαιρεθεί συνήθως στα 4, τα οποία θα γίνουν 4 ξεχωριστά απλοειδή κύτταρα.

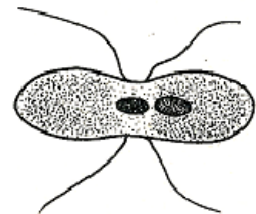
Sexual reproduction



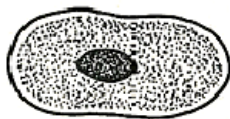
(a) gametes meet



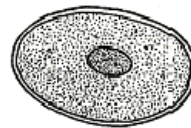
(b) gametes fuse



(c) nuclei fuse



(d) flagella withdrawn
zygote rounds off



(e) zygote secretes thick wall
to become zygospore

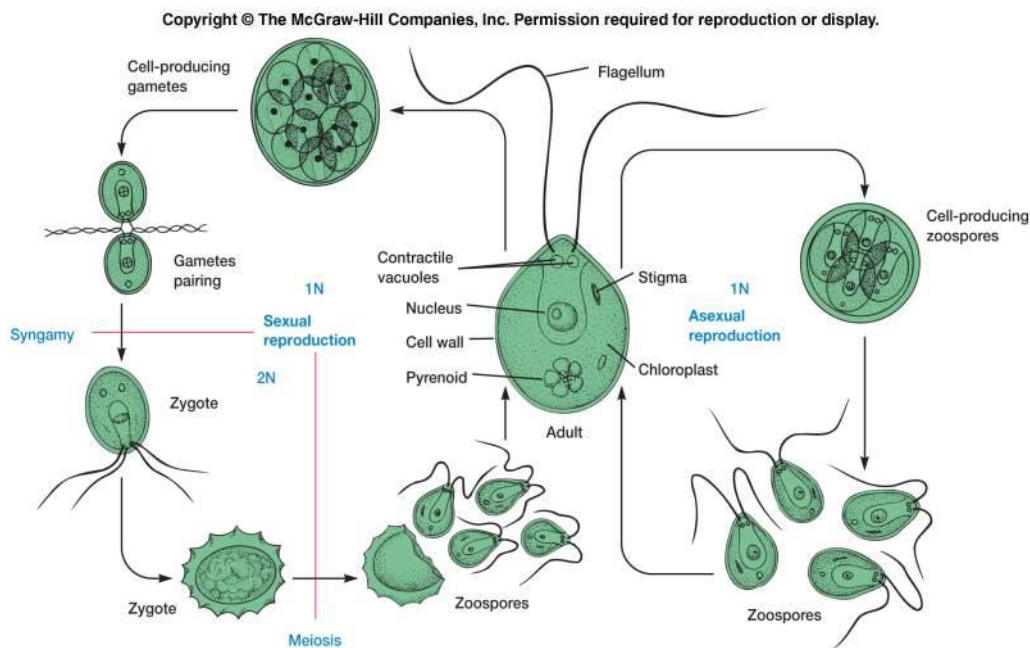
Σε δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες (π.χ. ανεπάρκεια τροφής) τα άτομα *Chlamydomonas* σχηματίζουν γαμέτες (εγγενής αναπαραγωγή) από τη συνένωση των οποίων προκύπτει το ζυγωτό (διπλοειδές κύτταρο). Αναγνωρίζονται δύο φυσιολογικοί τύποι φύλου (+, -) και μόνο κύτταρα με αντίθετο φύλο είναι δυνατό να ενωθούν και να σχηματίσουν ζυγωτό.

Στο *Chlamydomonas* παρατηρούνται όλα τα μεταβατικά στάδια μεταξύ ισογαμίας και ανισογαμίας (είδη ισόγαμα, ελαφρώς ανισόγαμα και σαφώς ανισόγαμα). Στην περίπτωση της

ισογαμίας οι δύο γαμέτες είναι μορφολογικά (σχήμα, δομή) και φυσιολογικά όμοιοι και παρουσιάζουν πιθανώς μόνο βιοχημικές διαφορές. Στην ανισογαμία οι γαμέτες διαφοροποιούνται μορφολογικά και μπορούμε να διακρίνουμε φύλα (αρσενικό και θηλυκό). Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ο σχηματισμός του ζυγωτού προϋποθέτει τη συνένωση γαμετών διαφορετικού φύλου.

Σταδιακά το ζυγωτό μετατρέπεται, με την αποβολή των μαστιγίων του και το σχηματισμό ενός χοντρού περιβλήματος, σε μια ανθεκτική σε δυσμενείς συνθήκες μορφή ζυγοσπόριο. Σε κατάλληλες συνθήκες για την ανάπτυξη των *Chlamydomonas* τα ζυγοσπόρια διαιρούνται μειωτικά σχηματίζοντας τέσσερα απλοειδή ζωοσπόρια, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω.

Συνοπτικά όλη η διαδικασία



Πηγή εικόνας <http://classroom.sdmesa.edu/eschmid/lecture11-microbio.htm>

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2.1 ΒΑΡΕΑ ΜΕΤΑΛΛΑ

Τα βαρέα μέταλλα ορίζονται ως μεταλλικά στοιχεία τα οποία έχουν υψηλή πυκνότητα σε σύγκριση με το νερό, επίσης βαρέα μέταλλα ονομάζονται τα μέταλλα με πυκνότητα $>5\text{g/cm}^3$. Με την παραδοχή ότι η βαρύτητα και η τοξικότητα είναι αλληλένδετα, τα βαρέα μέταλλα περιλαμβάνουν επίσης τα μεταλλοειδή, όπως το αρσενικό, το οποίο μπορεί να προκαλέσει τοξικότητα σε χαμηλά επίπεδα έκθεσης. Τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί η ανησυχία για το περιβάλλον και για την παγκόσμια υγεία η οποία σχετίζεται με τη μόλυνση του περιβάλλοντος από αυτά τα μέταλλα. Τα βαρέα μέταλλα εισέρχονται στον οργανισμό μέσω της τροφικής αλυσίδας. Η τροφική αλυσίδα έχει επιβαρυνθεί με τα βαρέα μέταλλα από την ρύπανση του περιβάλλοντος. Η ρύπανση του περιβάλλοντος γίνεται από τον άνθρωπο και τις δραστηριότητές του. Για παράδειγμα, δραστηριότητες οι οποίες ρυπαίνουν το περιβάλλον είναι η ρίψη ανεπεξέργαστων λυμάτων στους υδάτινους αποδέκτες, η ρίψη ανεπεξέργαστων στέρεων απορριμμάτων (τα οποία περιέχουν βαρέα μέταλλα), οι βιομηχανίες, οι θερμοηλεκτρικοί σταθμοί, τα μέσα μεταφοράς (η καύση συμβατικών καυσίμων), η οικιακή θέρμανση, η παραγωγή πυρηνικής ενέργειας, τήξη μετάλλων και κραμάτων, παραγωγή τσιμέντου, η καύση στερεών και υγρών καυσίμων και η αποτέφρωση απορριμμάτων. Η κυριότερη φυσική πηγή εκπομπής μετάλλων στην ατμόσφαιρα είναι το έδαφος.[12] Τα μέταλλα και οι ενώσεις, του κατά κανόνα βρίσκονται στην ατμόσφαιρα με την μορφή στερεών σωματιδίων ή σταγονιδίων. Υπάρχουν όμως και ορισμένα μεταλλικά στοιχεία και ενώσεις που έχουν σημαντική πτητικότητα στη θερμοκρασία περιβάλλοντος και βρίσκονται στην ατμόσφαιρα με την μορφή ατμών (πχ. Καρβονύλια μετάλλων, τετρααιθυλιούχος μόλυβδος, υδράργυρος κ.α.) [25]. Όμως τα βαρέα μέταλλα δεν αποικοδομούνται, οπότε συσσωρεύονται στο έδαφος και στα νερά (γλυκά και αλμυρά), με αποτέλεσμα να περνούν στην τροφική αλυσίδα.

Τα κυριότερα βαρέα μέταλλα με βάση την τοξικότητα τους είναι τα παρακάτω:

$\text{Hg} > \text{Cu} > \text{Zn} > \text{Ni} > \text{Pb} > \text{Cd} > \text{As} > \text{Cr} > \text{Sn} > \text{Fe} > \text{Mn}$ [3]

Πίνακας 1. Όρια της Ε.Ε. για την περιεκτικότητα βαρέων μετάλλων στο νερό. [3]

ΣΤΟΙΧΕΙΟ	ΣΥΜΒΟΛΟ	ΜΕΓΙΣΤΗ ΕΠΙΤΡΕΠΤΗ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ
Αρσενικό	As	10 µg/L
Βάριο	Ba	1 µg/L
Κάδμιο	Cd	5 µg/L
Μόλυβδος	Pb	10 µg/L
Νικέλιο	Ni	20 µg/L
Σελήνιο	Se	10 µg/L
Υδράργυρος	Hg	<1 µg/L
Χαλκός	Cu	2 µg/L
Χρώμιο	Cr	50 µg/L

2.1.1 ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΒΑΡΕΩΝ ΜΕΤΑΛΛΩΝ

Τα βαρέα μέταλλα γίνονται τοξικά όταν δεν μεταβολίζονται από το σώμα και συσσωρεύονται στους μαλακούς ιστούς. Τα βαρέα μέταλλα μπορούν να εισέλθουν στον ανθρώπινο οργανισμό μέσω των τροφίμων, του νερού, του αέρα ή της απορρόφησης μέσω του δέρματος όταν έρχονται σε επαφή με τους ανθρώπους οι οποίοι ασχολούνται με την γεωργία, στον τομέα της βιομηχανίας και της φαρμακευτικής. Βιομηχανική έκθεση αντιπροσωπεύει την πιο κοινή μορφή έκθεσης για τους ενήλικες.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι μικρές ποσότητες μερικών από αυτά τα στοιχεία, όπως για παράδειγμα, το Ni ή Cu είναι αναγκαία για τη διατροφή και το περιβάλλον, όπως και απαραίτητα για τη διατήρηση της καλής υγείας. Παρόλα αυτά, η έκθεση του ανθρώπου σε μεγάλες συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων ενδέχεται να επιφέρει οξεία ή ακόμα και χρόνια τοξικότητα (δηλητηρίαση).

Η τοξικότητά τους εξαρτάται από το είδος του βαρέος μετάλλου, τη συγκέντρωσή του, την συνύπαρξή του με άλλα βαρέα μέταλλα, και το είδος του μικροοργανισμού. Τα βαρέα μέταλλα είναι φυσικά στοιχεία που έχουν υψηλό ατομικό βάρος και πυκνότητα τουλάχιστον 5 φορές μεγαλύτερη από εκείνη του νερού. Οι πολλαπλές βιομηχανικές, οικιακές, γεωργικές, ιατρικές και τεχνολογικές εφαρμογές τους έχουν οδηγήσει την ευρεία διασπορά τους στο περιβάλλον, αυξάνοντας έτσι τις ανησυχίες για τις πιθανές επιπτώσεις τους στην ανθρώπινη υγεία και στα οικοσυστήματα. Η τοξικότητά τους εξαρτάται από αρκετούς παράγοντες, όπως η έκθεση και με ποιο βαρέο μέταλλο έρχεται σε επαφή, καθώς και την ηλικία, το φύλο και τις διατροφικές συνήθειες των εκτεθειμένων ατόμων. Λόγω του υψηλού βαθμού τοξικότητάς τους,

το αρσενικό, το κάδμιο, το χρώμιο, ο μόλυβδος και ο υδράργυρος αποτελούν βαρέα μέταλλα ουσιαστικής σημασίας για τη δημόσια υγεία. Η δράση των μεταλλικών αυτών στοιχείων, καθίσταται υπεύθυνη για την πρόκληση πληθώρας λειτουργικών διαταραχών του ανθρώπινου βιολογικού συστήματος, ακόμη και σε χαμηλότερα επίπεδα έκθεσης. Ταξινομούνται επίσης ως καρκινογόνα για τον άνθρωπο σύμφωνα με την Υπηρεσία Προστασίας του Περιβάλλοντος και του Διεθνούς Οργανισμού Ερευνών για τον Καρκίνο.

Η τοξικότητα του Νικελίου και των ανόργανων ενώσεών του είναι σημαντική. Μερικές από τις ενώσεις του θεωρούνται καρκινογόνες και τερατογόνες. Το Νκέλιο σε πολλούς ανθρώπους δημιουργεί και αλλεργικές αντιδράσεις. Η μόλυνση του περιβάλλοντος και η έκθεση σε βαρέα μέταλλα, όπως ο υδράργυρος, το κάδμιο και ο μόλυβδος αποτελεί ένα σοβαρό πρόβλημα το οποίο απασχολεί όλο τον πλανήτη. Η έκθεση του ανθρώπου σε βαρέα μέταλλα έχει αυξηθεί ραγδαία τα τελευταία 50 χρόνια, σε αυτό σαφώς συμβάλει η εργασία σε βιομηχανίες και η επαφή με προϊόντα που περιέχουν βαρέα μέταλλα.

2.1.2 ΒΑΡΕΑ ΜΕΤΑΛΛΑ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ

Όλοι είναι εκτεθειμένοι με τον ένα ή τον άλλο τρόπο σε κάποιες πηγές βαρέων μετάλλων, και για αυτό ευθύνεται ο τρόπος ζωής τόσο στις πόλεις όσο και εκτός των πόλεων. Υπάρχουν όμως κάποιες άλλες αιτίες συσσώρευσης βαρέων μετάλλων στο οργανισμό, όπως το επάγγελμα ή η περιοχή που μένει κάποιος, οι οποίες αυξάνουν σημαντικά τον κίνδυνο τοξικότητας από βαρέα μέταλλα.

Τα βαρέα μέταλλα συσσωρεύονται στους πρωτεϊνικούς ιστούς και στα οστά. Έτσι οι καταναλωτές θα πρέπει να αποφεύγουν την κατανάλωση ύδατος από ρυπασμένες περιοχές, καθώς και την κατανάλωση συκωτιού και νεφρών από μεγάλης ηλικίας ζώα. Επίσης απο ζώα που προέρχονται από ρυπασμένες περιοχές και τρόφιμα βολβούς (πατάτες, κρεμμύδια, καρότα), που παρήχθησαν σε επιβαρυνμένες με βαρέα μέταλλα περιοχές.[2]

Τα βαρέα μέταλλα δηλητηριάζουν τον οργανισμό προκαλώντας την διάσπαση κυτταρικών ενζύμων, τα οποία δρουν ως καταλύτες των θρεπτικών μετάλλων, όπως το μαγνήσιο, ο ψευδάργυρος, και το σελήνιο. Τα τοξικά μέταλλα διώχνουν τις θρεπτικές ουσίες και δεσμεύουν τους υποδοχείς των θρεπτικών ουσιών. Σχεδόν όλα τα συστήματα του οργανισμού επηρεάζονται από την τοξικότητα των βαρέων μετάλλων, με κυρίαρχα το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ), το Περιφερικό Νευρικό Σύστημα (ΠΝΣ), το αιματοποιητικό, το νεφρικό και το καρδιαγγειακό.[27]

Η ρύπανση της ατμόσφαιρας είναι η κυριότερη αιτία για το φαινόμενο του θερμοκηπίου, την καταστροφή του όζοντος και την όξινη βροχή. Δεδομένου ότι οι πνεύμονες

είναι το μοναδικό όργανο μετά το δέρμα το οποίο έρχεται σε άμεση επικοινωνία με το περιβάλλον, γι' αυτό και κάθε μεταβολή της φυσικοχημικής σύστασης του εισπνεόμενου αέρα έχει άμεση και δυσμενή επίδραση στη λειτουργία των πνευμόνων. Οπότε ως αποτέλεσμα έχει ο άνθρωπος υψηλότερες πιθανότητες για ανάπτυξη καρκίνου πνευμόνων, μύτης, λάρυγγα και του προστάτη, άσθμα και χρόνια βρογχίτιδα, αναταραχές καρδιάς και αλλεργικές αντιδράσεις.

Μια κατηγορία επαγγελματιών που είναι ιδιαίτερα εκτεθειμένη σε βαρέα μέταλλα και κυρίως στον υδράργυρο είναι οι οδοντίατροι. Τα οδοντικά αμαλγάματα περιέχουν πολύ μεγάλη συγκέντρωση υδραργύρου, έτσι οι οδοντίατροι που ασχολούνται με σφραγίσματα πολλές ώρες την ημέρα είναι πολύ επιρρεπείς στους ατμούς του υδραργύρου. Το ίδιο ισχύει και για τον κασσίτερο, μιας και κάποια αμαλγάματα περιέχουν και κασσίτερο. Φυσικά, εκτός από τους οδοντιάτρους είναι εκτεθειμένο σε ατμούς υδραργύρου και το προσωπικό του οδοντιατρείου. Ως αποτέλεσμα λοιπόν, όλοι όσοι έχουν σφραγίσματα υδραργύρου λαμβάνουν καθημερινά υδράργυρο, μέσω της εξατμίσσης του οδοντικού αμαλγάματος, πολύ πάνω από τα επιτρεπτά όρια. Ο υδράργυρος αυτός εξατμίζεται είτε όταν τρώμε κάτι ζεστό, είτε όταν βουρτσίζουμε τα δόντια μας, είτε όταν τα τροχίζουμε στον οδοντίατρο.

Οι επαγγελματικές κατηγορίες που αντιμετωπίζουν συνεχή έκθεση σε βαρέα μέταλλα είναι σε σταθμούς παραγωγής ενέργειας, σε συγκόλληση και μορφοποίηση μετάλλων σε στρατιωτικούς χώρους, σε υδραυλικές κατασκευές σε χειρισμούς και απόθεση λυμάτων, σε διυλιστήρια πετρελαίου, σε κατασκευή χρωμάτων και υλικών επικάλυψης και σε παραγωγή πετροχημικών. Επιπλέον το Νικέλιο το εντοπίζουμε σε επιμεταλλώσεις σε συσσωρευτές και στους καταλύτες.[4]

Υπάρχουν δύο τρόποι ανίχνευσης των βαρέων μετάλλων (χρόνια, οξεία), αναλόγως την έκθεση την οποία υποψιαζόμαστε. Αν πιστεύουμε ότι υπάρχει χρόνια έκθεση σε κάποιο βαρέο μέταλλο, τότε πρέπει να γίνει η μέτρηση στα ούρα, έτσι ώστε να μετρηθεί η έκκριση βαρέων μετάλλων από όλους τους ιστούς. Από την άλλη, όταν υποπτευόμαστε οξεία έκθεση, τότε θα μετρήσουμε τα βαρέα μέταλλα στα ερυθρά αιμοσφαίρια, των οποίων ο χρόνος ζωής τους μας επιτρέπει να δούμε έκθεση μέχρι 4 μήνες.[4]

2.1.3 ΒΑΡΕΑ ΜΕΤΑΛΛΑ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

Το Νικέλιο που υπάρχει στη γη είναι σε μεγάλο ποσοστό μη προσβάσιμο. Αυτό συμβαίνει διότι εντοπίζεται στον ρευστό πυρήνα της γης, αναμειγμένο με σίδηρο σε ποσοστό 10 %. [10]

Η συνολική ποσότητα του νικελίου που είναι διαλυμένη στη θάλασσα έχει υπολογισθεί να είναι περίπου 8 δισεκατομμύρια τόνους. Η οργανική ύλη έχει την δυνατότητα να απορροφά

το μέταλλο, έτσι εξηγείται γιατί το πετρέλαιο και ο άνθρακας περιέχουν σημαντική ποσότητα μετάλλων.[10]

Πίνακας 2. Όρια τοξικότητας βαρέων μετάλλων στη θάλασσα [8]

Μέταλλο	mg/ L στη θάλασσα	Μέταλλο	mg/ L στη θάλασσα
Mg	$1,35 \cdot 10^3$	Cu	0,003
Ca	400	U	0,003
K	380	Mn	0,002
Sr	8,10	Co	$2,7 \cdot 10^{-4}$
Li	0,18	Cd	$1,1 \cdot 10^{-4}$
Al	0,01	Cr	$5 \cdot 10^{-5}$
Fe	0,01	Hg	$3 \cdot 10^{-5}$
Zn	0,01	Pb	$3 \cdot 10^{-5}$
Ni	0,0054		

Η συγκέντρωση του νικελίου στο έδαφος μπορεί να είναι από 0.2 ppm έως 450 ppm, το οποίο μετριέται σε εδάφη τα οποία αποτελούνται από άργιλο η γενικά σε αργιλώδη εδάφη. Κατά μέσο όρο συναντάμε κοντά στα 20 ppm. Μία πλούσια πηγή νικελίου αποτελεί το τσάι στο οποίο περιέχονται 7.6 mg Ni /kg αποξηραμένων φύλλων.

Η εξόρυξη του νικελίου γίνεται στην Ρωσία, Αυστραλία, Νέα Καληδονία, Κούβα και νότια Αφρική. Η ετήσια παραγωγή ξεπερνά τους 500.000 τόνους και τα αποθέματα φτάνουν για τουλάχιστον 150 χρόνια. Στην Ελλάδα υπάρχουν πλούσια κοιτάσματα γαρνιερίτη, ενός μικτού πυριτικού άλατος νικελίου και άλλων μετάλλων (περιεκτικότητα σε Ni: 1-3%) στη Λάρυμνα (Χαλκιδική), στη Καστοριά και στο Νέο Κόκκινο (Βοιωτία).

2.1.4 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΩΝ

Η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου καθορίζεται κυρίως από:

- Τα χαρακτηριστικά του δείγματος (νερά, ιζήματα, φυτά κ.λπ.)
- Τα μέταλλα που πρόκειται να προσδιορισθούν

- Την απαιτούμενη ευαισθησία και ακρίβεια
- Την αναγκαιότητα για ταυτόχρονο προσδιορισμό και άλλων στοιχείων
- Τις πιθανές παρεμποδίσεις
- Τον υπάρχοντα εργαστηριακό εξοπλισμό

Υπάρχουν δυο κατηγορίες προσδιορισμού των βαρέων μετάλλων:

1. Μέθοδοι, οι οποίες εφαρμόζονται απ' ευθείας, χωρίς να διαλυτοποιήση του δείγματος (Non-destructive methods). Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει:
 - Νετρονική ενεργοποίηση
 - Φθορισμομετρία ακτίνων X
 - Φασματοσκοπία εκπομπής ακτίνων-X προκαλούμενων από πρωτόνια

Τα μειονεκτήματα των μεθόδων αυτών είναι ότι χρειάζονται όργανα υψηλού κόστους και ότι δεν υπάρχει μεγάλη ποικιλία πρότυπων δειγμάτων για την βαθμονόμηση των οργάνων. Τα πλεονεκτήματα είναι ότι δεν καταστρέφονται τα δείγματα και ότι υπάρχει η δυνατότητα ταυτόχρονου προσδιορισμού πολλών στοιχείων, μετάλλων και αμέταλλων.[25]

2. Μέθοδοι οι οποίες προκειμένου να εφαρμοσθούν προϋποθέτουν την κατάλληλη διαλυτοποίηση του δείγματος (destructive methods). Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει:
 - Φασματομετρία υπεριώδους ορατού (UV-VIS)
 - Φθορισμομετρία (FA)
 - Φλογοφασματομετρία ατομικής εκπομπής (AES)
 - Φασματοσκοπία ατομικής εκπομπής με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα (ICP_AES)
 - Φλογοσματομετρία ατομικής απορρόφησης (AAS)
 - Φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης με φούρνο θερμαινόμενου γραφίτη (FG/AAS)
 - Αναλυτική βολταμετρία κ.α [25]

2.2 ΝΙΚΕΛΙΟ

Το Νικέλιο ανήκει στη κατηγορία των μετάλλων και βρίσκεται στη υποκατηγορία των στοιχείων μετάπτωσης στο περιοδικό πίνακα. Το Νικέλιο έχει ατομικό αριθμό 28 και ατομικό βάρος 58,69 και συμβολίζεται με Ni. Γενικά τα βαρέα μέταλλα είναι τα στοιχεία τα οποία έχουν ειδικό βάρος μεγαλύτερο από το ειδικό βάρος του σιδήρου δηλαδή μεγαλύτερα από 7,68 και πυκνότητα >5g/cm³. Τα βαρέα μέταλλα ακόμα και σε μικρές συγκεντρώσεις μπορούν να είναι

τοξικά, υπάρχουν ελευθέρως στο περιβάλλον σε μορφή ιόντων, όπως διαλυμένα στο νερό ή ως μεταλλεύματα στους βράχους. Δεν αποβάλλονται όποτε συμβαίνει η βιοσυσσώρευση των βαρέων μετάλλων στον οργανισμό με συνέπεια να γίνονται τοξικά. Τα βαρέα μέταλλα είναι όμως απαραίτητα σε μικρές ποσότητες για την δράση των βιταμινών και τις ζωτικές λειτουργίες των οργανισμών.

Το Νικέλιο χαρακτηρίζεται ως αργυρόχρωμο, ελατό και όλκιμο μέταλλο. Σταθερό στον αέρα, δεν προσβάλλεται από το νερό και γενικά ανθίσταται στη διάβρωση. Είναι αρκετά καλός αγωγός της θερμότητας και του ηλεκτρισμού. Απομονώθηκε από τον A. F. Cronstedt (Σουηδία, 1751). Ονομασία γερμανικής προέλευσης: "nickel": διάβολος, αρχική ονομασία του μετάλλου: "kupfernickel": ο χαλκός του διαβόλου.

Στις ενώσεις του το νικέλιο παρουσιάζεται κυρίως ως δισθενές και πολύ σπάνια ως τετρασθενές. Όλα τα απλά άλατα του Ni καθώς και τα υδατικά διαλύματα αυτών είναι ανοικτοπράσινα. Τα άνυδρα άλατα συνήθως έχουν διαφορετικό χρώμα. Επίσης, όλα τα άλατα του στοιχείου αυτού σχηματίζουν σύμπλοκες ενώσεις. Σπουδαιότερες αυτών είναι:

- το Οξειδίο του νικελίου,
- το Υδροξείδιο του νικελίου,
- τα Ανώτερα νικελιοξείδια,
- το Θειούχο νικέλιο,
- το Νικελιοκαρβονύλιο,
- το Χλωριούχο νικέλιο,
- το Νιτρικό νικέλιο
- το Θεϊκό νικέλιο και
- τα Αμωνιακά άλατα νικελίου[29]

Επιπλέον σχηματίζει μια σειρά από σύνθετες ενώσεις, οι περισσότερες ενώσεις του νικελίου έχουν χρώμα μπλε ή πράσινο. Το Νικέλιο διαλύεται αργά σε αραιά οξέα. Όπως συμβαίνει και με το σίδηρο έτσι και το Νικέλιο όταν έρχεται σε επαφή με νιτρικό οξύ γίνεται παθητικό. Τέλος, το Νικέλιο όταν διαιρείται απορρόφα και το οξυγόνο.

2.2.1 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΝΙΚΕΛΙΟΥ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ

Οι άνθρωποι χρησιμοποιούν το Νικέλιο σε διάφορες εφαρμογές. Η πιο συχνή χρήση του νικελίου είναι ως συστατικό σε ατσάλι και άλλα μεταλλικά προϊόντα. Μπορεί επίσης να βρεθεί σε κοινά μεταλλικά προϊόντα όπως τα κοσμήματα. Το Νικέλιο και τα άλατά του προκαλούν δερματικά εξανθήματα κυρίως σε εργάτες που απασχολούνται στην κατασκευή κοσμημάτων όπως και σε άλλες απασχολήσεις που χρησιμοποιείται το μέταλλο.

Τα τρόφιμα περιέχουν μικρές ποσότητες Νικελίου. Η σοκολάτα και τα λίπη είναι γνωστά ως τα τρόφιμα που περιέχουν μεγαλύτερη συγκέντρωση νικελίου. Το Νικέλιο αυξάνεται ραγδαία στον οργανισμό όταν ο άνθρωπος καταναλώνει λαχανικά τα οποία προέρχονται από ρυπασμένες περιοχές. Τα φυτά είναι γνωστό ότι συσσωρεύουν το Νικέλιο, οπότε είναι αξιοσημείωτη η πρόσληψη του Νικελίου από αυτά. Οι καπνιστές έχουν υψηλότερη πρόσληψη Νικελίου μέσω των πνευμόνων τους. Τέλος, το Νικέλιο μπορεί να βρεθεί και στα απορρυπαντικά.[10]

Οι άνθρωποι εκτίθενται στο Νικέλιο όταν αναπνέουν, πίνουν νερό, τρώνε ή καπνίζουν. Έκθεση σε Νικέλιο έχουμε επίσης όταν έρχεται σε επαφή το δέρμα με έδαφος το οποίο περιέχει Νικέλιο ή με μολυσμένα νερά. Σε μικρές ποσότητες το Νικέλιο είναι απαραίτητο για τον οργανισμό, αλλά όταν η πρόσληψη του είναι υψηλή μπορεί να αποτελεί κίνδυνο για την υγεία του ανθρώπου.[10]

Η πρόσληψη μεγάλων ποσοτήτων νικελίου μπορεί να έχει τις ακόλουθες συνέπειες:

- Μεγαλύτερες πιθανότητες για ανάπτυξη του καρκίνου του πνεύμονα, μύτης, λάρυγγα και του προστάτη.
- Η έκθεση σε αέριο νικελίο μπορεί να έχουν τα ακόλουθα συμπτώματα όπως αδιαθεσία και ζαλάδα.
- Πνευμονική εμβολή
- Αναπνευστική ανεπάρκεια
- Γενετικές ανωμαλίες
- Άσθμα και χρόνια βρογχίτιδα
- Αλλεργικές αντιδράσεις όπως δερματικά εξανθήματα (κυρίως από κοσμήματα)
- Διαταραχές στην καρδιά[10]

Ο καπνός από το Νικέλιο ερεθίζει το αναπνευστικό σύστημα και μπορεί να προκαλέσει πνευμονίτιδα. Η έκθεση σε Νικέλιο και οι ενώσεις του μπορεί να οδηγήσουν στην ανάπτυξη μιας δερματίτιδας γνωστή ως "φαγούρα από το Νικέλιο" σε ευαίσθητοποιημένα άτομα. Το πρώτο σύμπτωμα είναι συνήθως ο κνησμός, σύμπτωμα που παρατηρείται μέχρι 7 ημέρες πριν εμφανιστούν τα δερματικά εξανθήματα.[10]

Ένας άνθρωπος 70 kg έχει στο σώμα του περίπου 10 mg νικελίου, συγκέντρωση που αντιστοιχεί σε 0.1 ppm για ένα κανονικό άνθρωπο. Σε υγιείς ενήλικες έχουμε 0.2 μg/L στο πλάσμα και 1–3 μg/L στα ούρα. Περίπου 20–35% από το Νικέλιο που λαμβάνει ο οργανισμός παρακρατείται από τους πνεύμονες και μεταφέρεται στο αίμα. [17]

Όταν το Νικέλιο εισέρχεται στο σώμα μέσω της κατάποσης η απορρόφηση του έχει μεγάλες αποκλίσεις (3-40%) το οποίο εξαρτάται από το εάν το Νικέλιο υπήρχε στο φαγητό ή στο πόσιμο νερό, με την μεγαλύτερη συγκέντρωση να την βρίσκουμε στο πόσιμο νερό. Ανεξάρτητα από την έκθεση που είχε ο οργανισμός στο Νικέλιο ένα μέρος του αποβάλλεται μέσω των ουρών.[17]

2.2.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΝΙΚΕΛΙΟΥ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

Το Νικέλιο απελευθερώνεται στον αέρα από σταθμούς παραγωγής ηλεκτρικής ενέργειας και αποτεφρωτήρες απορριμμάτων. Όταν όμως έρθει σε επαφή με τις σταγόνες τις βροχής θα ενσωματωθεί και θα πέσει στο έδαφος. Συνήθως παίρνει πολύ χρόνο για το Νικέλιο μέχρι να απομακρυνθεί από την ατμόσφαιρα. Το Νικέλιο μπορεί να καταλήξει και στην επιφάνεια του νερού όταν αυτό εμπεριέχεται στα υγρά απόβλητα. Το μεγαλύτερο μέρος όλων των ενώσεων του νικελίου που έχει απελευθερωθεί στο περιβάλλον θα απορροφηθεί στα ιζήματα ή σε σωματίδια του εδάφους με αποτέλεσμα να είναι ακίνητο. Σε πιο όξινο έδαφος όμως το Νικέλιο γίνεται πιο κινητικό και έτσι σταδιακά θα ξεπλένεται στα υπόγεια ύδατα. Για τα ζώα το Νικέλιο είναι ένα βασικό στοιχείο στη διατροφή τους σε μικρές ποσότητες. Το Νικέλιο όμως σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις μπορεί να είναι επικίνδυνο, διότι αυτό μπορεί να προκαλέσει διάφορα είδη καρκίνου στα ζώα και ειδικότερα σε εκείνα που ζουν κοντά σε διυλιστήρια. Δεν υπάρχουν πολλές πληροφορίες για την επίδραση του νικελίου σε οργανισμούς πέρα από τον άνθρωπο.[10]

Παρά τις προειδοποιήσεις όμως της Χημείας και των άλλων Επιστημών η διοχέτευση ρυπογόνων ουσιών στο περιβάλλον συνεχίζεται. Ο μόνος όμως υπεύθυνος για αυτήν την κατάσταση είναι ο άνθρωπος ο οποίος χρησιμοποίησε και χρησιμοποιεί τα επιτεύγματα της Χημείας και των άλλων επιστημών χωρίς αξιολόγηση των πλεονεκτημάτων έναντι των κινδύνων για τον άνθρωπο και το περιβάλλον. Πρέπει λοιπόν να συνειδητοποιήσει ότι η επιστήμη είναι ανεξάρτητη, ότι οι ανθρώπινες αποφάσεις και δραστηριότητες είναι υπεύθυνες τόσο για τα ευεργετήματα όσο και τους κινδύνους. Και τέλος ότι ο άνθρωπος είναι ο ρυθμιστής της ισορροπίας των τριών βασικών παραγόντων της ποιότητας ζωής:

1. Υγείας
2. Περιβάλλοντος
3. Διατροφής

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3.1 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΑΤΟΜΙΚΗΣ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ

Η φασματομετρία ατομικής απορρόφησης (atomic absorption spectrometry, AAS) είναι η πιο σύνηθες τεχνική για τον προσδιορισμό στοιχείων σε αναλυτικά δείγματα ποσοτικά και ποιοτικά. Ο προσδιορισμός βασίζεται στη σύγκριση των τιμών απορρόφησης του δείγματος με τις απορροφήσεις προτύπων δειγμάτων (καμπύλη αναφοράς). Η απλούστερη τεχνική ατομικής απορρόφησης είναι η φλογοφασματομετρία ατομικής απορρόφησης. Όταν θέλουμε να περιορίσουμε την επίδραση ορισμένων παρεμποδίσεων χρησιμοποιούμε το φούρνο γραφίτη για την ατομοποίηση του δείγματος.[25] Σε αυτή την ενότητα θα αναφερθούν περιληπτικά οι διάφορες τεχνικές ατομοποίησης του δείγματος. Υπάρχουν δύο βασικές μεθοδολογίες που χρησιμοποιούνται στην ατομική απορρόφηση, οι οποίες βασίζονται στην διαφορετική τεχνική ατομοποίησης, ο φούρνος γραφίτη και η φλόγα. Οι δύο μέθοδοι μπορούν να καλύψουν ένα μεγάλο εύρος μέτρησης, ξεκινώντας από συγκεντρώσεις μικρότερες του 1 ng/L για το φούρνο γραφίτη μέχρι δεκάδων mg/L για τη φλόγα.

3.1.1 ΠΩΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΕΙ Η ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΑΤΟΜΙΚΗΣ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ

Τα άτομα κάθε μετάλλου έχουν ένα κεντρικό πυρήνα και ένα αριθμό ηλεκτρονίων γύρω από αυτόν κατανεμημένα σε στοιβάδες. Η πιο σταθερή κατάσταση των ατόμων είναι αυτή για την οποία απαιτείται η μικρότερη δυνατή ενέργεια και ονομάζεται βασική κατάσταση. Αν σε κάποιο άτομο προσπέσει εξωτερική ακτινοβολία συγκεκριμένου μήκους κύματος (το οποίο θα είναι διαφορετικό για το κάθε μέταλλο), τότε τα ηλεκτρόνια της εξωτερικής του στοιβάδας θα μετακινηθούν σε ανώτερες ενεργειακά στοιβάδες απορροφώντας την προσπίπτουσα ενέργεια. Η ποσότητα ενέργειας που απαιτείται για την μετάβαση αυτή, είναι ευθέως ανάλογη της συγκέντρωσης του μετάλλου (Pecsok et al.,1980). Η νέα αυτή κατάσταση των ατόμων ονομάζεται διεγερμένη κατάσταση και είναι εξαιρετικά ασταθής. Τα άτομα τείνουν να αποβάλλουν την ενέργεια που απορρόφησαν για να επανέλθουν στη βασική τους κατάσταση.

Τοποθετώντας στο φασματοφωτόμετρο ατομικής απορρόφησης το δείγμα προς ανάλυση συμβαίνουν οι εξής διαδικασίες. Αρχικά μέσα από την κυψελίδα η οποία περιέχει το δείγμα προς ανάλυση περνά μια λεπτή δέσμη ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας που αποτελείται από το φάσμα εκπομπής του υπό ανάλυση στοιχείου. Όταν τα άτομα είναι στη βασική τους κατάσταση απορροφούν φωτόνια χαρακτηριστικού μήκους κύματος από την ακτινοβολία που το διαπερνά, έτσι είναι δυνατό να μετρηθεί πόση ακτινοβολία απορρόφησε

λόγο της εξασθένησης της έντασης της ακτινοβολίας που προσπίπτει στο δείγμα είναι ανάλογη των ατόμων που περιείχε το δείγμα προς ανάλυση. Οπότε η απορρόφηση A είναι ίση με τον λογάριθμο την προσπίπτουσας ακτινοβολίας προς την ακτινοβολία που διαπερνά την κυψελίδα.

Το κάθε φασματοφωτόμετρο ατομικής απορρόφησης περιέχει μια πηγή ακτινοβολίας, μια κυψελίδα ατομοποίησης, ένα μονοχρωμάτορα και ένα ανιχνευτή. Οι πηγές ακτινοβολίας αποτελούνται από το γραμμικό φάσμα εκπομπής του υπό ανάλυση στοιχείου. Πιο συχνά συνατώνται οι λυχνίες κοίλης καθόδου, στο εσωτερικό τους έχουν μια κυλινδρική κάθοδος η οποία είναι ολικά η μερικά επικαλυμμένη με το υπό ανάλυση στοιχείο. Η άνοδος και η κάθοδος είναι κλεισμένες σε περίβλημα το οποίο περιέχει ένα αδρανές αέριο.

Στα φασματοφωτόμετρα μπορούν να συνδεθούν από μια έως και έξι διαφορετικές λυχνίες, έτσι ώστε να είναι εφικτό να χρησιμοποιείται η μια ενώ οι άλλες προθερμαίνονται. Για την σωστή λειτουργία του φασματοφωτόμετρου απλής δέσμης πρέπει να γίνεται πρώτα η προθέρμανση πριν την χρήση του έτσι ώστε να μην υπάρχουν μεγάλες αποκλίσεις από την γραμμή βάσης, κάτι το οποίο δεν είναι απαραίτητο στα φασματοφωτόμετρα διπλής δέσμης. Στα φασματοφωτόμετρα διπλής δέσμης το φως διέρχεται εναλλάξ μέσω του δείγματος και μέσω του αναφορικού. Στη φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης το δείγμα πρέπει να είναι σε ατομική μορφή και στην αέρια κατάσταση. Για να γίνει η μετατροπή του δείγματος σε αυτή την κατάσταση υπάρχουν τρεις διαφορετικοί τρόποι:

1. Με την ύπαρξη φλόγας
2. Με ηλεκτροθερμική διάσπαση των μορίων σε φούρνο γραφίτη
3. Μέσω μιας γεννήτριας υδριδίων

1) Ατομοποίηση με φλόγα, η ατομοποίηση του δείγματος γίνεται λόγω της απορρόφησης θερμικής ενέργειας και στη συνέχεια διάσπαση των μοριακών δεσμών, καύσιμο αέριο αναμιγνύεται με ένα διάλυμα του δείγματος, αφού πρώτα έχει γίνει εκνέφωση του σε μια ροή οξειδωτικού αερίου, και μεταφέρεται στη φλόγα όπου γίνεται η ατομοποίηση. Η φλόγα αποτελείται από την ζώνη πρωταρχικής καύσης, τη διαζωνική περιοχή και την δευτερεύουσα ζώνη καύσης.

2) Ηλεκτροθερμική ατομοποίηση σε φούρνο γραφίτη. Ο ηλεκτροθερμικός φούρνος αποτελείται από ένα ανοιχτό κύλινδρο φτιαγμένο από γραφίτη, η εισαγωγή του δείγματος γίνεται μέσα από ένα άνοιγμα που έχει στο κέντρο του. Ο σωλήνας έχει μήκος περίπου 5 cm και εσωτερική διάμετρο μικρότερη από 1 cm. Όταν εισάγεται το δείγμα ο φούρνος θερμαίνεται αρχικά για να εξατμιστεί ο διαλυτής έπειτα η θερμοκρασία αυξάνεται ακόμα περισσότερο έτσι ώστε να αποτεφρωθεί το δείγμα, για να γίνει η ατομοποίηση του η θερμοκρασία αυξάνεται

απότομα. Το πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η υψηλή ευαισθησία και ο μικρός όγκος δείγματος που χρειάζεται.

3) Ατομοποίηση με γεννήτρια υδριδίων, η διαδικασία αυτή πρώτα μετατρέπει τα στοιχεία αυτά σε πτητικά υδρίδια, πιο συχνά χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του αρσενικού, αντιμονίου, κασσίτερου, σεληνίου, βισμούθιου και μολύβδου, έπειτα μεταφέρονται με την βοήθεια ενός αδρανούς αεριού σε ένα κατάλληλο κύλινδρο από χαλαζία. Ο κύλινδρος είναι τοποθετημένος πάνω από μια φλόγα, εκεί τα υδρίδια διασπώνται σε άτομα όπου μπορούν να απορροφήσουν φωτόνια και να διεγερθούν. Η επιλογή αυτής της μεθόδου γίνεται όταν απαιτείται αυξημένη ευαισθησία.

Υπάρχουν και άλλοι τρόποι ατομοποίησης οι οποίοι θα αναφερθούν μόνο ονομαστικά:

- Ατομοποίηση με εκκένωση λάμπης
- Ατομοποίηση ψυχρού ατμού

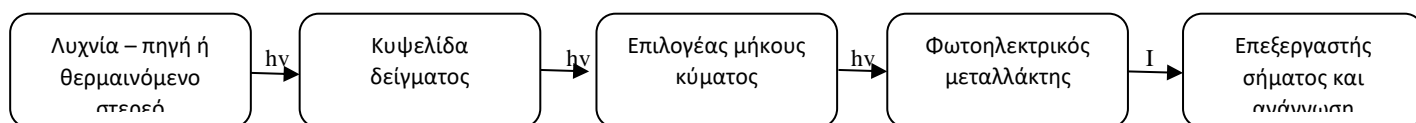
Πιθανές αιτίες σφαλμάτων στον προσδιορισμό των βαρέων μετάλλων. Η κυριότερη είναι η πρόσμιξη του δείγματος οπύ μπορεί να προέλθει:

- Από το σύστημα δειγματοληψίας
- Από τα δοχεία οπύ φυλάσσονται ή μεταφέρονται τα δείγματα
- Από το περιβάλλον του εργαστήριου (σκεύη, αιωρούμενα σωματίδια)
- Από τον αναλυτή
- Από τα χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια [25]

3.2 ΟΠΤΙΚΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΟΡΑΤΟΥ

3.2.1 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΟΠΤΙΚΩΝ ΟΡΓΑΝΩΝ

Σε έξι φαινόμενα βασίζονται οι οπτικές φασματοσκοπικές τεχνικές, στην απορρόφηση, στο φθορισμό, στο φωσφορισμό, στη σκέδαση, στη εκπομπή και στη χημειοφωταύγεια. Τα όργανα της φασματοσκοπίας αποτελούνται από πέντε τμήματα (α) από μια πηγή ακτινοβολίας, (β) από ένα οπτικώς διάφανο δοχείο, στο οποίο περιέχεται το δείγμα προς ανάλυση, (γ) μονάδα η οποία απομονώνει μια περιορισμένη περιοχή του προς μέτρηση φάσματος δηλαδή επιλεγεί μήκος κύματος, (δ) ανιχνευτή ακτινοβολίας και (ε) μια μονάδα επεξεργασίας και απομόνωσης του σήματος



Σχήμα 3.1 Μέτρηση της απορρόφησης, πηγή εικόνας από SKOOG, HOLLER, NIEMAN, Αρχές της Ενόργανης Ανάλυσης, Κεφάλαιο 7, Σελίδα 169.

Τα φασματοφωτόμετρα απορρόφησης Υπεριώδους-Ορατού χωρίζονται σε μονής δέσμης και διπλής δέσμης. Η διαφορά τους είναι ότι τα διπλής δέσμης χωρίζουν την ακτινοβολία της πηγής σε δυο δέσμες. Η μια από αυτές περνάει μέσα από το προς μέτρηση δείγμα και η άλλη από ένα πρότυπο δείγμα.

Εδώ απλά αναφέρονται διαφορετικές πηγές ακτινοβολίας όπως οι συνεχείς πηγές, αυτές χρησιμοποιούνται ευρύτατα για φασματοσκοπία απορρόφησης και φθορισμού. Οι πηγές γραμμών, είναι πηγές οι οποίες εκπέμπουν διακριτές γραμμές, χρησιμοποιούνται στη φασματοσκόπια ατομικής και μοριακής φθορισμομετρίας και στη φασματοσκοπία Raman και τέλος πηγές λέιζερ.

Οι περισσότερες φασματοσκοπικές αναλυτικές τεχνικές χρειάζονται μια πηγή ακτινοβολίας η οποία όμως να αποτελείται από μια περιορισμένη, στενή και συνεχή ομάδα μηκών κύματος που ονομάζεται ζώνη ή ταινία. Βασικοί τύποι για την επιλογή μήκους κύματος είναι τα φίλτρα και οι μονοχρωμάτορες. Υπάρχουν δυο είδη φίλτρων, τα φίλτρα συμβολής και τα φίλτρα απορρόφησης. Τα φίλτρα απορρόφησης περιορίζονται στην ορατή περιοχή του φάσματος και είναι και πολύ πιο οικονομικά συγκριτικά με τα φίλτρα συμβολής, τα οποία χρησιμοποιούνται για την υπεριώδη, την ορατή και σε ένα σημαντικό τμήμα της υπέρυθρης περιοχής.

Για την σάρωση του φάσματος χρησιμοποιούνται οι μονοχρωμάτορες, αυτοί μπορούν να έχουν μια συνεχής μεταβολή του μήκος κύματος σε μια περιοχή του φάσματος ώστε να εκτελούν την φασματική σάρωση. Αυτή η σάρωση μπορεί να σε γίνει σε όλες τις περιοχές του φάσματος, την υπεριώδη, την ορατή και την υπέρυθη. Αυτό γίνεται λόγω της μηχανικής τους κατασκευής.

Τα δοχεία τοποθέτησης δείγματος οι κυψελίδες είναι απαραίτητες για όλες τις φασματοσκοπικές μελέτες, εκτός της φασματοσκοπίας εκπομπής. Οι κυψελίδες δειγμάτων πρέπει να παρασκευάζονται από υλικά διαπερατά από την ακτινοβολία της περιοχής μελέτης του φάσματος. Οι Erickson και Surles, προτείνουν να καθαρίζεται η εξωτερική επιφάνεια της κυψελίδας με ένα συγκεκριμένο τρόπο. Αρχικά πριν από την μέτρηση θα πρέπει να καθαρίζεται η επιφάνεια με ένα ειδικό χαρτί για φακούς το οποίο θα είναι βρεγμένο με μεθανόλη. Αφού καθαριστεί η κυψελίδα αφήνεται μέχρι να εξατμιστεί η μεθανόλη. Αφού γίνει η διαδικασία αυτή είμαστε πλέον σίγουροι ότι η επιφάνειά της κυψελίδας είναι καθαρή από ρύπους.

Σύμφωνα με τον νόμο LAMBERT-BEER γίνεται η μέτρηση της ακτινοβολίας που απορροφήθηκε.

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c, \text{ όπου}$$

A: είναι η απορρόφηση της ακτινοβολίας από τα μόρια του δείγματος

ϵ : είναι μια σταθερά αναλογίας που ονομάζεται συντελεστής μοριακής απορρόφησης σε $L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

b: είναι το μήκος της οπτικής διαδρομής σε cm

c: η συγκέντρωση των μορίων που απορροφούν σε mol/L

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

4.1.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4.1 ΠΡΟΠΕΙΡΑΜΑ

Το πρώτο βήμα για την εκπόνηση της πτυχιακής εργασίας ήταν να γίνει ένα προ πείραμα με τις συγκεντρώσεις που έχουν επιλεγθεί έτσι ώστε να παρατηρηθεί η διαδικασία ανάπτυξης του άλγους *Chlamydomonas reinhardtii* CC 1690 στις ακόλουθες 6 διαφορετικές συγκεντρώσεις Ni: 0,2, 2,01, 4,04, 6,06 8,07 και 10,76 mg Ni /L. Οι συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν ήταν οι παραπάνω και μια ακόμη ο μάρτυρας (control), ο οποίος δεν περιείχε το προς ανάλυση μέταλλο. Για κάθε συγκέντρωση έγιναν 3 επαναλήψεις έτσι ώστε να υπάρχει ένας αξιόπιστος μέσος ορός τιμών. Ο προσδιορισμός των καμπυλών ανάπτυξης πραγματοποιήθηκε μέσω της φασματοσκοπίας ορατού φωτός με μετρήσεις της οπτικής πυκνότητας στα 750 nm 3 φορές την ημέρα μέχρι να παρατηρηθεί η στατική φάση για την κάθε συγκέντρωση.



Εικόνα 1: Προπείραμα πτυχιακής εργασίας σε δοκιμαστικούς σωλήνες με βιδωτό καπάκι. Συνολικά 3 διαφορετικοί δοκιμαστικοί σωλήνες ανά συγκέντρωση Νικελίου

Παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος

Οι καλλιέργειες ήταν συνήθως των 3L. Αφού ολοκληρωνόταν η παρασκευή του θρεπτικού υποστρώματος που περιγράφεται στη συνέχεια, γινόταν η αποστείρωση στους 121 °C και πίεση 1,2 bar για 15 λεπτά. Έπειτα όταν η φιάλη έρθει σε θερμοκρασία δωματίου μπορούσε να γίνει ο εμβολιασμός της. Ο εμβολιασμός πραγματοποιούνταν σε γνώστη συγκέντρωση μετάλλου και με υγρή προκαλλιέργεια *Chlamydomonas reinhardtii* με όγκο εμβολίου που αντιστοιχεί στο 1-2% του όγκου της κύριας

καλλιέργειας. Η καλλιέργεια αναπτύσσεται για 5 μέρες σε ένα θάλαμο με σταθερό φως και θερμοκρασία 22 έως 25 °C.

Παρασκευή υγρής προκαλλιέργειας *Chlamydomonas reinhardtii*

Σε αποστειρωμένες συνθήκες πάντα παρασκευάζεται η υγρή προκαλλιέργεια του *Chlamydomonas reinhardtii*. Σε ένα αποστειρωμένο μπουκαλάκι τοποθετείται περίπου 40 ml αποστειρωμένο θρεπτικό υπόστρωμα TAP ένα μαγνήτη και στερεή καλλιέργεια *Chlamydomonas reinhardtii*. Αφήνεται να αναπτυχθεί στο θάλαμο σε θερμοκρασία 22-25 °C και σταθερό φωτισμό. Μετά από 4 μέρες είναι έτοιμο για χρήση.

Παρασκευή στερεής καλλιέργειας

Για την παρασκευή στερεής καλλιέργειας *Chlamydomonas reinhardtii* ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με την παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος, μόνο που στο τέλος προστέθηκε 1,5 % Agar. Οι στερεές καλλιέργειες ανανεώνονται περίπου κάθε 15 μέρες.

Προσθήκη ποσότητας μητρικού διαλύματος Νικελίου 10.000 ppm σε καλλιέργεια 3 λίτρων.

- Για τελική συγκέντρωση 0,02 mg Ni /L χρειάζομαι 0,06 ml Ni 10.000 ppm
- Για τελική συγκέντρωση 2,01 mg Ni /L χρειάζομαι 0,602 ml Ni 10.000 ppm
- Για τελική συγκέντρωση 4,04 mg Ni /L χρειάζομαι 1,212 ml Ni 10.000 ppm
- Για τελική συγκέντρωση 6,06 mg Ni /L χρειάζομαι 1,818 ml Ni 10.000 ppm
- Για τελική συγκέντρωση 8,07 mg Ni /L χρειάζομαι 2,42 ml Ni 10.000 ppm
- Για τελική συγκέντρωση 10,76 mg Ni /L χρειάζομαι 3,23 ml Ni 10.000 ppm

Τα προαναφερόμενα διαλύματα νικελίου αμέσως μετά την παρασκευή τους αποστειρωνόντουσαν με τη μέθοδο της διήθησης σε αποστειρωμένες μεμβράνες με διάμετρο πόρων 0,45 μm και ταυτόχρονη τοποθέτηση τους σε αποστειρωμένα φιαλίδια.

TAP medium for *Chlamydomonas reinhardtii* είναι το θρεπτικό υπόστρωμα για υγρή καλλιέργεια 3 λίτρων και ρύθμιση pH από 7,0 έως 7,2

- 7,26 g Tris Base
- 3 ml Phosphate Buffer
- 3 ml Hutner's trace elements
- 30 ml Solution A
- 3 ml Acetic Acid

Παρασκευή Solution A για τελικό όγκο 1 λίτρο.

- 40.0 gr NH_4Cl
- 10.0 gr $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
- 5.0 gr $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

Παρασκευή Phosphate Buffer για τελικό όγκο 1 λίτρο

- 136,77 gr $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$
- 54,8 gr KH_2PO_4

Παρασκευή Hutner's trace elements για τελικό όγκο 100 ml

- 5g EDTA disodium salt σε 25 ml νερό απιονισμένο
- 2,2 gr $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ σε 10 ml νερό απιονισμένο
- 1,14 g H_3BO_3 σε 20 ml νερό απιονισμένο
- 0,506 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ σε 5 ml νερό απιονισμένο
- 0,161 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ σε 5 ml νερό απιονισμένο
- 0,157 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ σε 5 ml νερό απιονισμένο
- 0,110 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7 \text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ σε 5 ml νερό απιονισμένο
- 0,499 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ σε 5 ml νερό απιονισμένο

Αφού παρασκευαστεί πρέπει να φυλάσσετε σε σκοτεινό μέρος και να αναδεύεται μία φορά την ημέρα για 15 μέρες και μετά είναι έτοιμο για χρήση.



Εικόνα 2: Γυάλινη φιάλη συνολικής χωρητικότητας 5 λίτρων, εμβολιασμένη με Νικέλιο 8,07 mg/L στα 3 λίτρα θρεπτικού υποστρώματος

4.2 ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η συλλογή των κυττάρων πραγματοποιείται μετά από 5 μέρες με φυγοκέντρηση στα 4.000 g για 15 λεπτά στους 4° C. Τα κύτταρα πρέπει πάντα να διατηρούνται στους 4°C οπότε είναι τοποθετημένα σε τριμμένο πάγο καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος. Για την συλλογή των κυττάρων που απομένουν στα falcon (δοχεία συλλογής και αποθήκευσης) χρησιμοποιείται ένα buffer, το washing buffer.

Για την αποθήκευση των κυττάρων χρησιμοποιείται το breaking buffer το οποίο αποτελείται κυρίως από σουκρόζη και μικρή ποσότητα PMSF (phenylmethane sulfonyl fluoride). Για την καλύτερη διατήρηση των κυττάρων τα αποθηκεύουμε στον υπερκαταψύκτη. Συνθήκες -80°C. Για την επαναχρησιμοποίηση των κυττάρων πρέπει να ξεπαγώσουν σταδιακά μέσα σε τριμμένο πάγο περίπου 4°C.

Παρασκευή Washing Buffer για τελικό όγκο 500 ml και ρύθμιση pH στο 7,00

- 4,383g NaCl
- 1,576 g Tris HCl

Παρασκευή Breaking Buffer για τελικό όγκο 500 ml και ρύθμιση pH στο 7,00

- 136,8 g Sucrose, 0,8 M
- 3,94 g Tris HCl , 50 mM

Παρασκευή PMSF για τελικό όγκο 100ml

- 3,48 g PMSF , 0,2 M

4.3 ΧΩΝΕΥΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Για την χώνευση των κυττάρων πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις. Η διαδικασία αυτή χωριζόταν σε δυο φάσεις. Μία με EDTA και μια χωρίς, με ασθενές HCl . Τα αποτελέσματα λήφθηκαν μέσω της ατομικής απορρόφησης, δηλαδή να διαπιστωθεί πόσο από το βαρέο μέταλλο έχει εισέρθει στο κύτταρο και πόσο παρέμεινε εκτός.

Αρχικά αφήνεται να ξεπαγώσει το δείγμα το οποίο ήταν στον υπερκαταψύκτη, τα δείγματα ήταν περίπου 1 με 2 g κύτταρα από κάθε συγκέντρωση. Έπειτα ζυγίζονται τα falcon άδεια. Τα κύτταρα πρέπει να διατηρούνται στους 4°C. Προστίθεται washing buffer για το ξέπλυμα τους

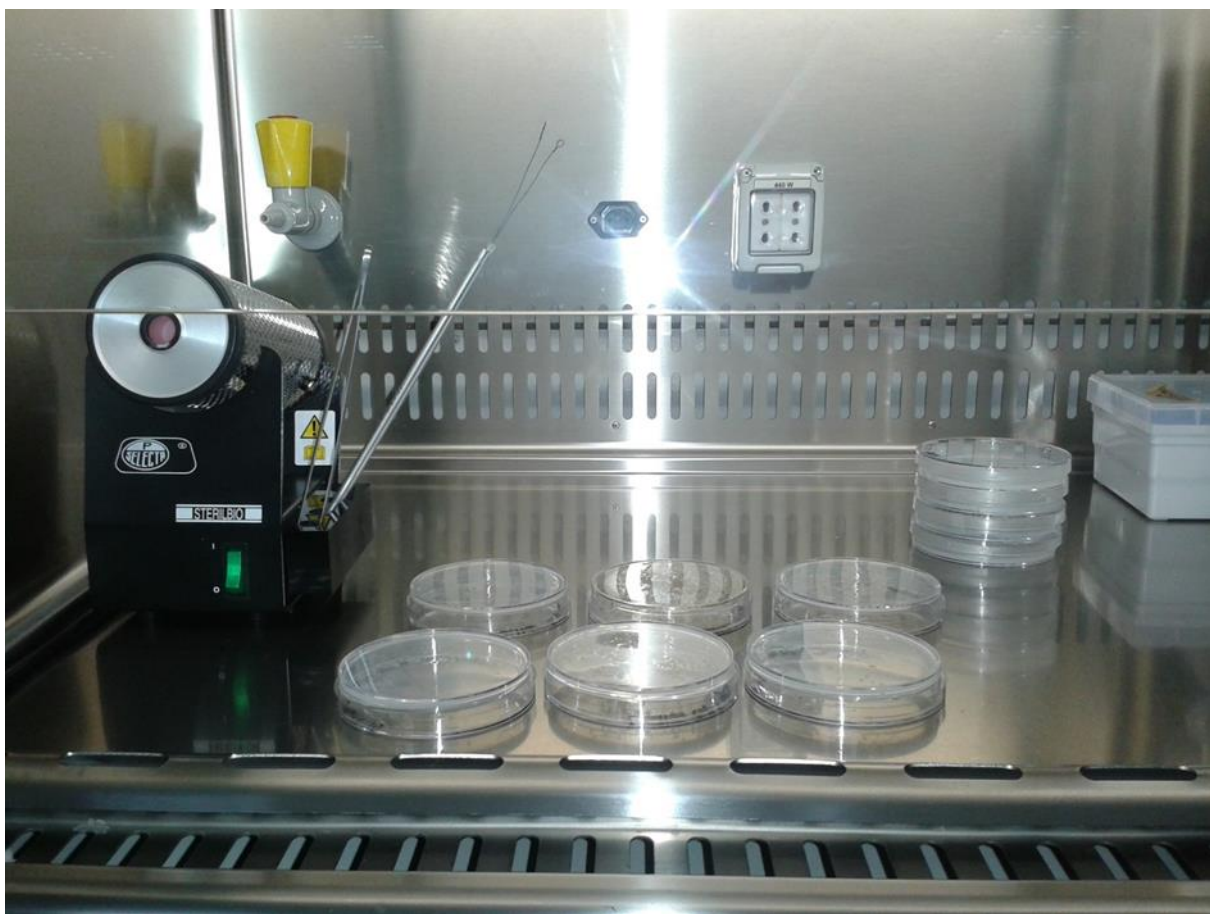
και μετά πραγματοποιούταν η φυγοκέντρηση στα 8000g για 10min στους 4°C. Το υπερκείμενο από την πρώτη φυγοκέντρηση απορρίπτεται και τα κύτταρα (pellet) που απομένουν χρησιμοποιούνται στη συνέχεια της πεισματικής διαδικασίας. Το Pellet ζυγίζεται και προστίθεται 10 φορές η μάζα των κυττάρων σε Tris-HCl(x.EDTA) και Chelating Buffer (EDTA) χωριστά. Αναδιασπείρεται και αφήνεται να επωαστεί για 10min στους 4°C. Έπειτα φυγοκεντρείται ξανά για 10 λεπτά στα 8000g στους 4°C. Το υπερκείμενο κρατείται και σημειώνεται ημερομηνία συγκέντρωση μετάλλου και εάν περιέχει EDTA. Ζυγίζονται τα κενά falcon και καταγράφεται την ένδειξη. Τα κύτταρα (pellet) που απομένουν τοποθετούνται στο φούρνο ξήρανσης μέχρι την επόμενη μέρα. Αφαιρώντας τα δείγματα από το φούρνο πρέπει να είναι σε θερμοκρασία δωματίου για να καταγραφεί η τιμή, έτσι γνωρίζοντας την μάζα του κενού falcon μπορούμε να υπολογίσουμε την ξερή μάζα των κυττάρων μας.

Επόμενο βήμα είναι η χώνευση. Σε κάθε δείγμα χωριστά προστέθηκε 6 ml πυκνό νιτρικό οξύ μέσα στις οβίδες και τοποθετήθηκαν πάνω σε θερμαντικές πλάκες στους 80°C για ένα βράδυ. Την επομένη τα μεταφέρονται σε τελικό όγκο 25ml όπου και θα γίνει η μέτρηση της ατομικής απορρόφησης.

Το χρονοδιάγραμμα για αυτή την διαδικασία ήταν μέχρι και τον Ιούλιο, όπου και παραδόθηκαν τα δείγματα στο καθηγητή για να μετρηθούν μέσω της ατομικής απορρόφησης στο Πολυτεχνείο Κρήτης, στο τμήμα Μηχανικών Ορυκτών Πόρων.

Κατά την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας δεν υπήρξε κάποιο σημαντικό πρόβλημα. Δύο φορές όμως οι καλλιέργειες ήταν μολυσμένες από κάποιο βακτήριο, οπότε έπρεπε να αποστειρωθούν στο κλίβανο και μετά στα απόβλητα. Το ότι ήταν μολυσμένες ήταν φανερό με το μάτι διότι η φιάλη είχε αφρούς και επίσης ήταν αντιληπτό μέσω της δυσάρεστης οσμής που είχε η φιάλη μόλις άνοιγε το πάμα. Ο λόγος ο οποίος οδήγησε στη μόλυνση της καλλιέργειας δεν είναι γνωστός, συνήθως οφείλεται στη μη αποτελεσματική αποστείρωση των αντικειμένων που χρησιμοποιήθηκαν και σε κάποιο λάθος ή απροσεξία χειρισμού κατά την διάρκεια του εμβολιασμού της καλλιέργειας.

Όσο αφορά τα πειράματα γενικά χρειάστηκε πολύ οργάνωση, διότι κάποιο αντιδραστήριο για να ετοιμαστεί μπορεί να χρειάζοταν από μια ώρα έως 15 ημέρες, οπότε η μεθοδικότητα και η σωστή χρήση και παρασκευή αντιδραστηρίων είναι πολύ σημαντική για την γρήγορη και αποτελεσματική διεκπεραίωση του πειράματος.



Εικόνα 3: Απαγωγός Κάθετης Νηματικής Ροής, εδώ πραγματοποιούνται οι διεργασίες σε αποστειρωμένες συνθήκες

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Σε αυτό το κεφάλαιο είναι αναλυτικά τα διαγράμματα για κάθε συγκέντρωση που μελετήθηκε. Για την πραγματοποίηση αυτού του προ πειράματος έγιναν τρεις διαφορετικές μετρήσεις για κάθε συγκέντρωση, τρεις φορές την ημέρα έτσι ώστε να παρθεί ένα αξιόπιστο αποτέλεσμα με μετρήσεις της οπτικής πυκνότητας στα 750nm. Έπειτα για να γίνουν τα αντίστοιχα διαγράμματα έπρεπε πρώτα να υπολογισθεί ο μέσος όρος των τιμών. Για να ολοκληρωθούν οι μετρήσεις χρειάστηκαν δέκα μέρες περίπου, μέχρι δηλαδή να παρατηρηθεί η στατική φάση σε κάθε περίπτωση.

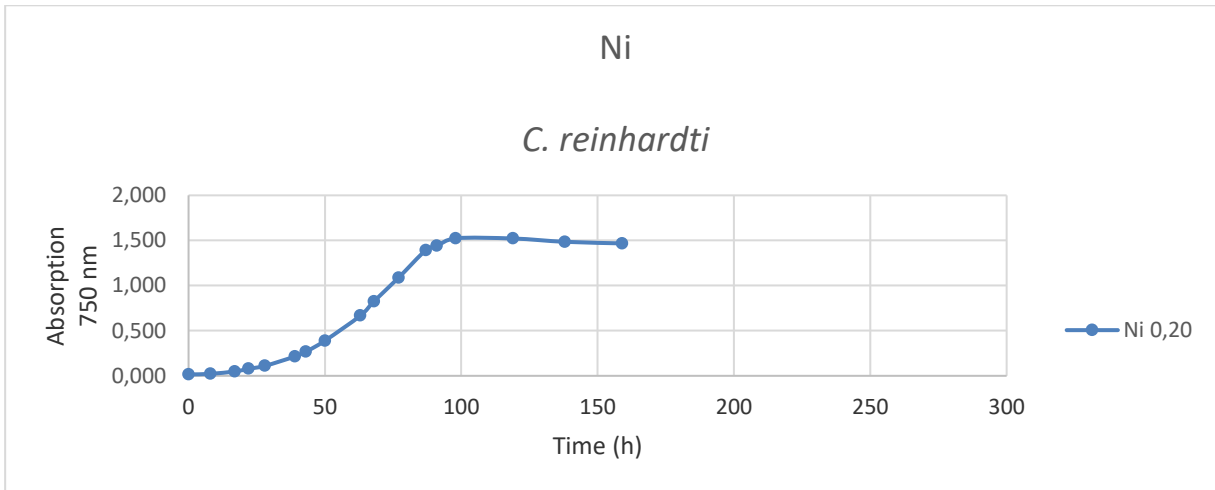


Εικόνα 4: Προπείραμα, η εικόνα παρουσιάζει τα δείγματα στην δέκατη μέρα του πειράματος όπου από το αριστερά προς τα δεξιά απεικονίζονται τα φιαλίδια με συγκέντρωση 0,2 mg/L, 2,01 mg/L, 4,04 mg/L, 6,06 mg/L, 8,07 mg/L, 10,76 mg/L και τέλος το πρότυπο (Control) το οποίο δεν περιέχει μέταλλο.

5.1 ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΟΥ *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* CC 1690

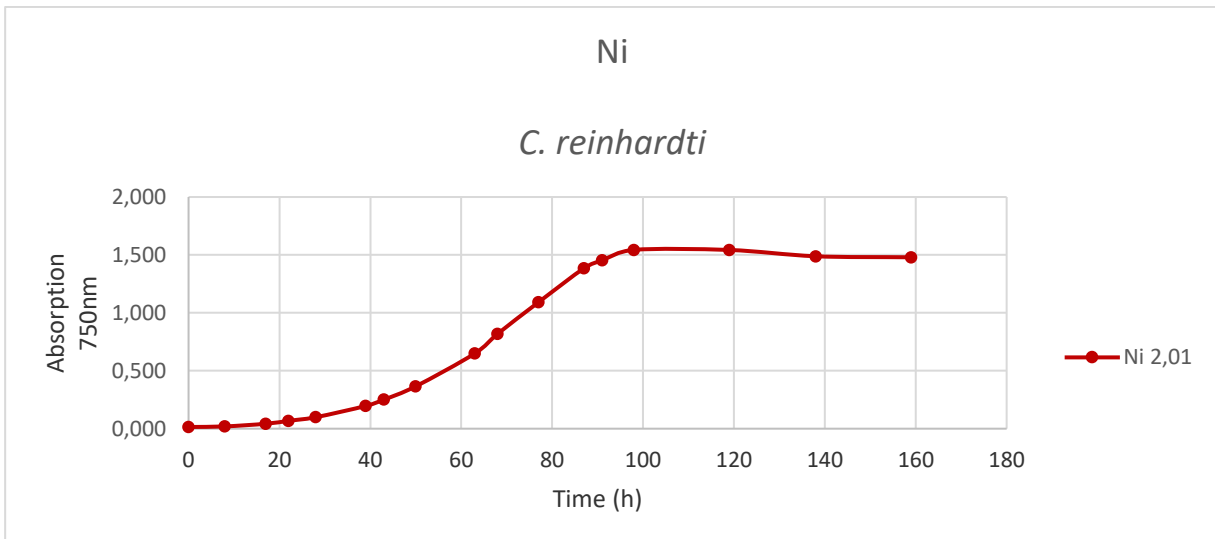
Στα διαγράμματα 1-7 παρουσιάζονται αναλυτικά οι καμπύλες ανάπτυξης για την κάθε συγκέντρωση 0,2 mg/L, 2,01 mg/L, 4,04 mg/L, 6,06 mg/L 8,07 mg/L 10,76 mg/L και το πρότυπο (Control) το οποίο δεν περιέχει μέταλλο μετά από 6 μέρες μετρήσεων εκτός από την συγκέντρωση 8,07 mg/L η οποία διάρκεσε 10 μέρες.

Το διάγραμμα 1 απεικονίζει την ανάπτυξη του άλγους *C. reinhardtii* CC 1690 με Νικέλιο 0,20 mg/L σε συνάρτηση με τον χρόνο



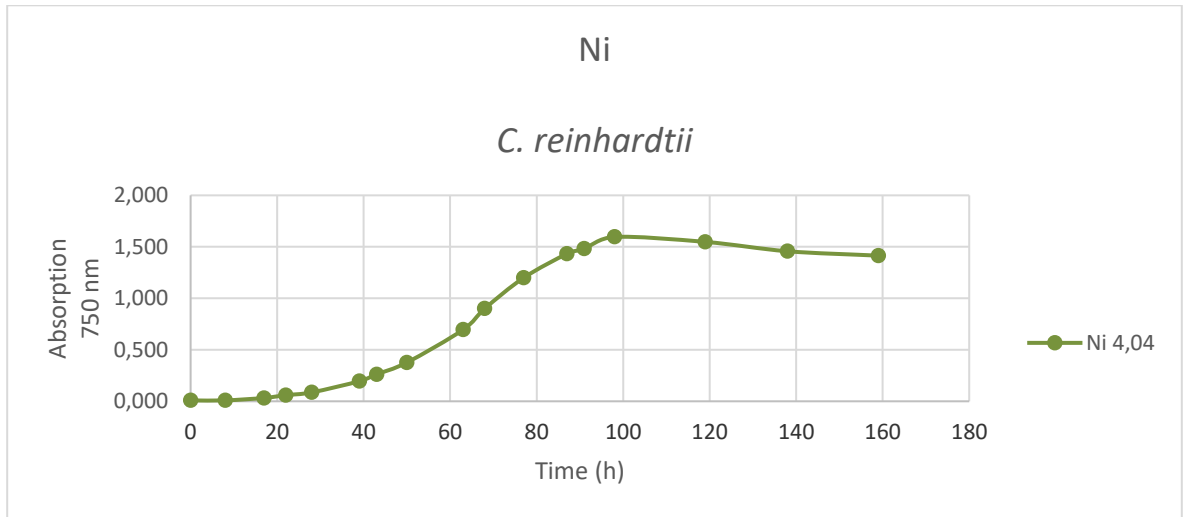
Διάγραμμα 1: Αποτελέσματα από την ανάπτυξη του άλγους *Chlamydomonas* CC 1690 με Νικέλιο 0,2 mg/L μετρημένα με το φωτόμετρο στα 750 nm τρεις φορές την ημέρα για έξι μέρες περίπου όπου παρατηρήθηκε η στατική φάση στη ανάπτυξη του οργανισμού.

Το διάγραμμα 2 απεικονίζει την ανάπτυξη του άλγους *C. reinhardtii* CC 1690 με Νικέλιο 2,01 mg/L σε συνάρτηση με τον χρόνο



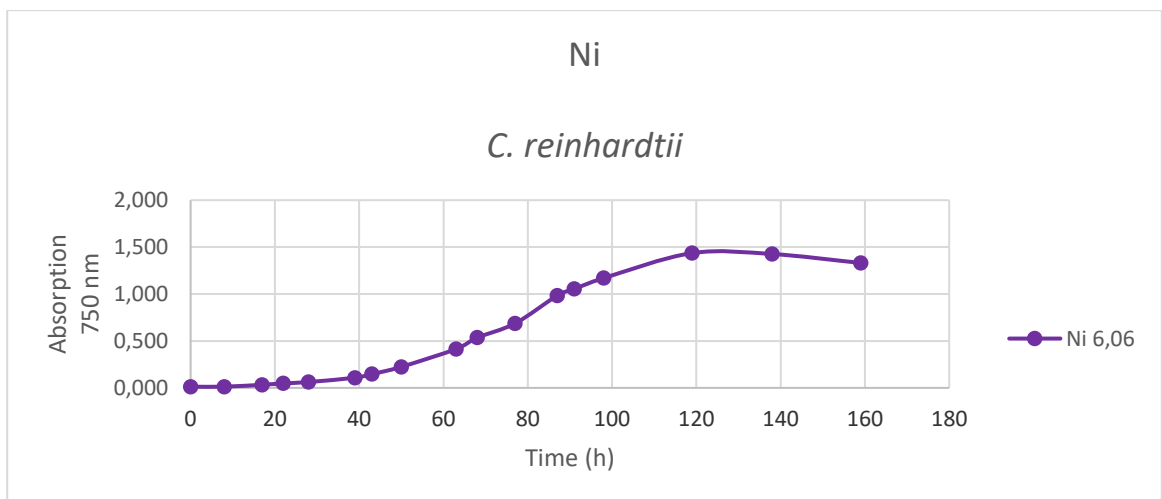
Διάγραμμα 2: Αποτελέσματα από την ανάπτυξη του άλγους *Chlamydomonas* με Νικέλιο CC 1690 2,01 mg/L μετρημένα με το φωτόμετρο στα 750 nm τρεις φορές την ημέρα για έξι μέρες περίπου. Μετά από 96 ώρες παρατηρήθηκε η στατική φάση στη ανάπτυξη του οργανισμού.

Το διάγραμμα 3 απεικονίζει την ανάπτυξη του άλγους *C. reinhardtii* CC 1690 με Νικέλιο 4,04 mg/L σε συνάρτηση με τον χρόνο



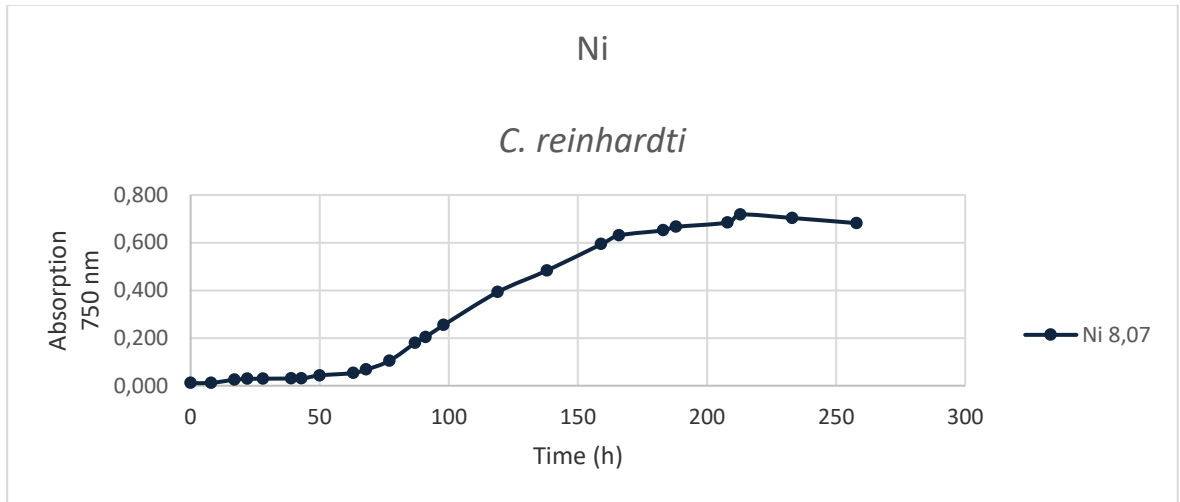
Διάγραμμα 3: Αποτελέσματα από την ανάπτυξη του άλγους *Chlamydomonas* CC 1690 με Νικέλιο 4,04 mg/L μετρημένα με το φωτόμετρο στα 750 nm τρεις φορές την ημέρα για έξι μέρες περίπου. Μετά από 96 ώρες παρατηρήθηκε η στατική φάση στη ανάπτυξη του οργανισμού.

Το διάγραμμα 4 απεικονίζει την ανάπτυξη του άλγους *C. reinhardtii* CC 1690 με Νικέλιο 6,06 mg/L σε συνάρτηση με τον χρόνο



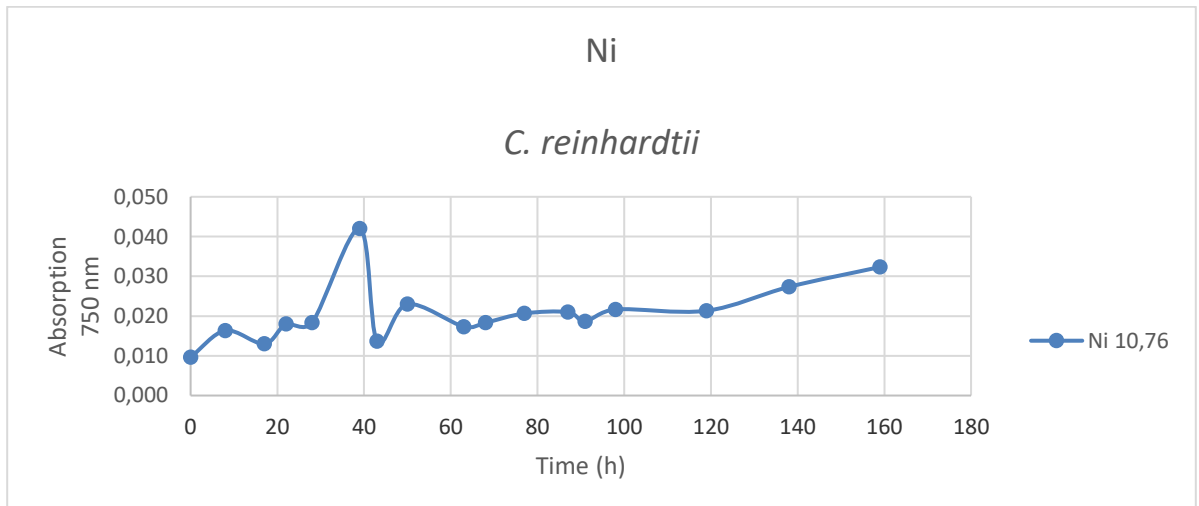
Διάγραμμα 4: Αποτελέσματα από την ανάπτυξη του άλγους *Chlamydomonas* CC 1690 με Νικέλιο 6,06 mg/L μετρημένα με το φωτόμετρο στα 750 nm τρεις φορές την ημέρα για έξι μέρες περίπου. Μετά από 120 ώρες παρατηρήθηκε η στατική φάση στη ανάπτυξη του οργανισμού.

Το διάγραμμα 5 απεικονίζει την ανάπτυξη του άλγους *C. reinhardtii* CC 1690 με Νικέλιο 8,07 mg/L σε συνάρτηση με τον χρόνο



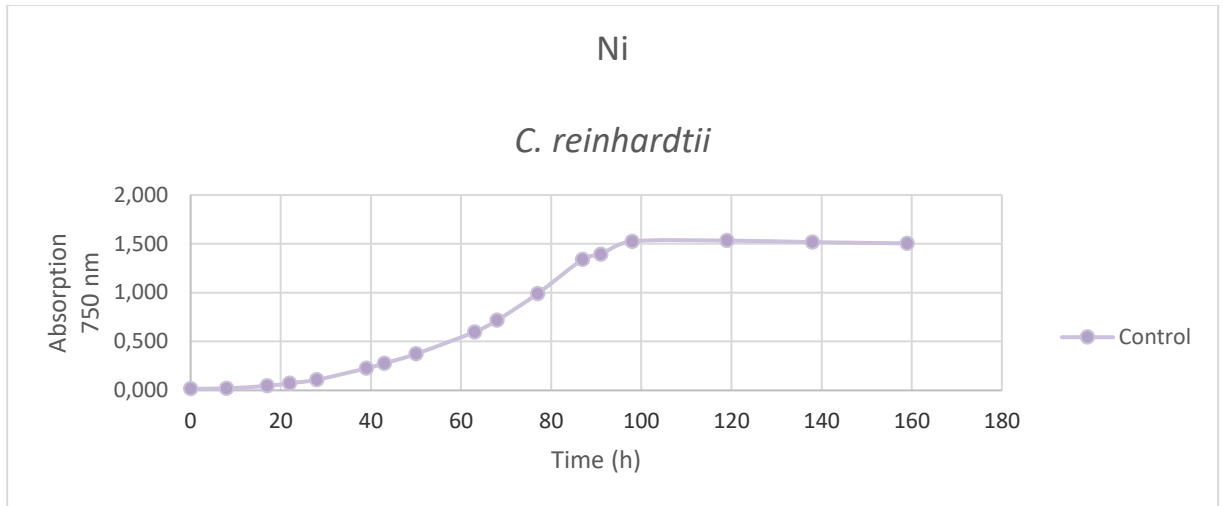
Διάγραμμα 5: Αποτελέσματα από την ανάπτυξη του στελέχους *Chlamydomonas* CC 1690 με Νικέλιο 8,07 mg/L μετρημένα με το φωτόμετρο στα 750 nm τρεις φορές την ημέρα για δέκα μέρες περίπου. Μετά από 160 ώρες παρατηρήθηκε η στατική φάση στη ανάπτυξη του οργανισμού.

Το διάγραμμα 6 απεικονίζει την ανάπτυξη του άλγους *C. reinhardtii* CC 1690 με Νικέλιο 10,76 mg/L σε συνάρτηση με τον χρόνο



Διάγραμμα 6: Αποτελέσματα από την ανάπτυξη του άλγους *Chlamydomonas* CC 1690 με Νικέλιο 10,76 mg/L μετρημένα με το φωτόμετρο στα 750 nm τρεις φορές την ημέρα για έξι μέρες περίπου. Δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη του οργανισμού σε αυτή την υψηλή συγκέντρωσή μετάλλου.

Το διάγραμμα 7 απεικονίζει την ανάπτυξη του άλγους *C. reinhardtii* CC 1690 σύμφωνα με το control (χωρίς προσθήκη μετάλλου) σε συνάρτηση με τον χρόνο



Διάγραμμα 7: Αποτελέσματα από την ανάπτυξη του άλγους *Chlamydomonas* CC 1690 χωρίς Νικέλιο μετρημένα με το φωτόμετρο στα 750 nm τρεις φορές την ημέρα για έξι μέρες περίπου. Μετά από 96 ώρες παρατηρήθηκε η στατική φάση στη ανάπτυξη του οργανισμού.

Παρατηρώντας τα παραπάνω διαγράμματα διαπιστώθηκε ότι το άλγος μπαίνει στη στατική φάση από την τέταρτη μέρα οπότε μετά από πέντε μέρες σε ένα θάλαμο με σταθερό φως και θερμοκρασία 22 με 25 °C μπορούσε να γίνει η πιο αποτελεσματική συλλογή των κυττάρων μέσω της φυγοκέντρωσης.

Πίνακας 1

Ωρες	Ni 0,20	Ni 2,01	Ni 4,04	Ni 6,06	Ni 8,07	Ni 10,76	Control
0	0,015	0,015	0,009	0,013	0,011	0,010	0,016
8	0,022	0,020	0,009	0,013	0,012	0,016	0,021
17	0,049	0,043	0,033	0,033	0,025	0,013	0,046
22	0,078	0,068	0,060	0,048	0,028	0,018	0,073
28	0,110	0,099	0,087	0,063	0,029	0,018	0,109
39	0,214	0,197	0,195	0,108	0,030	0,042	0,225
43	0,266	0,251	0,262	0,146	0,030	0,014	0,276
50	0,390	0,366	0,377	0,224	0,043	0,023	0,373
63	0,667	0,650	0,695	0,415	0,053	0,017	0,598
68	0,826	0,819	0,900	0,535	0,067	0,018	0,717
77	1,087	1,092	1,199	0,687	0,104	0,021	0,990
87	1,393	1,385	1,432	0,984	0,179	0,021	1,341
91	1,441	1,454	1,481	1,054	0,204	0,019	1,393
98	1,524	1,544	1,596	1,169	0,254	0,022	1,525
119	1,522	1,543	1,548	1,437	0,393	0,021	1,533
138	1,485	1,488	1,457	1,426	0,483	0,027	1,517
159	1,468	1,480	1,414	1,331	0,593	0,032	1,504
166					0,630		
183					0,651		
188					0,666		
208					0,684		
213					0,718		
233					0,703		
258					0,682		

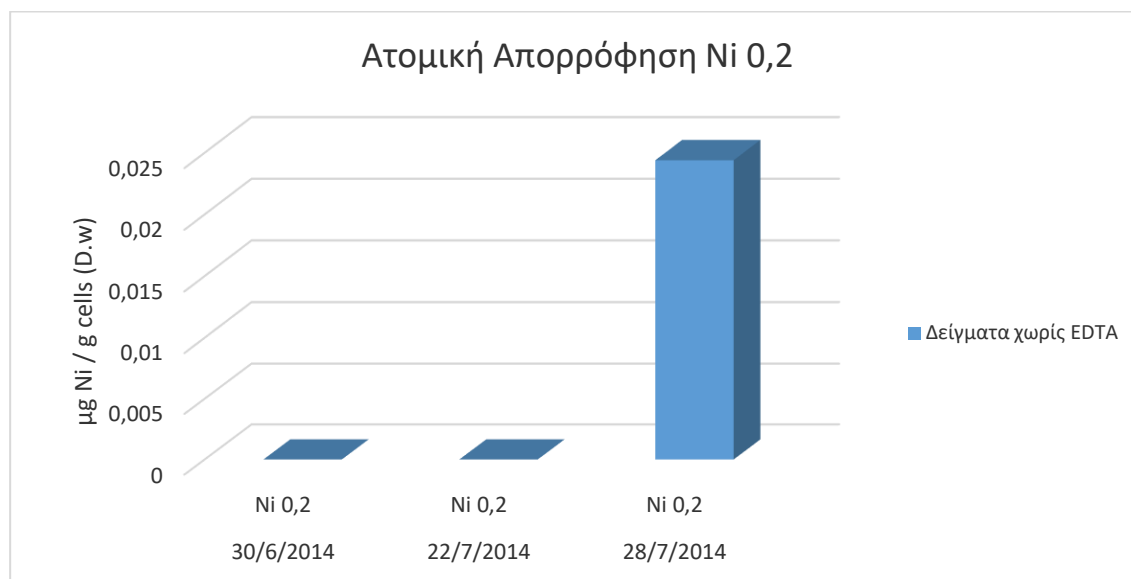
Πίνακας Δεδομένων Προπειράματος: ο παραπάνω πίνακας απεικονίζει τον μέσο ορό τιμών από 3 επαναλήψεις από την διαδικασία του προπειράματος. Σύμφωνα με αυτόν τον πίνακα δημιουργήθηκαν οι καμπύλες ανάπτυξης του *Chlamydomonas reinhardtii* στις 6 διαφορετικές συγκεντρώσεις νικελίου συν μια το πρότυπο (Control) το οποίο δεν περιείχε βαρέο μέταλλο.

5.2 ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ ΑΤΟΜΙΚΗΣ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ ΧΩΡΙΣ EDTA

Στην ενότητα αυτή παρουσιάζονται τα διαγράμματα από την μέτρηση της ατομικής απορρόφησης. Τα πρώτα έξι διαγράμματα είναι αποτελέσματα των κυττάρων ξηρής μάζας (dry weight) και τα υπόλοιπα έξι του υπερκείμενου τους (supernatant) χωρίς προσθήκη EDTA. Το οποίο όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω αποσπάει το Νικέλιο από τα κυτταρικά τοιχώματα.

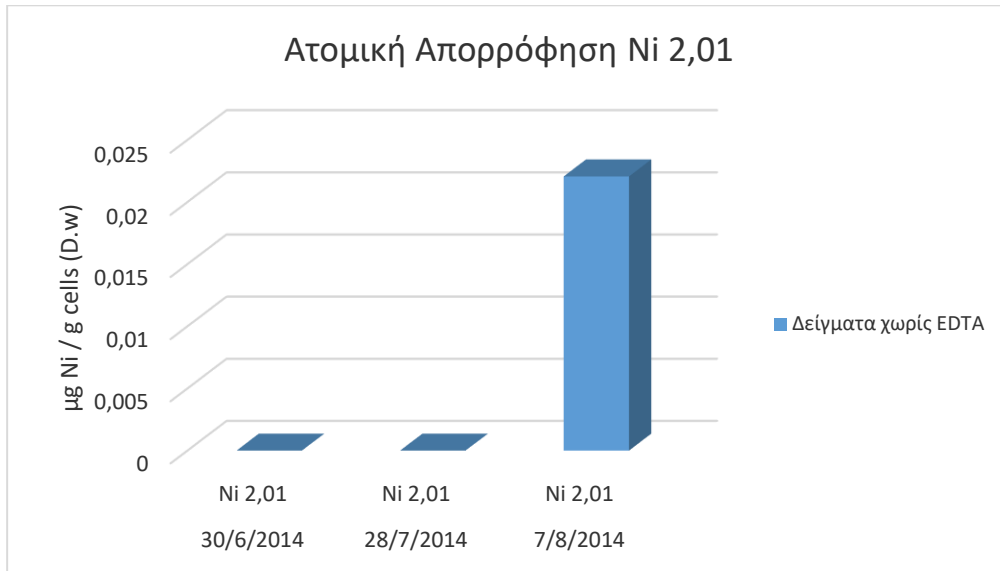
Τα διαγράμματα 1, 2 και 6 έχουν αποτελέσματα κοντά στο μηδέν το οποίο σημαίνει ότι μηδαμινή ή πολύ μικρή ποσότητα βαρέου μετάλλου έχει εισέλθει στο κύτταρο. Υπενθυμίζεται ότι τα αποτελέσματα των δειγμάτων χωρίς EDTA παρουσιάζουν το συνολικό μέταλλο που έχει το κύτταρο. Τα παρακάτω αποτελέσματα είναι των κυττάρων ξηρής μάζας (dry weight)

Το διάγραμμα 1 απεικονίζει τα αποτελέσματα από την ατομική απορρόφηση στη ξηρή μάζα του δείγματος με Νικέλιο 0,2 mg/L



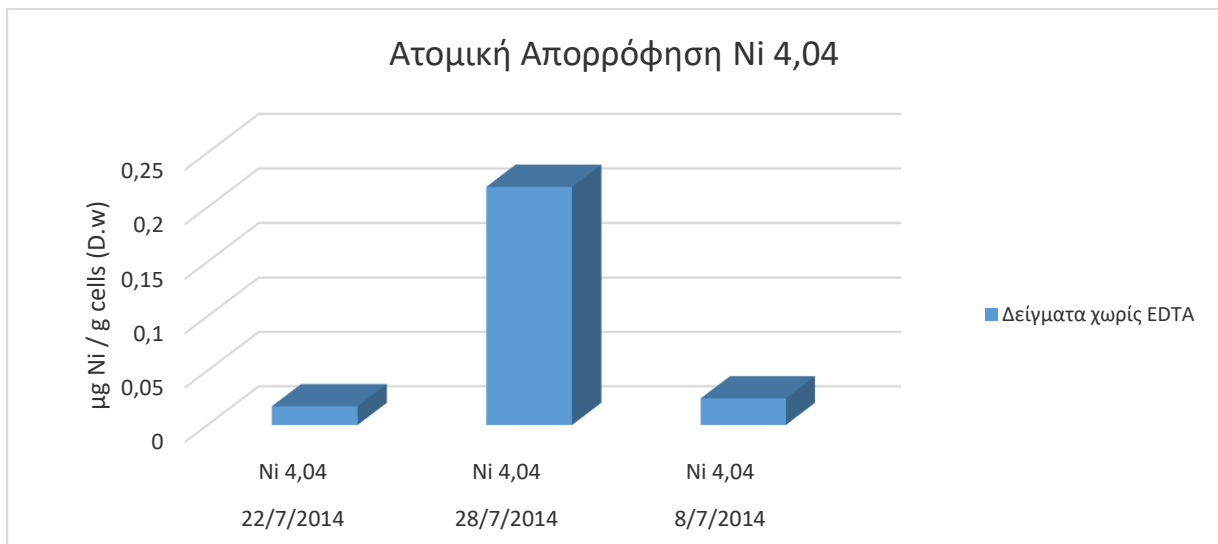
Διάγραμμα 1: Αποτελέσματα Ατομικής Απορρόφησης στο Ni 0,2 mg/L, οι μετρήσεις αφορούν στην ξηρή μάζα. Οι δυο επαναλήψεις είχαν μηδενικό αποτέλεσμα, ενώ η τρίτη είχε περίπου 0,025 μg Ni/g cells.

Το διάγραμμα 2 απεικονίζει τα αποτελέσματα από την ατομική απορρόφηση στη ξηρή μάζα του δείγματος με Νικέλιο 2,02 mg/L



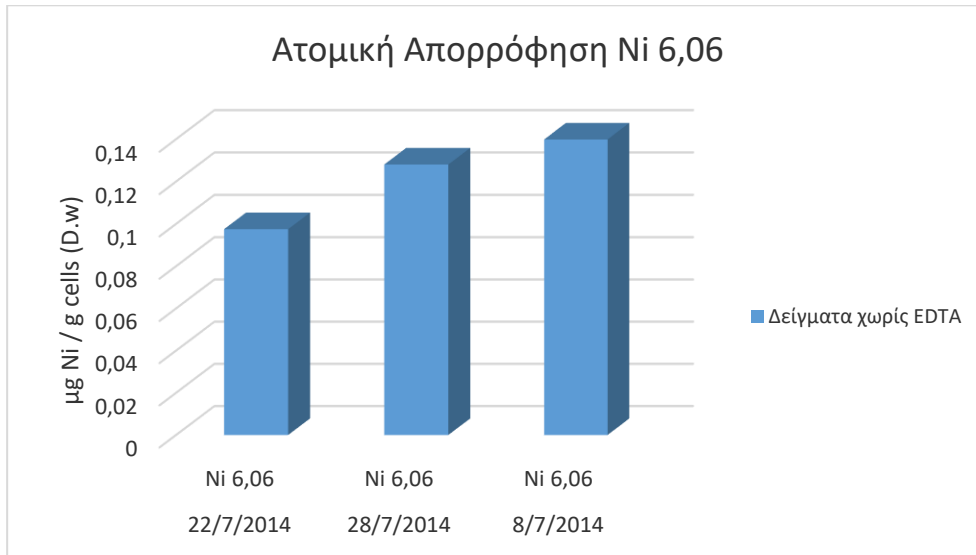
Διάγραμμα 2: Αποτελέσματα Ατομικής Απορρόφησης στο Ni 2,02 mg/L στην ξηρή μάζα και τα αποτελέσματα σε αυτήν συγκέντρωση είναι μηδενικά για τις δυο πρώτες ενώ η τρίτη είναι περίπου 0,025 µg Ni/g cells.

Το διάγραμμα 3 απεικονίζει τα αποτελέσματα από την ατομική απορρόφηση στη ξηρή μάζα του δείγματος με Νικέλιο 4,04 mg/L



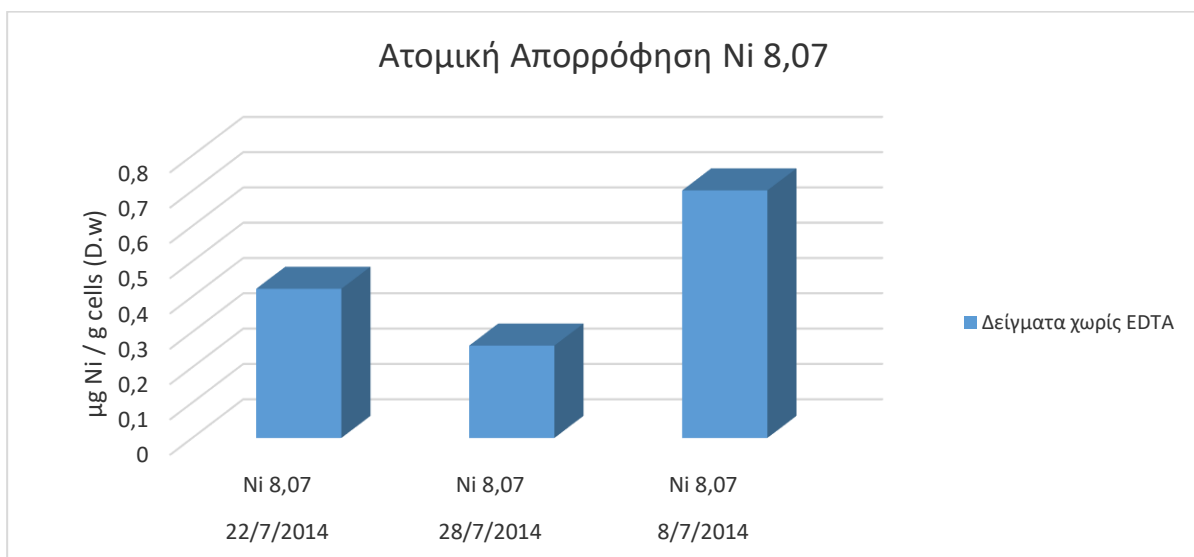
Διάγραμμα 3: Αποτελέσματα Ατομικής Απορρόφησης στο Ni 4,04 mg/L στην ξηρή μάζα. Εδώ παρατηρείται ότι οι δυο μετρήσεις έχουν κοντινά αποτελέσματα συγκριτικά με εκείνη που έγινε στις 28/7. Επίσης διαπιστώνεται μια αύξηση των τιμών στη συγκέντρωση του μετάλλου ξηρής μάζας συγκριτικά με τα διαγράμματα 1 και 2, το οποίο είναι και αναμενόμενο, όσο αυξάνεται η συγκέντρωση μετάλλου που περιβάλλει το κύτταρο τόσο θα αυξάνεται και η προσρόφηση του.

Το διάγραμμα 4 απεικονίζει τα αποτελέσματα από την ατομική απορρόφηση στη ξηρή μάζα του δείγματος με Νικέλιο 6,06 mg/L



Διάγραμμα 4: Αποτελέσματα Ατομικής Απορρόφησης στο Ni 6,06 mg/L στην ξηρή μάζα. Εδώ οι μετρήσεις έχουν μια μικρή διαφοροποίηση αλλά είναι πολύ κοντινές. Στο διάγραμμα 4 παρατηρείται μια αύξηση των τιμών στη συγκέντρωση του μετάλλου ξηρής μάζας συγκριτικά με το διάγραμμα 3, παρατηρείται ότι έχει αυξηθεί η μέτρηση περίπου 1,5 φορά και με μέσο όρο τιμών 0,12 mg/L στην ξηρή μάζα.

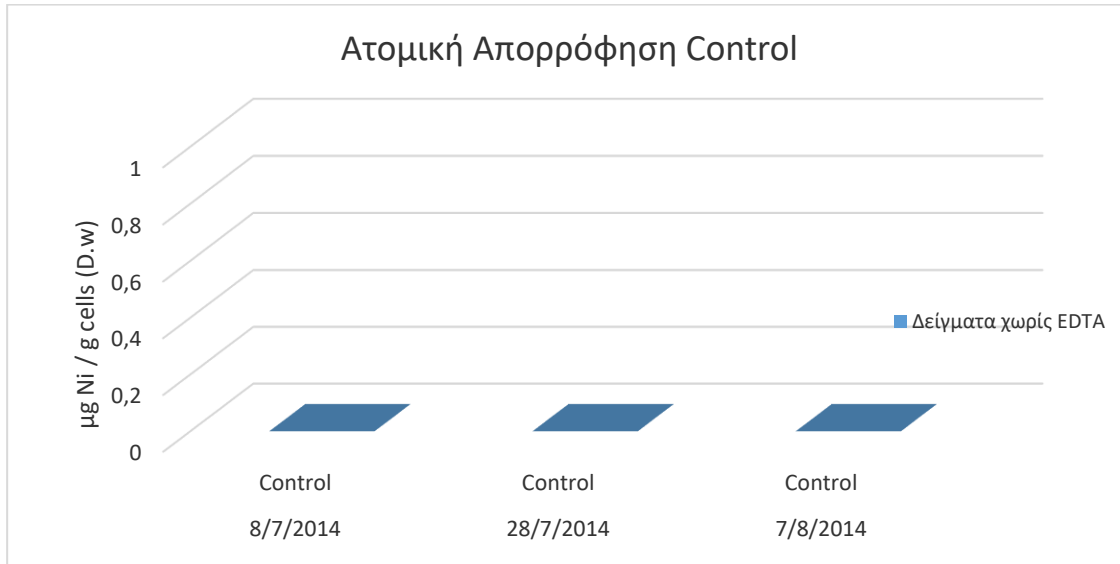
Το διάγραμμα 5 απεικονίζει τα αποτελέσματα από την ατομική απορρόφηση στη ξηρή μάζα του δείγματος με Νικέλιο 8,07 mg/L



Διάγραμμα 5: Αποτελέσματα Ατομικής Απορρόφησης στο Ni 8,07 mg/L στην ξηρή μάζα. Τα αποτελέσματα είναι και εδώ αρκετά κοντινά. Σε αυτό το διάγραμμα παρατηρείται η μέγιστη προσρόφηση μετάλλου στο κύτταρο με μέσο όρο τιμών στο 0.46 mg/L στην ξηρή

μάζα. Το οποίο σημαίνει ότι σε αυτή την υψηλή συγκέντρωση έχει 3,8 φορές μεγαλύτερη προσρόφηση στο κύτταρο συνολικά.

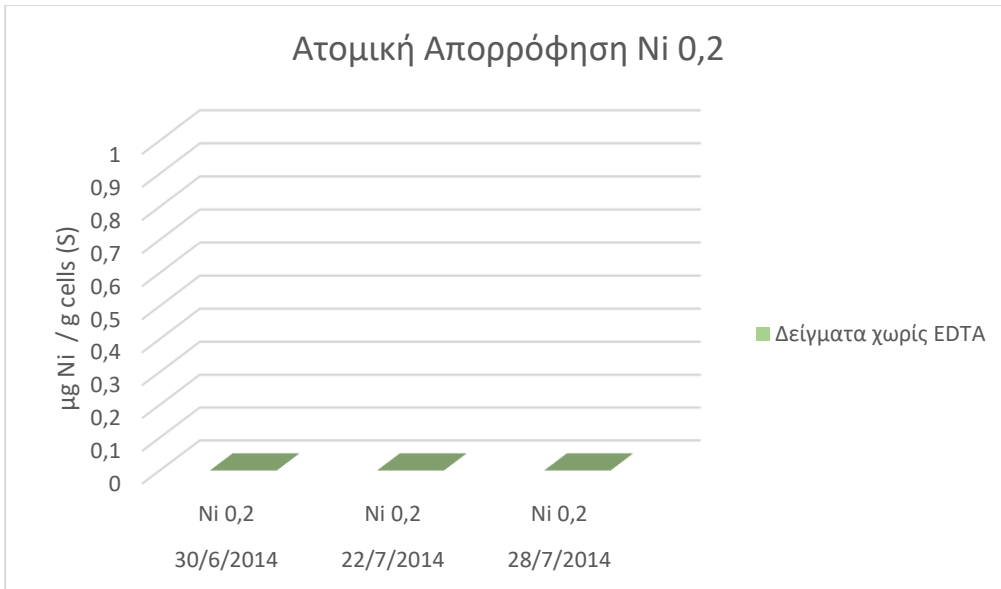
Το διάγραμμα 6 απεικονίζει τα αποτελέσματα από την ατομική απορρόφηση στη ξηρή μάζα του δείγματος στο Control (χωρίς προσθήκη γνωστής συγκέντρωσης μετάλλου)



Διάγραμμα 6: Αποτελέσματα Ατομικής Απορρόφησης στο Control στην ξηρή μάζα. Το αναμενόμενο αποτέλεσμα ήταν να είναι μηδενικές οι μετρήσεις όπως και έγινε λόγω του ότι δεν έχει προστεθεί κάποια συγκέντρωση Νικελίου.

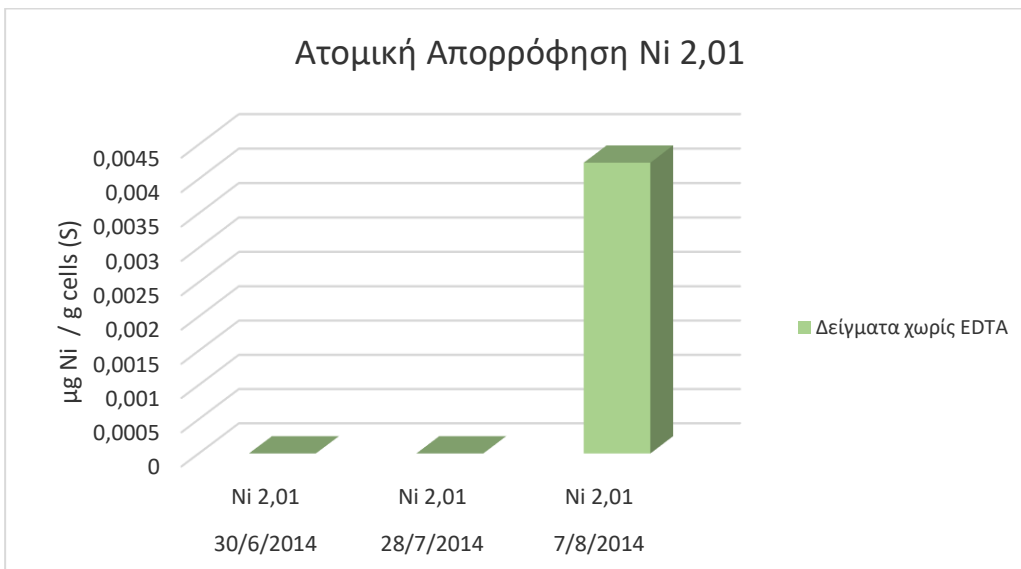
Τα διαγράμματα 7, 8 και 12 έχουν αποτελέσματα κοντά στο μηδέν το οποίο σημαίνει ότι μηδαμινή ή πολύ μικρή ποσότητα βαρέου μετάλλου έχει εισέλθει στο κύτταρο. Υπενθυμίζεται ότι τα αποτελέσματα των δειγμάτων χωρίς EDTA παρουσιάζουν το συνολικό μέταλλο που έχει το κύτταρο. Τα παρακάτω είναι αποτελέσματα των κυττάρων στο υπερκείμενο τους μετά από την διαδικασία της φυγοκέντρησης (supernatant).

Το διάγραμμα 7 απεικονίζει τα αποτελέσματα από την ατομική απορρόφηση στο υπερκείμενο του δείγματος με Νικέλιο 0,2 mg/L



Διάγραμμα 7 : Αποτελέσματα Ατομικής Απορρόφησης στο Ni 0,2 mg/L στο υπερκείμενο. Και οι τρεις επαναλήψεις είχαν μηδενικό αποτέλεσμα.

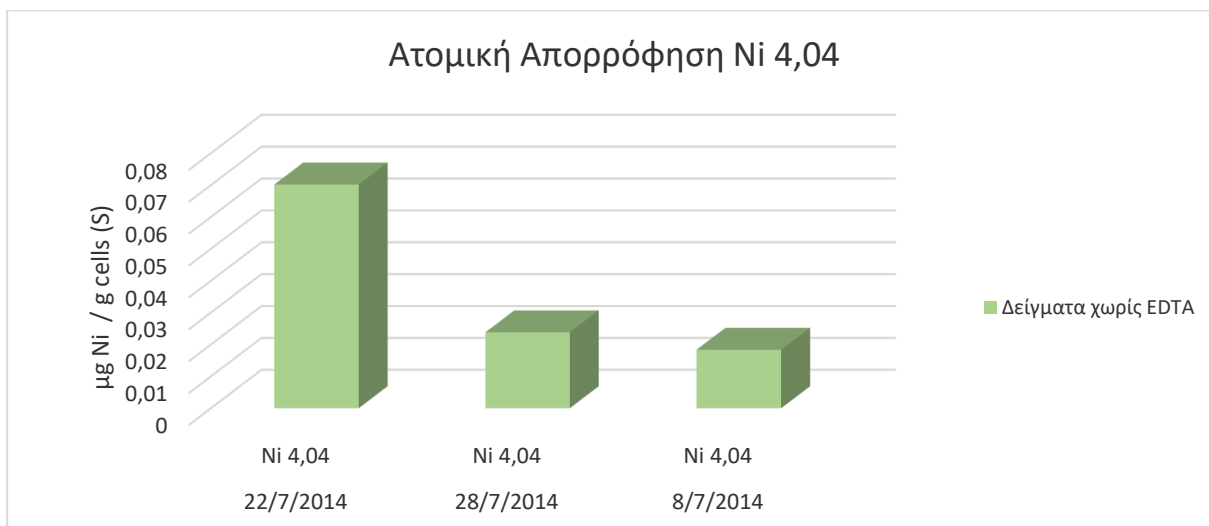
Το διάγραμμα 8 απεικονίζει τα αποτελέσματα από την ατομική απορρόφηση στο υπερκείμενο του δείγματος με Νικέλιο 2,01 mg/L



Διάγραμμα 8: Αποτελέσματα Ατομικής Απορρόφησης στο Ni 2,01 mg/L στο υπερκείμενο, εδώ οι δυο επαναλήψεις είχαν μηδενικό αποτέλεσμα ενώ η τρίτη είχε 0,0042 μg Ni/g cells (S).

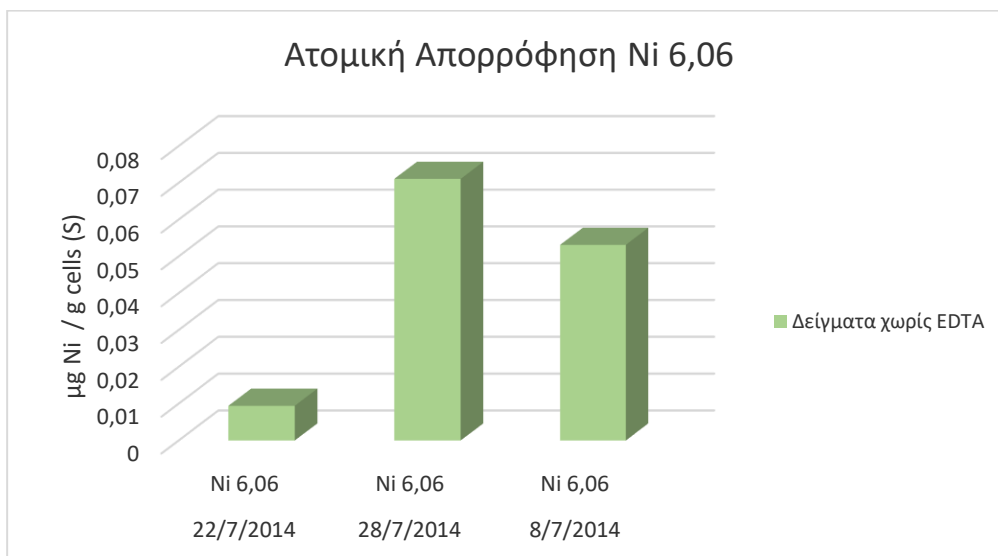
Στο διάγραμμα 9 και 10 παρατηρείται μια αύξηση των τιμών στο υπερκείμενο συγκριτικά με το διάγραμμα 8, η αύξηση είναι περίπου 26 φορές.

Το διάγραμμα 9 απεικονίζει τα αποτελέσματα από την ατομική απορρόφηση στο υπερκείμενο του δείγματος με Νικέλιο 4,04 mg/L



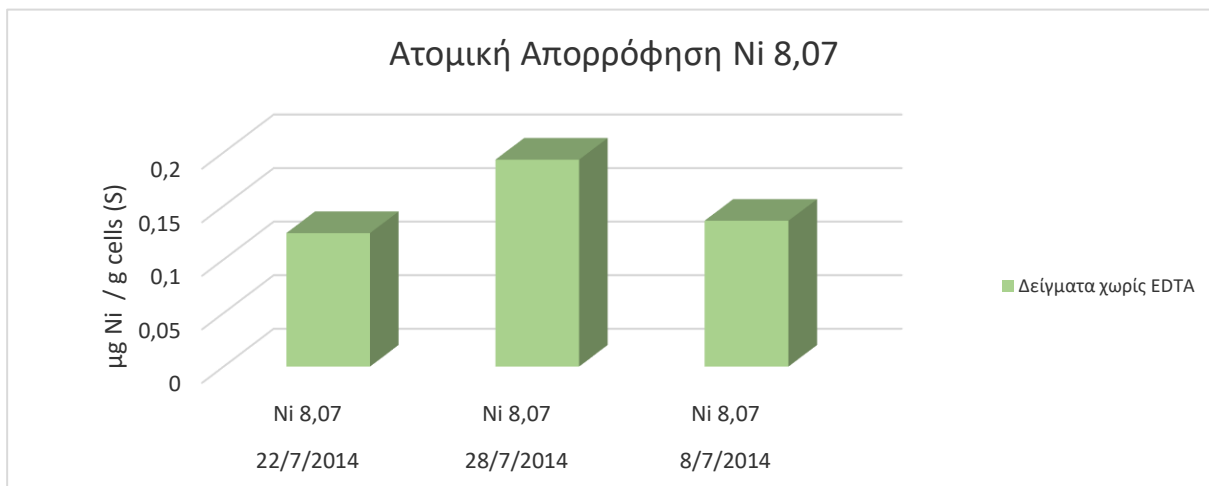
Διάγραμμα 9 : Αποτελέσματα Ατομικής Απορρόφησης στο Ni 4,04 mg/L στο υπερκείμενο. Οι μετρήσεις στις 28/7 και 8/7 είναι αρκετά κοντινές συγκριτικά με εκείνη στις 22/7 η οποία έχει διαφορά περίπου 0,051 μg Ni/g cells (S).

Το διάγραμμα 10 απεικονίζει τα αποτελέσματα από την ατομική απορρόφηση στο υπερκείμενο του δείγματος με Νικέλιο 6,06 mg/L



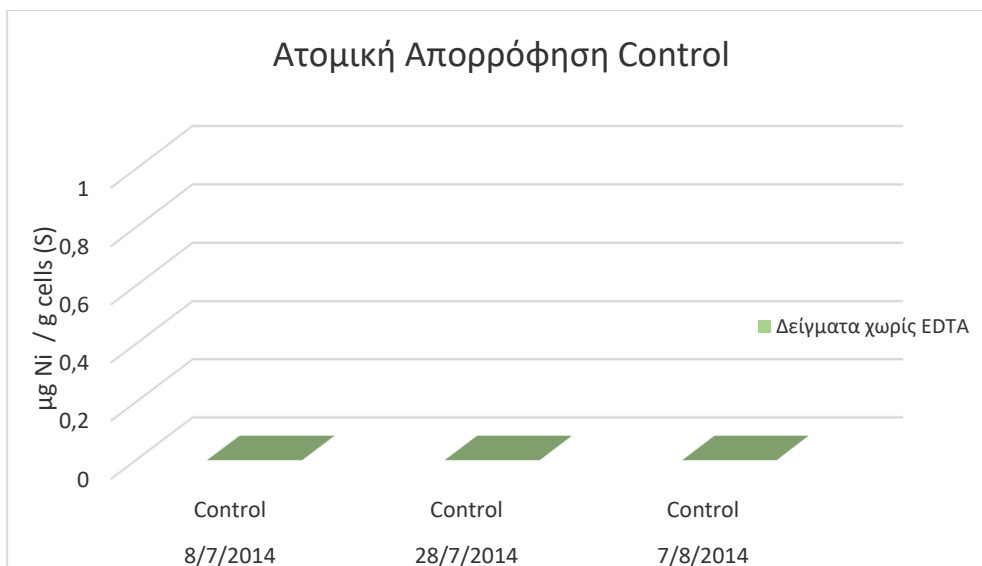
Διάγραμμα 10 : Αποτελέσματα Ατομικής Απορρόφησης στο Ni 6,06 mg/L στο υπερκείμενο, και εδώ παρατηρείται η διαφορά μεταξύ των δυο μετρήσεων συγκριτικά με εκείνη που έγινε στις 22/7 η διαφορά αυτή είναι περίπου 0,043717 μg Ni/g cells (S).

Το διάγραμμα 11 απεικονίζει τα αποτελέσματα από την ατομική απορρόφηση στο υπερκείμενο του δείγματος με Νικέλιο 8,07 mg/L



Διάγραμμα 11: Αποτελέσματα Ατομικής Απορρόφησης στο Ni 8,07 mg/L στο υπερκείμενο. Σε αυτή την περίπτωση οι τρεις επαναλήψεις είχαν κοντινά αποτελέσματα.

Το διάγραμμα 12 απεικονίζει τα αποτελέσματα από την ατομική απορρόφηση στο υπερκείμενο του δείγματος στο Control (χωρίς προσθήκη γνωστής συγκέντρωσης μετάλλου)



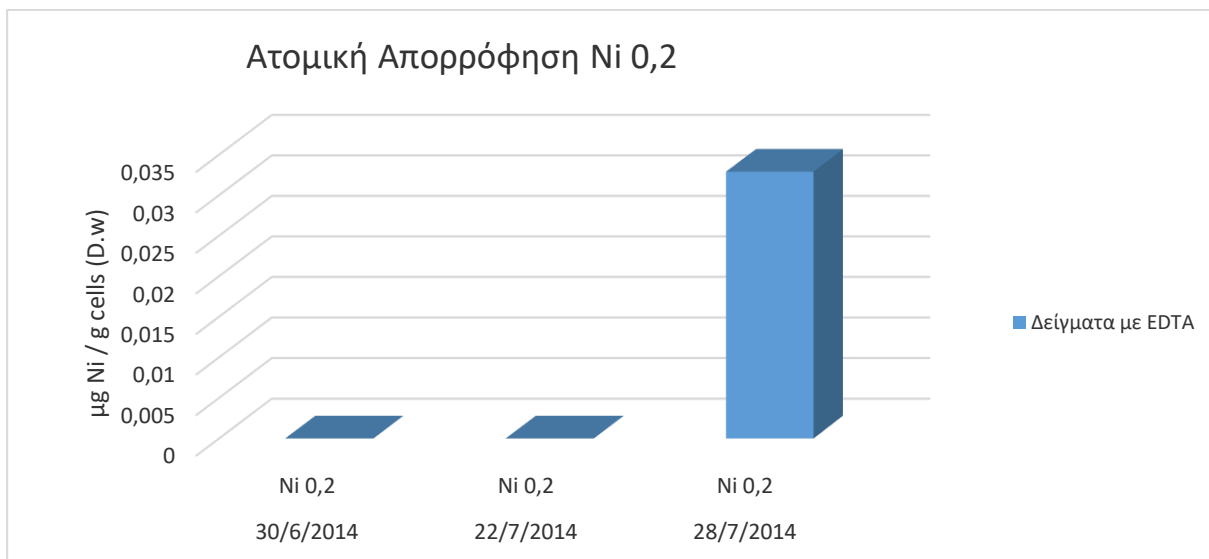
Διάγραμμα 12: Αποτελέσματα Ατομικής Απορρόφησης στο Ni Control στο υπερκείμενο εδώ τα αποτελέσματα είναι μηδενικά όπως το περιμέναμε.

5.3 ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ ΑΤΟΜΙΚΗΣ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ ΜΕ EDTA

Στην ενότητα αυτή παρουσιάζονται τα διαγράμματα από την μέτρηση της ατομικής απορρόφησης. Τα πρώτα έξι διαγράμματα είναι αποτελέσματα των κυττάρων ξηρής μάζας (dry weight) και τα υπόλοιπα έξι του υπερκείμενου τους (supernatant) με προσθήκη EDTA. Το οποίο όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω απομακρύνει από τα κυτταρικά τοιχώματα το

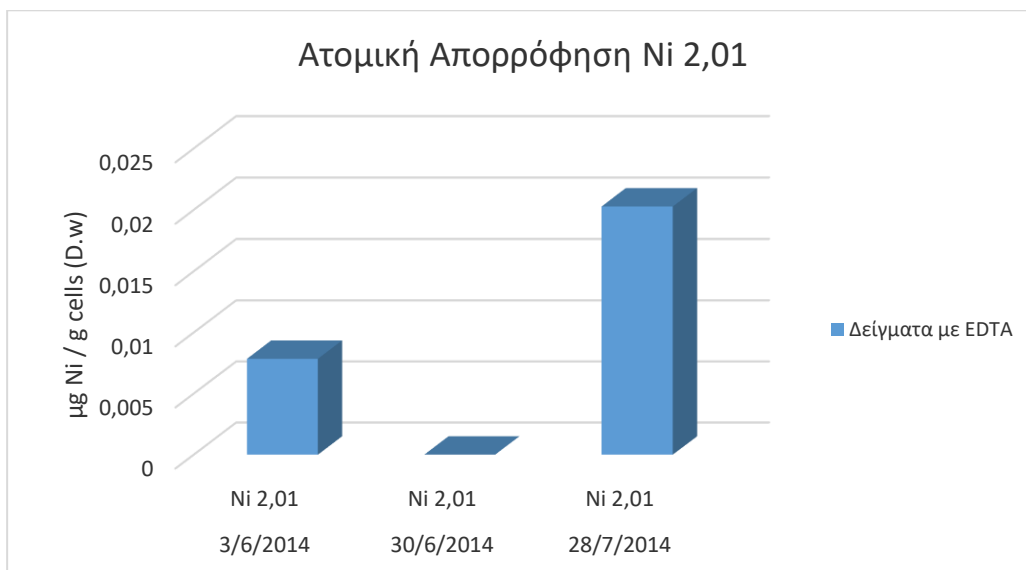
Νικέλιο οπότε έτσι είναι εύκολο να παρατηρηθεί πόσο βαρέο μέταλλο έχει εισέλθει στο κύτταρο.

Το διάγραμμα 1 απεικονίζει τα αποτελέσματα από την ατομική απορρόφηση στη ξηρή μάζα του δείγματος με Νικέλιο 0,2 mg/L



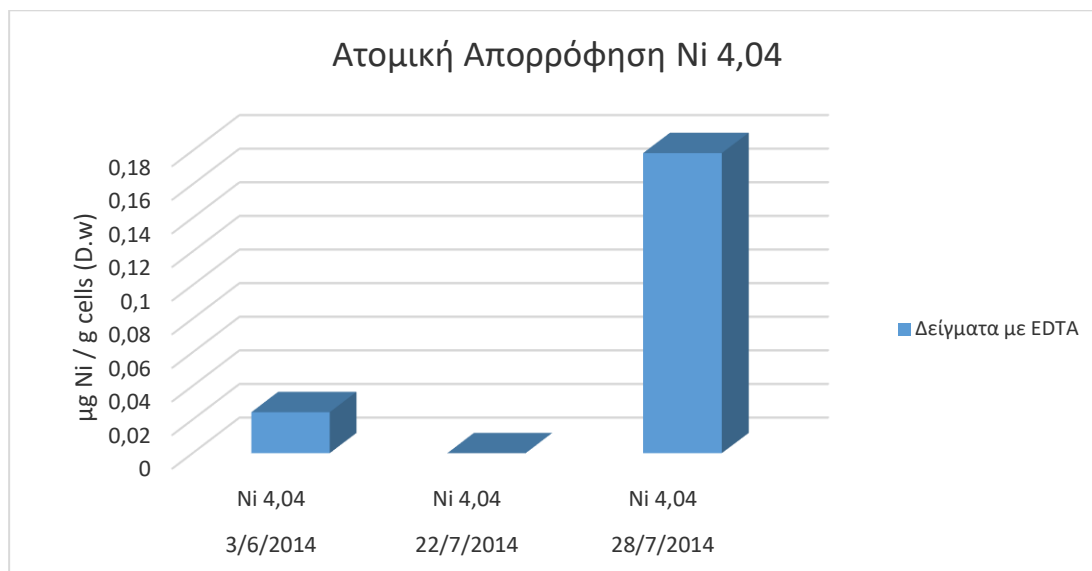
Διάγραμμα 1: Αποτελέσματα Ατομικής Απορρόφησης στο Ni 0,2 mg/L στη ξηρή μάζα με EDTA. Και οι τρεις τιμές είναι πολύ κοντά στο μηδέν.

Το διάγραμμα 2 απεικονίζει τα αποτελέσματα από την ατομική απορρόφηση στη ξηρή μάζα του δείγματος με Νικέλιο 2,01 mg/L



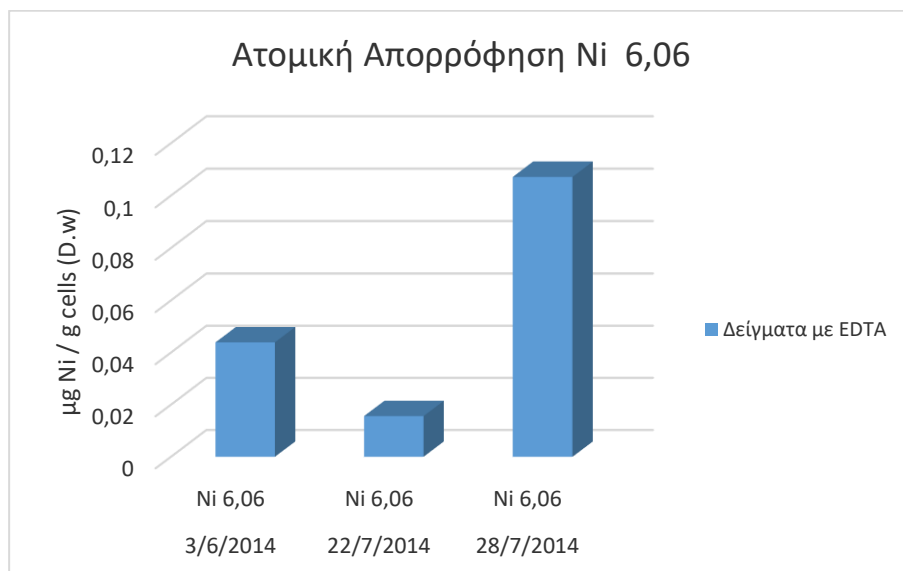
Διάγραμμα 2: Αποτελέσματα Ατομικής Απορρόφησης στο Ni 2,02 mg/L στη ξηρή μάζα με EDTA. Εκτός από την μέτρηση στις 30/6 η οποία είναι μηδέν οι άλλες δυο μετρήσεις έχουν μια μικρη διαφορα κοντα στο 0,012 μg Ni/g στη ξηρή μάζα κυττάρων

Το διάγραμμα 3 απεικονίζει τα αποτελέσματα από την ατομική απορρόφηση στη ξηρή μάζα του δείγματος με Νικέλιο 4,04 mg/L



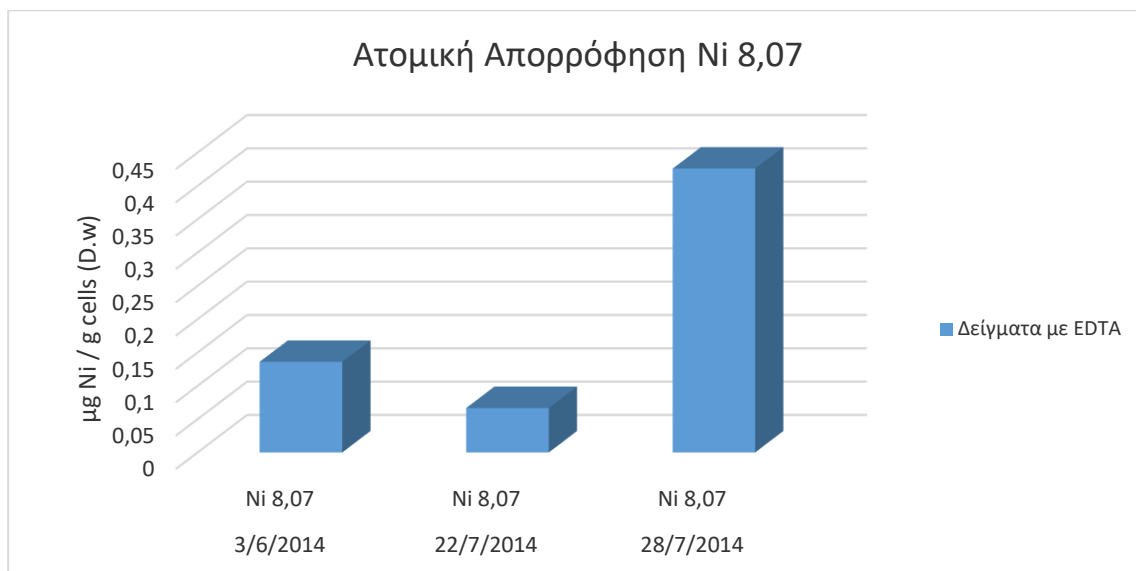
Διάγραμμα 3: Αποτελέσματα Ατομικής Απορρόφησης στο Ni 4,04 mg/L στη ξηρή μάζα με EDTA. Εκτός από την μέτρηση στις 28/7 η οποία είναι μηδέν οι άλλες δυο μετρήσεις έχουν μια μικρή διαφορά κοντά στο 0,154 μg Ni/g στη ξηρή μάζα κυττάρων.

Το διάγραμμα 4 απεικονίζει τα αποτελέσματα από την ατομική απορρόφηση στη ξηρή μάζα του δείγματος με Νικέλιο 6,06 mg/L



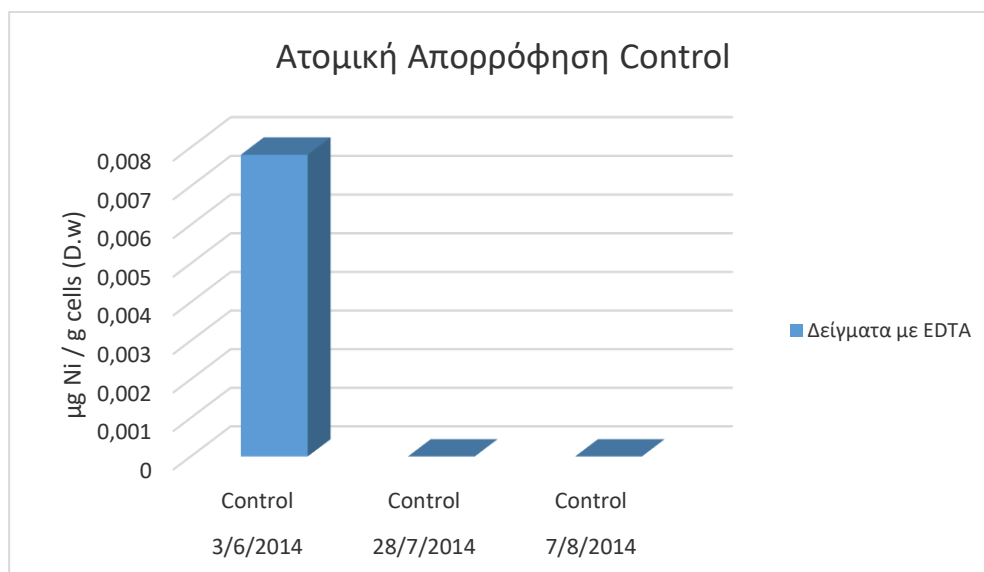
Διάγραμμα 4: Αποτελέσματα Ατομικής Απορρόφησης στο Ni 6,06 mg/L στη ξηρή μάζα με EDTA. Η μέτρηση στις 28/7 είναι υψηλότερη και οι άλλες δυο έχουν μια διαφορά περίπου 0,0693 μg Ni/g στη ξηρή μάζα κυττάρων.

Το διάγραμμα 5 απεικονίζει τα αποτελέσματα από την ατομική απορρόφηση στη ξηρή μάζα του δείγματος με Νικέλιο 8,07 mg/L



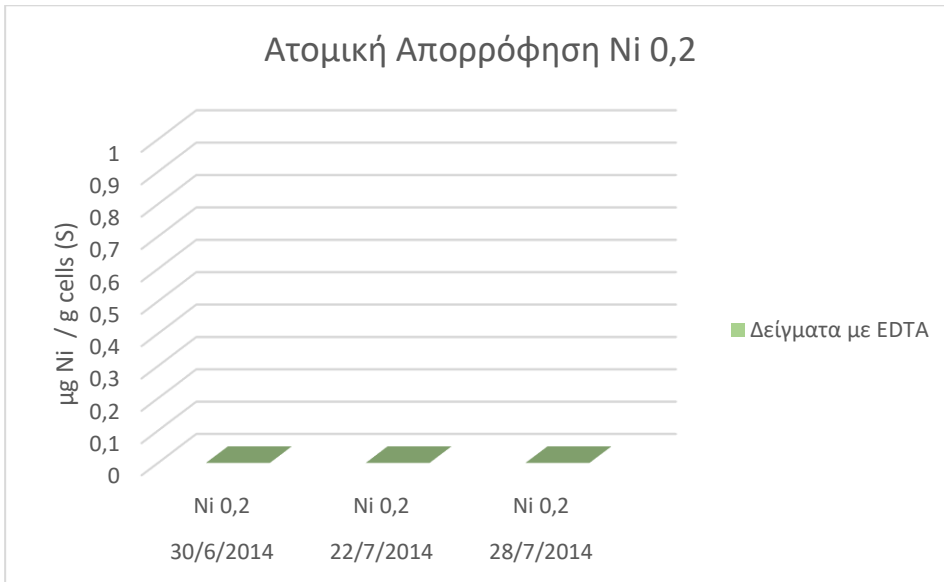
Διάγραμμα 5: Αποτελέσματα Ατομικής Απορρόφησης στο Ni 8,07 mg/L στη ξηρή μάζα με EDTA. Η μέτρηση της 28/7 είναι υψηλότερη συγκριτικά με τις δυο προηγούμενες μετρήσεις.

Το διάγραμμα 6 απεικονίζει τα αποτελέσματα από την ατομική απορρόφηση στη ξηρή μάζα του δείγματος στο Control (χωρίς προσθήκη γνωστής συγκέντρωσης μετάλλου)



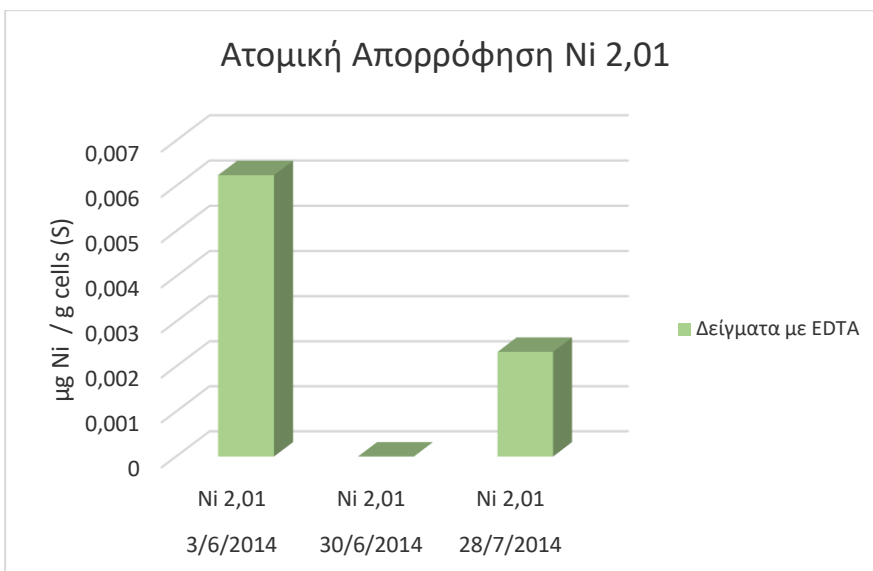
Διάγραμμα 6: Αποτελέσματα Ατομικής Απορρόφησης στο Control, οι μετρήσεις στη ξηρή μάζα με EDTA. Εδώ το αναμενόμενο αποτέλεσμα είναι οι μετρήσεις να είναι μηδενικές.

Το διάγραμμα 7 απεικονίζει τα αποτελέσματα από την ατομική απορρόφηση στο υπερκείμενο του δείγματος με Νικέλιο 0,2 mg/L



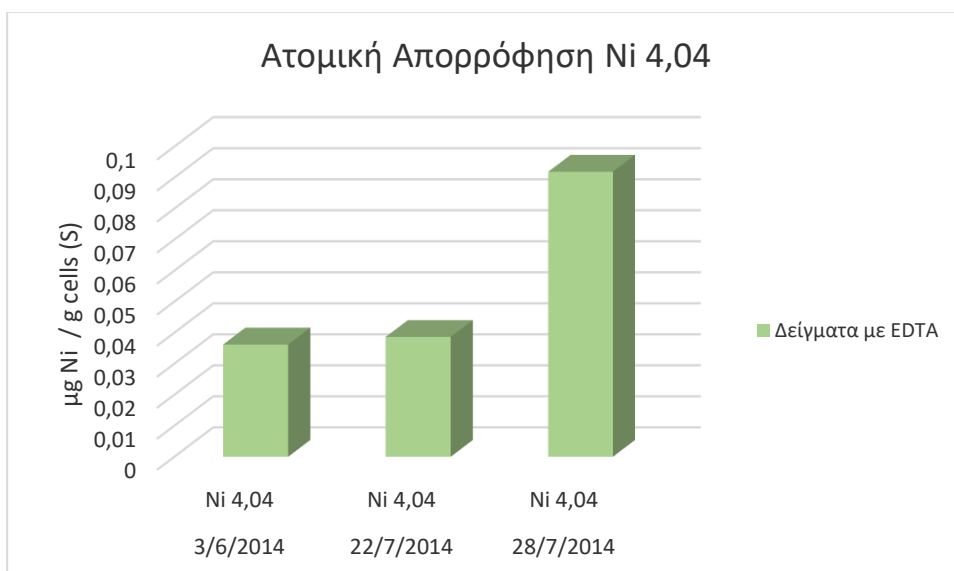
Διάγραμμα 7: Αποτελέσματα Ατομικής Απορρόφησης στο Ni 0,2 mg/L στο υπερκείμενο με EDTA. Και στο υπερκείμενο είναι μηδέν και οι τρεις μετρήσεις.

Το διάγραμμα 8 απεικονίζει τα αποτελέσματα από την ατομική απορρόφηση στο υπερκείμενο του δείγματος με Νικέλιο 2,01 mg/L



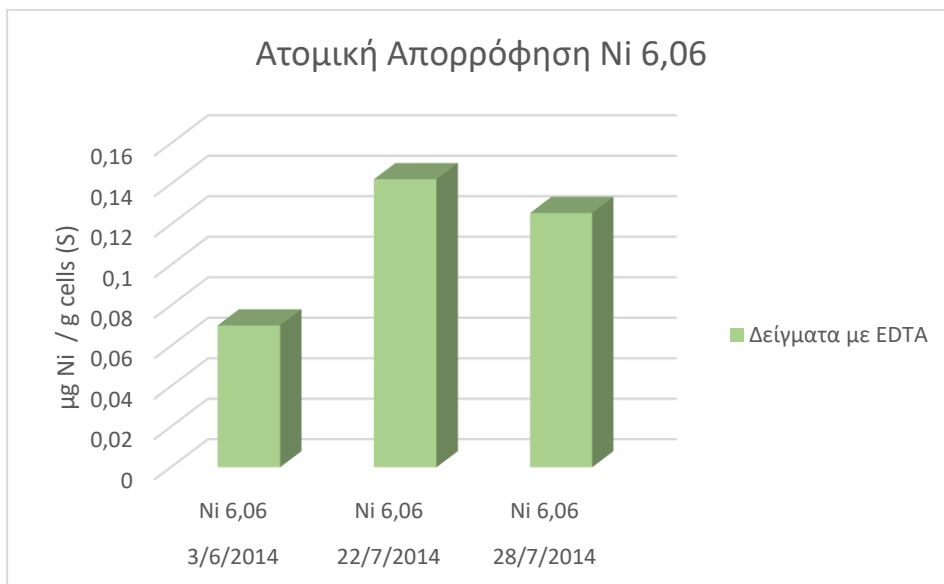
Διάγραμμα 8: Αποτελέσματα Ατομικής Απορρόφησης στο Ni 2,01 mg/L στο υπερκείμενο με EDTA. Και οι τρεις μετρήσεις είναι κοντα στο μηδέν.

Το διάγραμμα 9 απεικονίζει τα αποτελέσματα από την ατομική απορρόφηση στο υπερκείμενο του δείγματος με Νικέλιο 4,04 mg/L



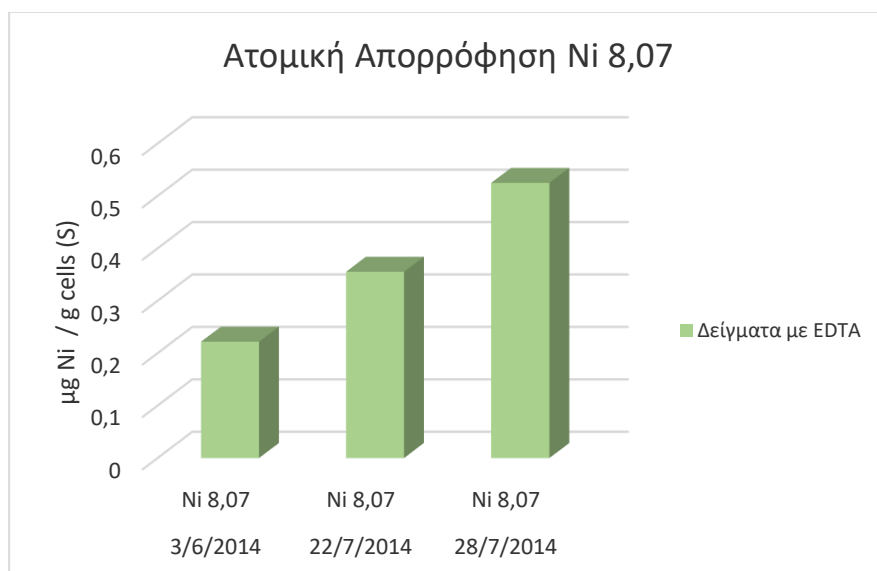
Διάγραμμα 9: Αποτελέσματα Ατομικής Απορρόφησης στο Ni 4,04 mg/L στο υπερκείμενο με EDTA. Και οι τρεις μετρήσεις είναι πολύ κοντινές με μεσο ορο τιμών 0,055 μg Ni/g ξηρής μάζας κυττάρων.

Το διάγραμμα 10 απεικονίζει τα αποτελέσματα από την ατομική απορρόφηση στο υπερκείμενο του δείγματος με Νικέλιο 6,06 mg/L



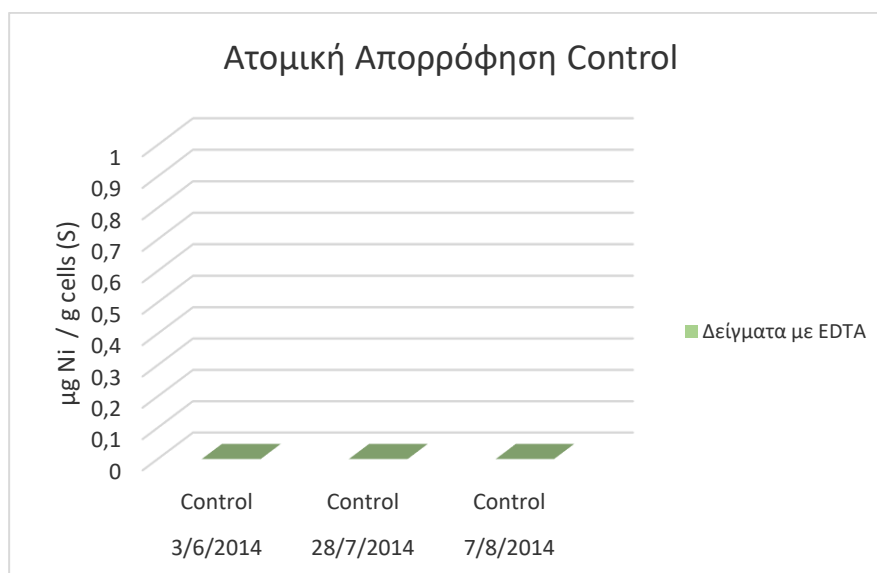
Διάγραμμα 10: Αποτελέσματα Ατομικής Απορρόφησης στο Ni 6,06 mg/L στο υπερκείμενο με EDTA. Κ εδώ οι τρεις επαναλήψεις είχαν κοντινά αποτελέσματα , αλλά σχεδόν διπλάσιες από το προηγούμενο διάγραμμα.

Το διάγραμμα 11 απεικονίζει τα αποτελέσματα από την ατομική απορρόφηση στο υπερκείμενο του δείγματος με Νικέλιο 8,07 mg/L



Διάγραμμα 11: Αποτελέσματα Ατομικής Απορρόφησης στο Ni 8,07 mg/L στο υπερκείμενο με EDTA. Και οι τρεις επαναλήψεις είχαν κοντινά αποτελέσματα, αλλά και σε αυτό το διάγραμμα οι τιμές των αποτελεσμάτων είναι παρα πολύ υψηλές συγκριτικά με το προηγούμενο διάγραμμα.

Το διάγραμμα 11 απεικονίζει τα αποτελέσματα από την ατομική απορρόφηση στο υπερκείμενο του δείγματος στο Control (χωρίς προσθήκη γνωστής συγκέντρωσης μετάλλου)



Διάγραμμα 12: Αποτελέσματα Ατομικής Απορρόφησης στο Ni Control στο υπερκείμενο με EDTA. Τα αποτελέσματα είναι μηδενικά το οποίο είναι το αναμενόμενο αποτέλεσμα διότι δεν υπάρχει προσθήκη βαρέου μετάλλου.

Πίνακας Δεδομένων Ατομικής Απορρόφησης: όπου date of digestion είναι η ημερομηνία που έγινε η χώνευση, C heavy metal είναι η συγκέντρωση του προς ανάλυση δείγματος, $\mu\text{g Ni/g cells (D.w)}$ είναι τα δείγματα της ξηρής μάζας (Pellet) των κυττάρων μετά την χώνευση τους και τέλος $\mu\text{g Ni/g cells (S)}$ είναι το υπερκείμενο που προκύπτει από την φυγοκέντρηση. Ο πίνακας αυτός χωρίζεται σε δυο κατηγορίες χωρίς EDTA (-) που είναι η αριστερή στήλη και με EDTA(+) που είναι η δεξιά στήλη.

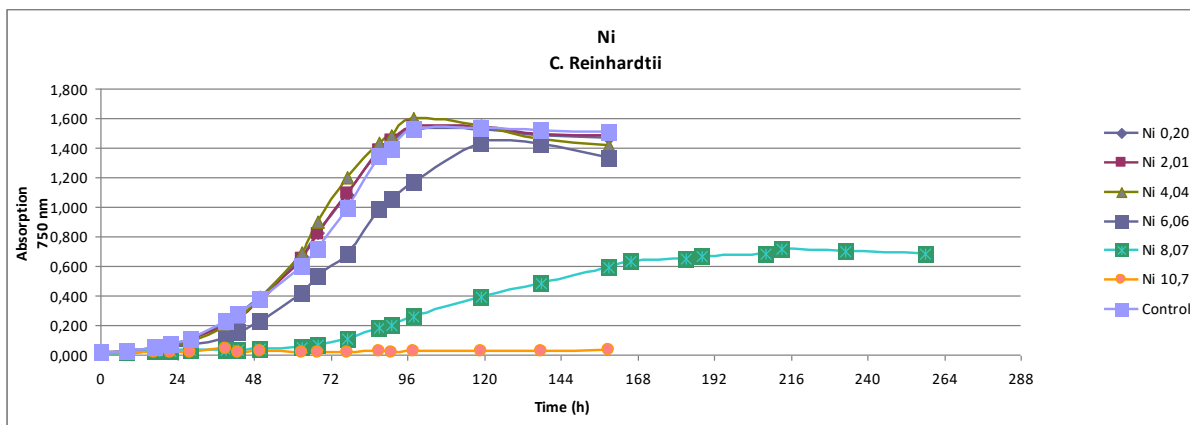
Πίνακας 2

Ni				Ni + EDTA			
Αποτελέσματα AAS (mg/L)				Αποτελέσματα AAS (mg/L)			
Date of digestion	C heavy metal (mg/L)	$\mu\text{g Ni/g cells (D-.w)}$ ©	$\mu\text{g Ni/g cells (S-)}$	Date of digestion	C heavy metal (mg/L)	$\mu\text{g Ni/g cells (D+.w)}$ ©	$\mu\text{g Ni/g cells (S+)}$
30/6/2014	Τυφλό	Non Dedectable		3/6/2014	Τυφλό	Non Dedectable	
30/6/2014	Ni 0,2	0	0	3/6/2014	Control	0,0078125	0
30/6/2014	Ni 2,01	0	0	3/6/2014	Ni 2,01	0,007843137	0,006235294
22/7/2014	Τυφλό	Non Dedectable		3/6/2014	Ni 4,04	0,024404762	0,036190476
22/7/2014	Ni 0,2	0	0	3/6/2014	Ni 6,06	0,043918919	0,070162162
22/7/2014	Ni 4,04	0,017241379	0,070172414	3/6/2014	Ni 8,07	0,135964912	0,221929825
22/7/2014	Ni 6,06	0,0975	0,009424	30/6/2014	Τυφλό	Non Dedectable	
22/7/2014	Ni 8,07	0,422222222	0,12464	30/6/2014	Ni 0,2	0	0
28/7/2014	Τυφλό	Non Dedectable		30/6/2014	Ni 2,01	0	0
28/7/2014	Control	0	0	22/7/2014	Τυφλό	Non Dedectable	
28/7/2014	Ni 0,2	0,024390244	0	22/7/2014	Ni 0,2	0	0
28/7/2014	Ni 2,01	0,025423729	0	22/7/2014	Ni 4,04	0	0,03864
28/7/2014	Ni 4,04	0,21875	0,0238	22/7/2014	Ni 6,06	0,015625	0,142375
28/7/2014	Ni 6,06	0,12804878	0,071073171	22/7/2014	Ni 8,07	0,066666667	0,355333333
28/7/2014	Ni 8,07	0,261363636	0,193227273	28/7/2014	Τυφλό	Non Dedectable	
8/7/2014	Τυφλό	Non Dedectable		28/7/2014	Control	0	0
8/7/2014	Control	0	0	28/7/2014	Ni 0,2	0,032894737	0
8/7/2014	Ni 4,04	0,024537037	0,018311111	28/7/2014	Ni 2,01	0,02027027	0,002324324
8/7/2014	Ni 6,06	0,139864865	0,053140541	28/7/2014	Ni 4,04	0,178571429	0,091892857
8/7/2014	Ni 8,07	0,701086957	0,13616087	28/7/2014	Ni 6,06	0,107142857	0,125691429
7/8/2014	Control	0	0	28/7/2014	Ni 8,07	0,425925926	0,524814815
7/8/2014	Ni 2,01	0,022058824	0,004235294	7/8/2014	Control	0	0

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Διάγραμμα 1: Καμπύλη ανάπτυξης του άλγους *Chlamydomonas reinhardtii* CC 1690 σε 6 διαφορετικές συγκεντρώσεις Νικελίου (Ni)



Διάγραμμα 1

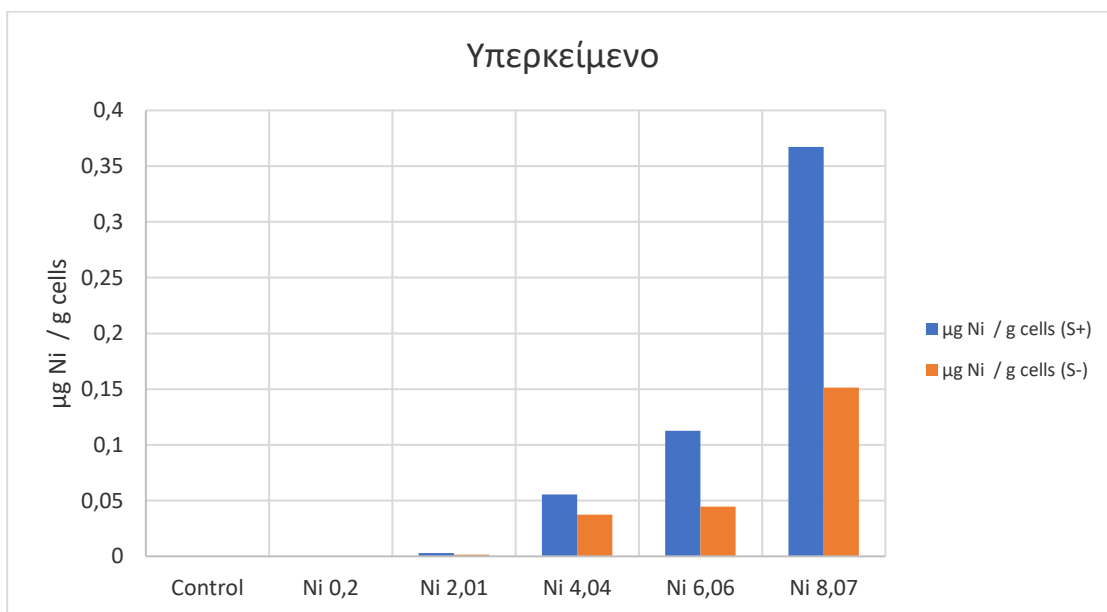
Στο διάγραμμα 1 απεικονίζεται η καμπύλη ανάπτυξης του άλγους *Chlamydomonas reinhardtii* σε 6 διαφορετικές συγκεντρώσεις Ni, 0,2, 2,01, 4,04, 6,06, 8,07 και 10,76mg Ni/L όπως παρατηρείται από το διάγραμμα είναι φανερό ότι στις τέσσερις πρώτες συγκεντρώσεις το άλγος αναπτύσσεται ομαλά σύμφωνα με το control, όμως στην συγκέντρωσή 8,07 mg Ni/L παρατηρείται ότι το στέλεχος να μην πολλαπλασιάζεται αλλά σε μικρότερες ποσότητες και ταχύτητα και τέλος σε συγκεντρώσεις από 10,76 mg Ni/L και άνω το στέλεχος δεν ζει.

Ο πίνακας 3 απεικονίζει το μέσο όρο τιμών του πίνακα 2, από τον παρακάτω πίνακα έγιναν τα διαγράμματα 2 και 3 του έκτου κεφαλαίου της πτυχιακής εργασίας. Όπου C heavy metal είναι η συγκέντρωση του προς ανάλυση δείγματος, $\mu\text{g Ni/ g cells (D-.w)}$ είναι τα δείγματα της ξηρής μάζας (Pellet) των κυττάρων μετά την χώνευση τους και $\mu\text{g Ni/ g cells (S-)}$ είναι το υπερκείμενο που προκύπτει από την φυγοκέντρηση χωρίς EDTA (-). Με EDTA(+) που είναι $\mu\text{g Ni/ g cells (D+.w)}$ και $\mu\text{g Ni/ g cells (S+)}$ αντίστοιχα.

Πίνακας 3

Μέσος όρος αποτελεσμάτων AAS					
C heavy metal (mg/L)	μg Ni / g cells (D-.w) ©	μg Ni / g cells (S-)	C heavy metal (mg/L)	μg Ni / g cells (D+.w) ©	μg Ni / g cells (S+)
M.O Ni 0,2	0,008130081	0	M.O Ni 0,2	0,010964912	0
M.O Ni 2,01	0,007352941	0,001411765	M.O Ni 2,01	0,009371136	0,002853206
M.O Ni 4,04	0,086842805	0,037427842	M.O Ni 4,04	0,06765873	0,055574444
M.O Ni 6,06	0,121804548	0,044545904	M.O Ni 6,06	0,055562259	0,112742864
M.O Ni 8,07	0,461557605	0,151342714	M.O Ni 8,07	0,209519168	0,367359324
M.O Control	0	0	M.O Control	0,002604167	0

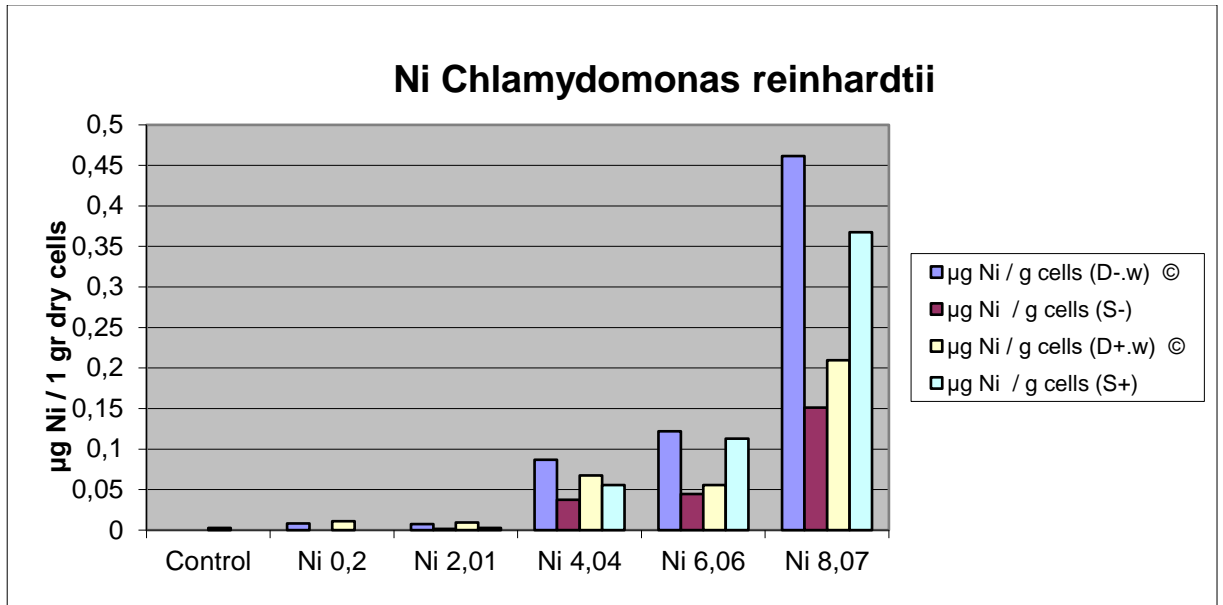
Στο παρακάτω διάγραμμα συγκρίνονται τα δυο υπερκείμενα των δειγμάτων ανά συγκέντρωση με EDTA οι μπλε στήλες και χωρίς EDTA οι πορτοκαλί στήλες



Διάγραμμα 2

Στο διάγραμμα αυτό διαπιστώνεται η επίδραση που έχει το EDTA στα κύτταρα. Όταν χρησιμοποιείται συμπεραίνεται ότι οι συγκεντρώσεις των μετάλλων στο υπερκείμενο είναι υψηλότερες διότι το υπερκείμενο πλέον περιέχει και το Νικέλιο το οποίο ήταν προσκολλημένο στα τοιχώματα του κυττάρου, το οποίο ήταν και το αναμενόμενο αποτέλεσμα. Το υπερκείμενο αυτό προέρχεται από τα κύτταρα μετά την φυγοκέντρηση είτε με EDTA οπότε είναι (S+), είτε χωρίς EDTA οπότε είναι (S-), όπου τα κύτταρα αφήνονται να επωαστούν για 10min με Chelating Buffer (EDTA) είτε με Tris HCL (χωρίς EDTA).

Στο διάγραμμα 3 παρουσιάζονται τα τελικά αποτελέσματα από τις χωνεύσεις των κυττάρων και από τα υπερκείμενα τους με EDTA και χωρίς EDTA



Διάγραμμα 3

Όπου D-.w είναι η ξηρή μάζα (Dry weight) των δειγμάτων χωρίς προσθήκη EDTA και υπερκείμενο τους (S-)(Supernatant) και όπου D+.w είναι η ξηρή μάζα (Dry weight) των δειγμάτων με προσθήκη EDTA και υπερκείμενο τους (S+)(Supernatant). Το υπερκείμενο το λήφθηκε μέσω της φυγοκέντρησης ενώ η ξηρή μάζα χωνεύτηκε έτσι ώστε να γίνει η δυαλυτοποίηση του δείγματος και έπειτα η μέτρηση του μέσω της AAS.

Σε αυτό το διάγραμμα διαπιστώνεται ποσό από το Νικέλιο έχει προσκολληθεί στα τοιχώματα του κυττάρου και ποσό από αυτό έχει εισέλθει και στο κύτταρο του *Chlamydomonas reinhardtii*. Στα κύτταρα (pellet) παρατηρείται ότι συμβαίνει ακριβώς το αντίθετο από ότι συμβαίνει με το υπερκείμενο, το οποίο φυσικά και είναι ένα λογικό αποτέλεσμα διότι το μέταλλο που αποκολλάται από το κυτταρικό τοίχωμα μετριέται στο υπερκείμενο, οπότε μειώνεται η μέτρηση στα κυτταρα ξηρής μάζας, από εκεί είναι εφικτό με τις κατάλληλες πράξεις να υπολογισθεί και ποσό Νικέλιο έχει εισέλθει στο κύτταρο.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Όσο αφορά τα αποτελέσματα ήταν τα αναμενόμενα. Σε μικρές συγκεντρώσεις το Νικέλιο δεν επηρέαζε την ανάπτυξη τους άλγος σε μέτριες συγκεντρώσεις το βοηθούσε στη ανάπτυξη του ενώ σε μεγαλύτερες το εμπόδιζε στην ανάπτυξη και γενικότερα δεν επιβίωνε.

Χρησιμοποιήθηκε το EDTA για να αποσπάσει από το κυτταρικό τοίχωμα του άλγους το Νικέλιο έτσι ώστε να μετρηθεί η ποσότητα του μετάλλου που απορρόφησε το άλγος, μέσω της ατομικής απορρόφησης. Οπότε τα δείγματα χωρίστηκαν σε δυο κυρίες κατηγορίες, με EDTA και χωρίς EDTA. Το αναμενόμενο και λογικό αποτέλεσμα θα ήταν οι τιμές της ατομικής απορρόφησης στο υπερκείμενο να είναι μεγαλύτερες με EDTA συγκριτικά με το υπερκείμενο στα οποία δεν χρησιμοποιήθηκε, διότι το EDTA έχει την ιδιότητα να απομακρύνει το Νικέλιο το οποίο είναι στα τοιχώματα του κυττάρου με αποτέλεσμα να το μεταφέρει στο υπερκείμενο όπου μετρήθηκε μέσω την ατομικής απορρόφησης.

Η συσσώρευση του μετάλλου γίνεται σε δυο στάδια η απορρόφηση του μετάλλου στα τοιχώματα του κυττάρου και η εισαγωγή του μετάλλου στο κύτταρο. Από το διάγραμμα 3 του κεφαλαίου 6 μπορεί να παρατηρηθεί η διαφορά στην ποσότητα Νικελίου που απορρόφα το άλγος. Παρατηρείται ότι στις χαμηλές συγκεντρώσεις το άλγος δεν απορρόφα σχεδόν καθόλου μέταλλο ενώ συγκριτικά με τις επόμενες συγκεντρώσεις 4,04, 6,06 και 8,07 το άλγος απορροφά όλο και περισσότερο μέταλλο. Η διαφορά της απορρόφησης και στα κύτταρα αλλά και στο υπερκείμενο μεταξύ των συγκεντρώσεων 4,04 και 6,06 είναι 3,5 φορές μεγαλύτερη στη συγκέντρωση 6,06. Στη συγκέντρωση 8,07 παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη προσρόφηση μετάλλου, στο υπερκείμενο ήταν 3,1 φορές μεγαλύτερη προσρόφηση συγκριτικά με την συγκέντρωση 6,06 και στη ξηρή μάζα 3,8 φορές μεγαλύτερη. Οπότε συμπεραίνεται ότι σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις μετάλλου το άλγος απορροφά περισσότερο μέταλλο και στο εξωτερικό τοίχωμα αλλά και μέσα στο κύτταρο, το οποίο όπως φάνηκε και στο προ πείραμα επηρεάζει και την ανάπτυξη του άλγους.

Μια εφαρμογή της πτυχιακής εργασίας μπορεί να είναι σε αποκατάσταση του οικοσυστήματος το οποίο είναι επιβαρυνμένο με βαρέα μέταλλα είτε από φυσικούς παράγοντες είτε επειδή ο άνθρωπος έχει κάποιες δραστηριότητες οι οποίες επιβαρύνουν το περιβάλλον, για παράδειγμα μια εφαρμογή θα μπορούσε να είναι τα βιοφίλτρα, τα οποία θα περιέχουν μέσα άλγη, έτσι τοποθετώντας τα σε επιβαρυνμένες περιοχές θα έχουν την ικανότητα να προσροφούν τα μέταλλα έτσι ώστε να αποκατασταθεί η περιοχή σταδιακά. Έπειτα με διάφορες άλλες διεργασίες θα αφαιρούνται τα μέταλλα από τα άλγη και θα είναι στη διαθεσιμότητα του ανθρώπου για την περαιτέρω επαναχρησιμοποίησή τους.

Μέρος των αποτελεσμάτων αυτής της πτυχιακής εργασίας παρουσιάστηκαν στο συνέδριο 11th International Phytotechnologies Conference, το οποίο πραγματοποιήθηκε στο Ηράκλειο Κρήτης τον Σεπτέμβριο του 2014. Ο τίτλος της παρουσίασης ήταν: Heavy Metals accumulation in *Chlamydomonas reinhardtii* and *Thalassiosira weissflogii* cells.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. <http://anercia.com/el/heavy-metals> [Προσβάσιμο στις 18/1/15]
2. http://psekasmata.blogspot.gr/2013/04/blog-post_1243.html [Προσβάσιμο στις 18/1/15]
3. <http://www.e-asis.com/index.php/upiresies/analusi-barewn-metallwn-apatoksinosi> [Προσβάσιμο στις 18/1/15]
4. <http://nutrilabs.gr/barea-metalla/> [Προσβάσιμο στις 18/1/15]
5. <http://www.iatronet.gr/ygeia/iatriki-ergasias/article/344/nikelio.html> [Προσβάσιμο στις 7/1/16]
6. http://www.chem.uoa.gr/quali/quali_C03_Ni.htm [Προσβάσιμο στις 7/1/16]
7. <http://nutrilabs.gr/barea-metalla/> [Προσβάσιμο στις 21/1/16]
8. <http://chimikoergastirio.blogspot.gr/2010/03/blog-post.html> [Προσβάσιμο στις 21/1/16]
9. http://ypo-skian.blogspot.com/2013/04/chemtrails_23.html [Προσβάσιμο στις 21/1/16]
10. <http://www.lenntech.com/periodic/elements/ni.htm> [Προσβάσιμο στις 2/2/16]
11. <http://www3.epa.gov/airtoxics/hlthef/nickel.html> [Προσβάσιμο στις 2/2/16]
12. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4144270/> [Προσβάσιμο στις 13/2/16]
13. <http://www2.hcmuaf.edu.vn/data/quoctuan/Heavy%20metal%20toxicity.pdf> [Προσβάσιμο στις 13/2/16]
14. <http://www.chlamycollection.org/info.html> [Προσβάσιμο στις 16/2/16]
15. <http://genome.jgi.doe.gov/Chlre4/Chlre4.home.html> [Προσβάσιμο στις 16/2/16]
16. <http://www.metamicrobe.com/chlamy/> [Προσβάσιμο στις 16/2/16]
17. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp15-c2.pdf> [Προσβάσιμο στις 27/2/16]
18. http://kpe-kastor.kas.sch.gr/ergastiriakos_odigos/mikrokosmos.htm/Chlamydomonas.html [Προσβάσιμο στις 3/3/16]
19. <http://www.biology-resources.com/chlamydomonas-01.html> [Προσβάσιμο στις 9/3/16]
20. <http://www.biology.lifeeasy.org/4532/chlamydomonas-reproduction> [Προσβάσιμο στις 7/4/16]

21. SKOOG, HOLLER, NIEMAN, Κεφάλαιο 7, 9,13, Αρχές της Ενόργανης Ανάλυσης,
22. https://repository.kallipos.gr/bitstream/11419/5389/1/02_chapter_12.pdf
[Προσβάσιμο στις 5/2/17]
23. PECSOK, R., SHIELDS, L., CAIRNS, T., MC WILLIAM, I. (1980)
Σύγχρονες μέθοδοι στη χημική ανάλυση. Αθήνα: Εκδόσεις Γ.Α. Πνευματικός.
24. Ν.ΛΥΔΑΚΗΣ ΣΗΜΑΝΤΗΡΗΣ, Κεφάλαιο 15 Γενική Χημεία και Ενόργανη ανάλυση
25. Θ. Κουιμτζής, Κ. Σαμαρά-Κωνσταντίνου, Κ. Φυτιάνος, Δ. Βουτσά, 2004,
Κεφάλαιο 8, Κεφάλαιο 16, Έλεγχος ρύπανσης περιβάλλοντος
26. <http://chimikoergastirio.blogspot.gr/2010/03/blog-post.html> [Προσβάσιμο στις 8/2/17]
27. <http://www.greenmed.gr/arthra/toxika-varea-metalla-ke-i-epiptosi-tous-stin-ygeia.html> [Προσβάσιμο στις 28/3/17]
28. Elizabeth H. Harris, The Chlamydomonas Sourcebook Second Edition, Κεφάλαια 1,3,5 Introduction to Chlamydomonas and Its Laboratory Use, Volume 1
29. https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%9D%CE%B9%CE%BA%CE%AD%CE%BB%CE%B9%CE%BF#.CE.95.CE.BD.CF.8E.CF.83.CE.B5.CE.B9.CF.82_.CE.BD.CE.B9.CE.BA.CE.B5.CE.BB.CE.AF.CE.BF.CF.85 [Προσβάσιμο στις 28/3/17]