



**ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΟΙΚΟΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΑΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ &
ΑΝΘΟΚΟΜΙΑΣ**

**Επίδραση επεξεργασμένων υγρών αποβλήτων στην
ανάπτυξη και σε βιοχημικά χαρακτηριστικά των
φυτών Τομάτας, Αγγουριάς και Χρυσάνθεμου**

**ΙΣΣΑΡΗ ΕΛΕΥΘΕΡΙΑ
ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

ΕΙΣΗΓΗΤΗΣ: Δρ. ΚΩΝ/ΝΟΣ Α. ΛΟΥΛΑΚΑΚΗΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2003

«Η εργασία αυτή αφιερώνεται
με όλη μου την αγάπη
στους γονείς μου και στις
αδερφές μου»

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας και βιοτεχνολογίας Φυτών της Σχολής Τεχνολογίας Γεωπονίας του Τ.Ε.Ι. Κρήτης κατά το χρονικό διάστημα 2002-2003.

Ολοκληρώνοντας την εργασία θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους ανθρώπους που με βοήθησαν και στήριξαν στην διάρκεια της προσπάθειας μου. Τις μεγαλύτερες ευχαριστίες μου θα ήθελα να εκφράσω στους επιβλέποντες καθηγητές μου Δρ. Κων/νο Α. Λουλακάκη και τον Δρ.Νικόλαο Πριμηκύριο για την συνεχή επίβλεψη καθ' όλη τη διάρκεια και τις ανεκτίμητες επιστημονικές συμβουλές τους που έδειξαν για την σωστή διεκπεραίωση της εργασίας.

Θέλω επίσης να ευχαριστήσω τους συναδέλφους μου Ντόρκο Άγγελο και Παρασκευόπουλο Αλέξανδρο, για την ανεκτίμητη βοήθεια τους, για την σωστή διεκπεραίωση της εργασίας καθώς και της παρουσίασης της στο κοινό.

Τέλος ευχαριστώ θερμά την οικογένεια μου για την οικονομική υποστήριξη που μου προσέφεραν και όλους τους φίλους μου για την ψυχολογική τους υποστήριξη.

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	3
2. ΕΤΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΥΓΡΩΝ ΑΣΤΙΚΩΝ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ	6
2.1 Πρωτοβάθμια Επεξεργασία Αποβλήτων	6
2.2 Εσχάρωση	7
2.3 Εσχάρωση- Λιποσυλλογή	7
2.4 Μέτρηση Παροχής	8
2.5 Θάλαμος Διανομής Νο 1	8
2.6 Δεξαμενές Πρωτοβάθμιας Καθίζησης	8
2.7 Βιολογική Επεξεργασία	9
2.8 Δεξαμενή Επιλογής	9
2.9 Θάλαμος Διανομής Νο 2	10
2.10 Δεξαμενές Αερισμού	10
2.11 Βασικές Διατάξεις Αερισμού	10
2.12 Θάλαμος Διανομής Νο 3	11
2.13 Χλωρίωση	12
3. ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ	
3.1 Έιδη Ιστοκαλλιέργειας	15
3.2 Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα της Ιστοκαλλιέργειας	17
3.3 Εφαρμογές Ιστοκαλλιέργειας	18
4. ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΑΖΩΤΟΥΤΩΝ ΦΥΤΩΝ	20
4.1 Αφομοίωση των Αμμωνιακών Ιόντων	21
4.2 Γλουταμική Αφυδρογονάση (GDH)	22
4.3 Γλουταμινική Συνθάση (GS)	24
4.4 Γλουταμική Συνθάση (GOGAT)	25

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	28
1.1 Φυτικό Υλικό	28
1.2 <i>In vitro</i> καλλιέργεια κόμβων Χρυσάνθεμου, Αγγουριάς, Τομάτας	28
1.3 Εκχύλιση Πρωτεϊνών από Ιστούς και φύλλα Χρυσάνθεμου, Αγγουριάς και Τομάτας	31
1.4 Ποσοτικός Προσδιορισμός των Πρωτεϊνών με την Μέθοδο Lowry	31
1.5 Αποδιατακτική Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών	33
1.6 Χρωματισμός των Πρωτεϊνών με Commassie Blue R-250	34
1.7 Αποξήρανση του Πηκτώματος της Αποδιατακτικής Ηλεκτοφόρησης	35
1.8 Μεταφορά κατά Western blot- Ανοσοανίχνευση	36
1.9 Μέτρηση Ενεργότητας του GDH	
2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
2.1 Χαρακτηρισμός των Ενζύμων Γλουταμικής Αφυδρογονάσης (GDH), Γλουταμινικής Συνθετάσης (GS) και Γλουταμινικής Συνθάσης (GOGAT) στα φυτά Χρυσάνθεμο, Αγγούρι, Τομάτα	38
2.2 Επίδραση Επεξεργασμένων Υγρών Αποβλήτων στην Ανάπτυξη και στα Βιοχημικά Χαρακτηριστικά του φυτού Χρυσάνθεμου	42
2.3 Επίδραση Επεξεργασμένων Υγρών Αποβλήτων στην Ανάπτυξη και στα Βιοχημικά Χαρακτηριστικά του φυτού Αγγουριάς	49
2.4 Επίδραση Επεξεργασμένων Υγρών Αποβλήτων στην Ανάπτυξη και στα Βιοχημικά Χαρακτηριστικά του φυτού Τομάτας	56
3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	64
4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	66

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ρύπανση των υδάτινων πόρων από τα απόβλητα είναι ένα σημαντικό πρόβλημα το οποίο απασχολεί τους κατοίκους κάθε πόλης. Ένας από τους πιο αποτελεσματικότερους τρόπους αντιμετώπισης της ρύπανσης είναι οι Εγκαταστάσεις Επεξεργασίας Αστικών Αποβλήτων (ΕΕΑΑ). ΟΙ ΕΕΑΑ έχουν ως σκοπό τον καθαρισμό (διαχωρισμό) των αστικών αποβλήτων από τα βλαβερά συστατικά που περιέχουν ώστε αυτά να διατεθούν ακίνδυνα στο περιβάλλον.

Ως «βλαβερά» συστατικά των αποβλήτων θεωρούνται τα ογκώδη αντικείμενα, η άμμος, τα μικρού μεγέθους στερεά που αιωρούνται στη μάζα των αποβλήτων (αιωρούμενα στερεά), τα οργανικά – φυσικά συστατικά (π.χ. υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, λίπη), οι παθογόνοι μικροοργανισμοί και τα θρεπτικά στοιχεία (άζωτο και φώσφορος).

Αν τα απόβλητα διοχετευτούν χωρίς επεξεργασία σε ένα υδάτινο αποδέκτη δημιουργούν διάφορα προβλήματα. Τα ογκώδη στερεά, η άμμος και τα αιωρούμενα στερεά προκαλούν περισσότερο αισθητική δυσαρέσκεια παρά ουσιαστική ρύπανση του υδάτινου φορέα. Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί είναι υπεύθυνοι για τη μετάδοση ασθενειών στον άνθρωπο και σε άλλους οργανισμούς. Η παρουσία τους διαπιστώνεται από τα αποτελέσματα που επιφέρουν στον άνθρωπο όπως π.χ. δερματικές και άλλες μολύνσεις. Τα οργανικά συστατικά, το άζωτο και ο φώσφορος, είναι όμως τα περισσότερα υπεύθυνα για τις δυσάρεστες καταστάσεις ρύπανσης.

Το Συμβούλιο Υπουργών Περιβάλλοντος της ΕΟΚ εξέδωσε πρόσφατα οδηγία (19/3/92) για το καθαρισμό των αστικών αποβλήτων, στην οποία προβλέπεται ότι θα πρέπει να εγκατασταθούν ΕΕΑΑ σε όλες τις πόλεις της κοινότητας. Συγκεκριμένα, προτείνεται η πραγματοποίηση βιολογικού καθαρισμού για όλες τις πόλεις με πληθυσμό μεγαλύτερο από 15000 κατοίκους μέχρι το 2000 και για τις μικρότερες μέχρι το 2005. Επιπλέον, για τις πόλεις που βρίσκονται σε περισσότερο ευαίσθητες περιοχές προβλέπεται και τριτοβάθμιος καθαρισμός, ενώ για τις πόλεις σε λιγότερο ευαίσθητες περιοχές με λιγότερους από 150.000 κατοίκους, ο πρωτοβάθμιος καθαρισμός θεωρείται ότι είναι αρκετός.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η διερεύνηση της δυνατότητας επαναχρησιμοποίησης των επεξεργασμένων αποβλήτων σε γεωργικές καλλιέργειες. Προς την κατεύθυνση αυτή γίνονται σήμερα σημαντικές έρευνες που στοχεύουν στην επαναχρησιμοποίηση των επεξεργασμένων αποβλήτων ως αρδευτικό νερό μετά από μια πρωτοβάθμια,

δευτεροβάθμια και χλωριωτική επεξεργασία με στόχο τη μεγιστοποίηση της απόδοσης της καλλιέργειας, όχι μόνο από ποσοτική, αλλά και από ποιοτική άποψη, χωρίς περιβαλλοντικές επιπτώσεις και με μια σειρά περιορισμούς που εξασφαλίζουν :

- Την προστασία της δημόσιας υγείας και
- Την προστασία του αέριου, υγρού και εδαφικού περιβάλλοντος .

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να μελετήσουμε την επίδραση των επεξεργασμένων αποβλήτων στην ανάπτυξη αλλά και στα βιοχημικά χαρακτηριστικά των φυτικών ειδών χρυσάνθεμο, αγγούρι και τομάτα, σε συνθήκες ιστοκαλλιέργειας. Η ιστοκαλλιέργεια επιλέχθηκε επειδή α) αποτελεί άριστο σύστημα μελέτης της ανάπτυξης φυτικού υλικού υπό την επίδραση διαφορετικών παραγόντων και β) λόγω της ευαισθησίας που παρουσιάζει ως μέθοδος.

Για την διεξαγωγή του πειράματος, ακολουθήθηκε η διαδικασία της Ιστοκαλλιέργειας και τα εξεταζόμενα είδη τα οποία επιλέχθηκαν ήταν το αγγούρι και η τομάτα τα οποία αποτελούν αντιπροσωπευτικά δείγματα μονοετών φυτικών ειδών μεγάλης οικονομικής σημασίας για την Ελλάδα, και το χρυσάνθεμο που αποτελεί το πιο διαδεδομένο φυτό στον χώρο της Ανθοκομίας. Προκειμένου να διαπιστωθεί αν τα υγρά απόβλητα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα επηρεάζουν βιοχημικά χαρακτηριστικά των εξεταζόμενων φυτικών ειδών μελετήθηκαν τα επίπεδα πρωτεΐνης, υπομονάδων και ενζυμικής ενεργότητας, των τριών ενζύμων αφομοίωσης των αμμωνιακών ιόντων GDH, GS, GOGAT, επειδή είναι γνωστό ότι η συγκέντρωση τους επηρεάζεται από παράγοντες καταπόνησης.

Στο Θεωρητικό μέρος που ακολουθεί περιγράφονται οι δυνατότητες εφαρμογής της *in vitro* καλλιέργειας, η διαδικασία της πρωτοβάθμιας, δευτεροβάθμιας επεξεργασίας των αποβλήτων αλλά και η χλωρίωση τους, καθώς και οι ιδιότητες των τριών ενζύμων (GDH, GOGAT και GS) που συμμετέχουν στην ενσωμάτωση του αζώτου.

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2 ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΥΓΡΩΝ ΑΣΤΙΚΩΝ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ

Η διαδικασία επεξεργασίας των αποβλήτων των οποίων τα βασικά χαρακτηριστικά είναι τα ακόλουθα :

- Παροχές
- Στερεά συστατικά
- Οργανικά συστατικά
- Άζωτο
- Φώσφορος
- Παθογόνοι μικροοργανισμοί
- Θερμοκρασία
- ΡΗ και αλκαλικότητα
- Χλωριούχα
- Θείο
- Βαριά μέταλλα

ξεκινάει με την εισαγωγή τους στο Αντλιοστάσιο εισόδου το οποίο αποτελείται από υποβρύχιες αντλίες οι οποίες αντλούν τα εισερχόμενα λύματα προς τις εσχάρες και ξεκινάει η διαδικασία της πρωτοβάθμιας επεξεργασίας.

2.1 ΠΡΩΤΟΒΑΘΜΙΑ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ

Οι βασικές μονάδες σε μια ΕΕΑΑ με πρωτοβάθμιο καθαρισμό είναι:

- ◆ Οι Εσχάρες
- ◆ Αμμοσυλλέκτες – Λιποσυλλέκτες
- ◆ Μετρητής Παροχής
- ◆ Θάλαμος Διανομής Νο1
- ◆ Δεξαμενές Πρωτοβάθμιας Καθίζηση

2.2 ΕΣΧΑΡΩΣΗ

Σκοπός των εσχάρων είναι η συγκράτηση σε αυτές και στη συνέχεια η απομάκρυνση των ογκωδών αντικειμένων (κομμάτια ξύλων, πλαστικά, κλαδιά, κουρέλια κ.λ.π.), για να προστατευτεί από το φράξιμο και τη φθορά ο Η-Μ εξοπλισμός της ΕΕΑΑΑ .

2.2.1 ΕΙΔΗ ΕΣΧΑΡΩΝ

Τα βασικά είδη των εσχάρων είναι δύο :

- Μηχανικές- αυτοκαθαριζόμενες
- Απλές χειροκίνητες

Οι εσχάρες είναι συνήθως κατασκευασμένες από ανοξείδωτο χάλυβα ή χάλυβα St37 με θερμό γαλβάνισμα. Γενικά, τα βρεχόμενα μέρη των εσχάρων συνίσταται να κατασκευάζονται από ανοξείδωτο χάλυβα.

2.3 ΕΣΧΑΡΩΣΗ – ΛΙΠΟΣΥΛΛΟΓΗ

Σκοπός της εξάμμωσης είναι η απομάκρυνση των κόκκων άμμου, των σωματιδίων αργίλου ή των άλλων σωματιδίων γεωλογικής ή όχι υφής, με διάμετρο μεγαλύτερης από 200 μm που δεν είναι οργανικά και έχουν ταχύτητες καθίζησης σημαντικά μεγαλύτερης από εκείνες των οργανικών στερεών. Η απομάκρυνση των σωματιδίων αυτών είναι απαραίτητη, γιατί η παρουσία τους δημιουργεί προβλήματα, όπως εναπόθεση φερτών υλών στον πυθμένα των αγωγών, φράξιμο των σωληνώσεων, φθορά του Η-Μ εξοπλισμού (αντλίες κ.λ.π.) και μείωση της απόδοσης των επόμενων μονάδων επεξεργασίας .

Σκοπός της λιποσυλλογής είναι η απομάκρυνση των ελαίων και λιπών για την αποφυγή προβλημάτων στο στάδιο της βιολογικής επεξεργασίας .

Τα βασικά είδη των εξαμμοτών είναι δύο :

- Εξαμμοτές με σταθερή ταχύτητα ροής
- Αεριζόμενοι εξαμμοτές

2.4 ΜΕΤΡΗΣΗ ΠΑΡΟΧΗΣ

Σκοπός της μέτρησης παροχής είναι ο υπολογισμός της παροχής που διέρχεται από την ΕΕΑΑ, με βάση την οποία ρυθμίζεται η λειτουργία σημαντικών μονάδων. Με το σήμα της παροχής ρυθμίζεται συνήθως η λειτουργία της διάταξης συλλογής, απομάκρυνσης και στράγγισης της άμμου του αεριζόμενου εξαμμωτή, των αντλιών ανακυκλοφορίας και των μονάδων που χρησιμοποιούν χημικά (π.χ. συνδυασμένη βιολογική – χημική απομάκρυνση φωσφόρου, απολύμανση κ.α.).

2.4.1 ΕΙΔΗ ΔΙΑΤΑΞΕΩΝ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΠΑΡΟΧΗΣ

Η μέτρηση της παροχής γίνεται σε ανοικτούς ή κλειστούς αγωγούς . Ο πιο συνηθισμένος τύπος διάταξης μέτρησης της παροχής σε ανοικτούς αγωγούς είναι ο διάυλος με στένωση Parshall, ενώ σπανιότερα χρησιμοποιούνται ορθογωνικοί , τριγωνικοί, τριγωνικοί ή πριονωτοί) V-notch) υπερχειλιστές. Στους κλειστούς αγωγούς η παροχή μετριέται με την εισαγωγή στη ροή διάταξη που δημιουργεί πτώση πίεσης (π.χ. σωλήνας Pitot, σωλήνας Venturi) , από την οποία υπολογίζεται η παροχή με μαγνητικές, ηχητικές ή και άλλες μεθόδους.

2.5 ΘΑΛΑΜΟΣ ΔΙΑΝΟΜΗΣ Νο 1

Ο θάλαμος αυτός κατανέμει τα λύματα στις δεξαμενές πρωτοβάθμιας καθίζησης. Επίσης, μέσω αυτού, μπορεί να παρακάμπτονται οι δεξαμενές πρωτοβάθμιας καθίζησης σε περίπτωση που τα λύματα πρέπει να οδηγηθούν κατευθείαν στη δεξαμενή επιλογής .

Σε αυτόν τον θάλαμο οδηγείται και η περίσσεια ιλύος από το αντλιοστάσιο δευτεροβάθμιας ιλύος.

2.6 ΔΕΞΑΜΕΝΕΣ ΠΡΩΤΟΒΑΘΜΙΑΣ ΚΑΘΙΖΗΣΗΣ

Στην δεξαμενή καθίζησης καθιζάνει η λάσπη η οποία συγκεντρώνεται με την βοήθεια ξέστρων στις χοάνες συγκέντρωσης.

Είναι εξαιρετικά σημαντικό σε μια δεξαμενή καθίζησης η λάσπη να έχει τα ακόλουθα χαρακτηριστικά :

- ◆ Να καθιζάνει γρήγορα, δηλαδή με ταχύτητες καθίζησης μεγαλύτερες από 1 m/h .
- ◆ Να είναι καλά συμπυκνωμένη, δηλαδή χωρίς να καταλαμβάνει μεγάλο όγκο .
- ◆ Να μην ανυψώνεται αφού καθιζήσει για ικανό χρονικό διάστημα (π.χ. 2-3 ώρες) .

2.7 ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

Τα λύματα μετά την πρωτοβάθμια επεξεργασία έχουν καταλήξει στην Δεξαμενή Καθίζησης και στην συνέχεια ξεκινάει η διαδικασία της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας .

Οι βασικές μονάδες σε μια ΕΕΑΑ με δευτεροβάθμιο καθαρισμό είναι :

- ◆ Δεξαμενή Επιλογής
- ◆ Θάλαμος Διανομής Νο 2
- ◆ Δεξαμενές Αερισμού
- ◆ Θάλαμος Διανομής Νο 3
- ◆ Δεξαμενές Δευτεροβάθμιας Καθίζησης

2.8 ΔΕΞΑΜΕΝΗ ΕΠΙΛΟΓΗΣ

Η ανακυκλοφορούσα ιλύς από τις δεξαμενές πρωτοβάθμιας καθίζησης οδηγείται στη Δεξαμενή Επιλογής όπου παραμένει τουλάχιστον μισή ώρα .

Η δεξαμενή αυτή σχεδιάστηκε για να ελαχιστοποιεί τα νηματοειδή βακτήρια (filamentous bacteria) και επομένως το φαινόμενο διόγκωσης της ιλύος (bulking sludge phenomenon). Τα σημαντικότερα είδη βακτηρίων που υπάρχουν σε ένα σύστημα ενεργού ιλύος είναι τα Acinetobacter, Arthrobacter, Achromobacter, Flexibacter, Bacillus, Citromonas, Chromobacterium, Flavobacterium, Flexibacter, Micrococcus, Pseudomonas, Zooglea και τα νιτροποιητικά βακτήρια Nitrosomonas και Nitrobacter . Άλλα είδη βακτηρίων που συναντώνται λιγότερο συχνά είναι τα θειοβακτηρίδια Beggiatoa και Nostocoida, τα

οποία δημιουργούν προβλήματα στη λειτουργία του συστήματος όπως δύσκολη καθίζηση της βιομάζας στη Δεξαμενή Καθίζησης και τη δημιουργία αφρών στην επιφάνεια των δεξαμενών.

2.9 ΘΑΛΑΜΟΣ ΔΙΑΝΟΜΗΣ Νο 2

Αυτός ο θάλαμος κατανέμει τα λύματα στις 4 δεξαμενές αερισμού. Επίσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να οδηγήσει την ανακυκλοφορούσα ιλύ κατ'ευθείαν στις δεξαμενές αερισμού.

2.10 ΔΕΞΑΜΕΝΕΣ ΑΕΡΙΣΜΟΥ

Σκοπός των δεξαμενών αερισμού είναι η βιολογική απομάκρυνση από την υγρή μάζα των αποβλήτων των διαλυμένων οργανικών ενώσεων άνθρακα (BOD) και των ενώσεων αζώτου και φωσφόρου με μικροοργανισμούς. Οι μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται σε αερόβιες συνθήκες στις δεξαμενές αερισμού δεσμεύουν στη κυτταρική τους μάζα τις ενώσεις αυτές και τις μετατρέπουν σε στερεή βιομάζα, η οποία στη συνέχεια απομακρύνεται στις Δεξαμενές Αερισμού από την υγρή μάζα των αποβλήτων .

Σκοποί των διατάξεων αερισμού στις Δεξαμενές Αερισμού είναι α) η εξασφάλιση αερόβιων συνθηκών με την παροχή της απαιτούμενης ποσότητας οξυγόνου στους μικροοργανισμούς για την κατανάλωση των οργανικών ενώσεων και του αζώτου και β) η διατήρηση καθεστώτος ανάμιξης στις Δεξαμενές Αερισμού ώστε να μην καθιζάνει η βιομάζα στον πυθμένα, αλλά και να υπάρχει ομοιόμορφη κατανομή των μικροοργανισμών, του οξυγόνου και των διαφόρων ενώσεων στο σύνολο του όγκου των Δεξαμενών Αερισμού.

2.10.1 ΒΑΣΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ ΑΕΡΙΣΜΟΥ

Οι βασικές διατάξεις αερισμού είναι :

- **Επιφανειακοί – Μηχανικοί Αεριστήρες**
 - Αεριστήρες κατακόρυφου άξονα
 - Ρότορες
- **Διαχυτήρες**

Το σχήμα και οι διαστάσεις των Δεξαμενών Αερισμού εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από το σύστημα αερισμού, αλλά και τις τοπικές συνθήκες (π.χ. διαθέσιμη έκταση, ποιότητα εδάφους).

Οι Δεξαμενές Αερισμού μπορεί να είναι ορθογωνικής, κυκλικής ή σύνθετης κάτοψης και κατασκευάζονται από οπλισμένο σκυρόδεμα.

2.11 ΘΑΛΑΜΟΣ ΔΙΑΝΟΜΗΣ Νο 3

Αυτή η μονάδα διανέμει τα λύματα στις δύο δεξαμενές δευτεροβάθμιας καθίζησης.

2.12 ΔΕΞΑΜΕΝΕΣ ΔΕΥΤΕΡΟΒΑΘΜΙΑΣ ΚΑΘΙΖΗΣΗΣ

Σκοπός των δεξαμενών καθίζησης είναι α) η απομάκρυνση των αιωρούμενων στερεών (βιομάζα και αδρανή στερεά) των Δεξαμενών Αερισμού, ώστε η εκροή του συστήματος Δεξαμενές Αερισμού – Δεξαμενές καθίζησης να είναι απαλλαγμένη από στερεά (που συμβάλλουν στο συνολικό BOD) και β) η συμπύκνωση των στερεών, ώστε να διατηρείται εύκολα η επιθυμητή υψηλή συγκέντρωση των ΜΛSS στη Δεξαμενή Αερισμού με την ανακυκλοφορία και να είναι οικονομική η επεξεργασία της περίσσειας λάσπης, εξαιτίας του μικρότερου όγκου της .

Οι Δεξαμενές Καθίζησης είναι συνήθως κυκλικής κάτοψης με κεντρική διάταξη εισροής και περιφερειακή διάταξη εκροής, ενώ σπανιότερα χρησιμοποιούνται Δεξαμενές Καθίζησης ορθογωνικής κάτοψης. ΟΙ ΔΚ κυκλικής κάτοψης κατασκευάζονται από οπλισμένο σκυρόδεμα . Έχουν πλευρικά βάθη της τάξης των 2,7-3,5 m με τάση προς τα μεγαλύτερα βάθη για τον ευκολότερο έλεγχο του φαινομένου της διόγκωσης της λάσπης. Η διάμετρος των ΔΚ φτάνει συνήθως τα 30 m και η κλίση του πυθμένα τους είναι μέχρι περίπου 8%.

2.13 ΧΛΩΡΙΩΣΗ

Η διαδικασία η οποία ακολουθείται μετά από την εισαγωγή των λυμάτων στις δεξαμενές καθίζησης δευτεροβάθμιας καθίζησης είναι η απολύμανση τους.

Σκοπός της απολύμανσης είναι η καταστροφή των παθογόνων μικροοργανισμών, ώστε να αποφεύγεται η μετάδοση ασθενειών με τα νερά του αποδέκτη, στα οποία διοχετεύονται τα απόβλητα. Είναι το μοναδικό στάδιο στην επεξεργασία των αποβλήτων με αποκλειστικό σκοπό την καταστροφή των παθογόνων μικροοργανισμών, αν και μερική απομάκρυνση ή καταστροφή τους γίνεται και στα άλλα στάδια επεξεργασίας.

Η περισσότερο διαδεδομένη και δοκιμασμένη μέθοδος απολύμανσης σε μια ΕΕΑΑ είναι η χλωρίωση με υποχλωριώδες νάτριο . Παρά τα πολλά πλεονεκτήματα που πού παρουσιάζει η χλωρίωση, έχει το βασικό μειονέκτημα της δυσμενούς επίδρασης του χλωρίου στο υδάτινο περιβάλλον που διοχετεύονται τα χλωριωμένα απόβλητα. Η επίδραση αυτή εκδηλώνεται άμεσα στις διάφορες μορφές ζωής (π.χ. ψάρια) λόγω της τοξικότητας του χλωρίου ή έμμεσα με το σχηματισμό οργανοχλωριούχων ενώσεων, από την αντίδραση του χλωρίου με τις οργανικές ενώσεις των αποβλήτων, που πιθανολογείται ότι είναι καρκινογόνες. Είναι λοιπόν προφανές ότι στο υδάτινο περιβάλλον δεν πρέπει να διοχετεύονται μεγάλες ποσότητες χλωρίου, που προκύπτουν από αλόγιστη χρήση του στη διαδικασία της χλωρίωσης.

Σήμερα γίνονται διάφορες προσπάθειες για τη βελτίωση της απόδοσης της χλωρίωσης, ώστε να αποφεύγεται η ανεξέλεγκτη χρήση και σπατάλη του χλωρίου. Στις προσπάθειες αυτές ανήκουν ορισμένες τεχνικές, όπως π.χ. η χρησιμοποίηση μετρητή υπολειμματικού χλωρίου, αλλά και περισσότερο δραστικά μέτρα, όπως π.χ. η αποχλωρίωση (συνήθως με διοξείδιο του άνθρακα και σπανιότερα με ενεργό άνθρακα) και η μη λειτουργία ή ακόμα και η παράλειψη εγκατάστασης χλωρίωσης (π.χ. η ΕΕΑΑ της πόλης της Καβάλας), όταν η δυνατότητα φυσικής μείωσης των παθογόνων μικροοργανισμών στο υδάτινο περιβάλλον, οι τοπικές συνθήκες και η χρήση του αποδέκτη το επιτρέπουν.

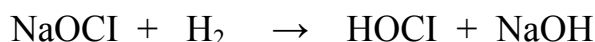
Το παραπάνω βασικό μειονέκτημα της χλωρίωσης έχει οδηγήσει σε προσπάθειες αντικατάστασης της από άλλες μεθόδους απολύμανσης, που είναι δραστικές χωρίς όμως να έχουν περιβαλλοντικές επιπτώσεις . Στις μεθόδους αυτές ανήκει η οζόνωση και η απολύμανση με υπεριώδη (UV) ακτινοβολία, η οποία κερδίζει συνεχώς έδαφος.

2.13.1 ΧΛΩΡΙΩΣΗ ΜΕ ΥΠΟΧΛΩΡΙΩΔΕΣ ΝΑΤΡΙΟ

Το πιο συνηθισμένο απολυμαντικό μέσο είναι το υποχλωριώδες νάτριο (NaOCl). Διατίθεται στο εμπόριο σε υγρή μορφή με περιεκτικότητα χλωρίου κατά βάρος μικρότερη από 15%.

Ο τρόπος με τον οποίο το χλώριο που περιέχεται στο NaOCl καταστρέφει τους μικροοργανισμούς δεν είναι απόλυτα εξακριβωμένος. Για τα βακτηρίδια η πιο πιθανή εξήγηση είναι ότι το χλώριο διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη τους και αδρανοποιεί ορισμένα ένζυμα που είναι απαραίτητα για τη ζωή τους. Επειδή η αντίδραση χλωρίου- ενζύμων που είναι αντιστρέψιμη σε χαμηλές συγκεντρώσεις χλωρίου, είναι δυνατόν τα ένζυμα να επανασχηματισθούν και να συνεχίσουν τη λειτουργία τους. Για τους ιούς και ορισμένους άλλους μικροοργανισμούς η πιο πιθανή εξήγηση είναι ότι το χλώριο επιδρά κατευθείαν στα DNA και RNA του πυρήνα τους.

Η βασική, θεωρητική αντίδραση κατά τη διοχέτευση υποχλωριώδους νατρίου στο νερό είναι η ακόλουθη :



Το υποχλωριώδες νάτριο με το νερό σχηματίζει HOCl το οποίο είναι η βασικότερη μορφή του χλωρίου που δρα ως απολυμαντικό μέσο στη διαδικασία και το οποίο μπορεί να χαρακτηριστεί ως «ελεύθερο χλώριο».

Κατά τη διοχέτευση υποχλωριώδους νατρίου όχι στο νερό, αλλά στα επεξεργασμένα απόβλητα παρατηρείται ότι δεν πραγματοποιείται από την αρχή η αντίδραση ($\text{NaOCl} + \text{H}_2 \rightarrow \text{HOCl} + \text{NaOH}$), αλλά συμβαίνουν μια σειρά από διεργασίες με αποτέλεσμα το χλώριο να ακολουθεί την εξής πορεία :

- ✓ Το χλώριο που διατίθεται καταναλώνεται αποκλειστικά για την οξείδωση των συστατικών των αποβλήτων χωρίς να περισσεύει για απολυμαντική δράση .
- ✓ Το χλώριο, που εξακολουθεί να προστίθεται, αντιδρά με την αμμωνία και τα αμμωνιακά άλατα που περιέχονται στα απόβλητα σχηματίζοντας ενώσεις, όπως χλωραμίνες και τριχλωριούχο άζωτο. Οι ενώσεις αυτές αποτελούν το «ενωμένο χλώριο» και είναι απολυμαντικές, αλλά όχι στο βαθμό που είναι το ελεύθερο άζωτο.

- ✓ Το χλώριο που προστίθεται οξειδώνει τις χλωραμίνες σε άζωτο και οξείδια του αζώτου και ανάγεται σε χλωριούχα. Η συγκέντρωση του « ενωμένου χλωρίου » μειώνεται.
- ✓ Το χλώριο που προστίθεται ακολουθεί την αντίδραση ($\text{NaOCl} + \text{H}_2 \rightarrow \text{HOCl} + \text{NaOH}$) και παραμένει ως «ελεύθερο χλώριο» που είναι το κυρίως υπεύθυνο για την απολυμαντική δράση της χλωρίωσης. Το σύνολο του «ελεύθερου» και του «ενωμένου» χλωρίου αποτελεί το υπολειμματικό χλώριο.

3 ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Ο όρος ιστοκαλλιέργεια φυτών (plant tissue culture) ή καλλιέργεια *in vitro* αναφέρεται στην καλλιέργεια φυτικών τμημάτων, είτε αυτά είναι μεμονωμένα κύτταρα ή ιστοί ή όργανα, σε θρεπτικό υπόστρωμα υπό ασηπτικές συνθήκες σε ευνοϊκές περιβαλλοντικές συνθήκες. Σχεδόν οποιοσδήποτε τύπος φυτικού ιστού μπορεί να καλλιεργηθεί σε στερεό ή και σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα και να διαφοροποιηθεί σε νέους τύπους ιστών ή οργάνων ή και να εξελιχθεί σε ολοκληρωμένο οργανισμό. Αυτή η ικανότητα ενός διαφοροποιημένου σωματικού φυτικού κυττάρου, να επαναδιαφοροποιηθεί και να αναγεννήσει ολόκληρο φυτό ονομάζεται ολοδυναμικότητα (totipotency) και αποτελεί τη βάση της ιστοκαλλιέργειας.

Ιστορικά η πρώτη προσπάθεια για την καλλιέργεια φυτικών ιστών έγινε από τον Haberlandt το 1902. Η ανακάλυψη των αυξινών καθώς και η επιλογή κατάλληλου φυτικού υλικού και θρεπτικού διαλύματος οδήγησαν στα πρώτα επιτυχή αποτελέσματα από τον White, ο οποίος το 1934 καλλιεργήσε *in vitro* ρίζες τομάτας και το 1939 παρατήρησε ανάπτυξη βλαστών *in vitro* από ιστούς καπνού, και από τον Nobecourt (1939), που ανέφερε το σχηματισμό ριζών από κάλλους καρότου. Από τότε και μέχρι σήμερα η καλλιέργεια φυτικών κυττάρων, ιστών και οργάνων έχει χρησιμοποιηθεί με συνεχώς αυξανόμενο ρυθμό τόσο ως μέσο έρευνας σε θέματα βιοχημείας, φυσιολογίας, μοριακής βιολογίας και γενετικής όσο και για πρακτικούς σκοπούς

Η *in vitro* καλλιέργεια φυτικών ιστών και κυττάρων επηρεάζεται από μεγάλο αριθμό παραγόντων που σχετίζονται με α) το φυτικό υλικό, β) τη σύσταση του θρεπτικού υποστρώματος, και γ) τις περιβαλλοντικές συνθήκες καλλιέργειας. Για την επιτυχή *in vitro* καλλιέργεια ενός

φυτικού είδους πρέπει να ληφθούν υπόψη οι παραπάνω παράγοντες και να καθοριστούν πειραματικά οι άριστες συνθήκες καλλιέργειας.

Η δυνατότητα της καλλιέργειας φυτικών ιστών σε θρεπτικό υπόστρωμα βοηθάει στο να κατανοήσουμε τις ικανότητες και τις δυνατότητες που έχει το κύτταρο σαν μια στοιχειώδη μονάδα, μας δίνει πληροφορίες για τις μεταξύ των κυττάρων σχέσεις και αλληλεπιδράσεις μέσα στο φυτό, καθώς και πως επηρεάζει η σύσταση του θρεπτικού υποστρώματος την αύξηση και ανάπτυξη των φυτών *in vitro*.

3.1 ΕΙΔΗ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Η όλη μέθοδος της ιστοκαλλιέργειας στηρίζεται στην ικανότητα που έχουν τα σωματικά κύτταρα των φυτών να διαιρούνται υπό κατάλληλες συνθήκες και να εξελίσσονται σε πλήρη φυτά πανομοιότυπα με το αρχικό. Το καλλιεργούμενο φυτικό τμήμα *in vitro* ή αλλιώς έκφυτο (*explant*) αναγεννά βλαστούς ή ρίζες ή και τα δύο, τα οποία μπορούν να καταλήξουν σε νέα πλήρη και ανεξάρτητα φυτά. Αυτό το αρχικό φυτικό τμήμα (έκφυτο ή μόσχευμα ή μικρομόσχευμα) αποτελεί την βασική μονάδα για κάθε ιστοκαλλιέργεια. Ως έκφυτα μπορούν να χρησιμοποιηθούν τμήματα από σχεδόν όλα τα φυτικά όργανα και ιστούς. Ανάλογα με το είδος του εκφύτου από το οποίο αναγεννώνται νέα φυτά και τον τρόπο με τον οποίο γίνεται η αναγέννηση, τα συστήματα των ιστοκαλλιεργειών ταξινομούνται στις εξής κατηγορίες :

3.1.1 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΑΚΡΑΙΩΝ ΜΕΡΙΣΤΩΜΑΤΩΝ

Τα μεριστώματα που βρίσκονται στις κορυφές των βλαστών μπορούν να καλλιεργηθούν εύκολα σε *in vitro* συνθήκες (μεριστωματική καλλιέργεια) και να αναγεννήσουν αυτοτελή φυτάρια. Η καλλιέργεια ακραίων μεριστωμάτων εφαρμόζεται με επιτυχία στο μικροπολλαπλασιασμό φυτών και ιδιαίτερα στην παραγωγή υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού πολλών καλλωπιστικών φυτών (χρυσάνθεμα, ορχεοειδή), κηπευτικών (πατάτες, φράουλες), οπωροφόρων δένδρων (εσπεριδοειδή, μηλιά) κ.α.

3.1.2 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΜΗΜΑΤΩΝ Η ΟΛΟΚΛΗΡΩΝ ΦΥΤΙΚΩΝ ΟΡΓΑΝΩΝ

Όλα τα όργανα ή τμήματα των οργάνων ενός φυτού (κορυφές ή άλλα τμήματα βλαστών, τμήματα φύλλου ή ρίζας, ανθήρες, έμβρυα, ωοθήκες κ.α.) μπορούν να καλλιεργηθούν *in vitro* και ανάλογα με τη σύσταση του θρεπτικού υποστρώματος και τις συνθήκες καλλιέργειας, να αναγεννήσουν νέους ιστούς η και ολόκληρα φυτάρια. Τέτοιες καλλιέργειες βρίσκουν πληθώρα εφαρμογών (μικροπολλαπλασιασμός των φυτών, παραγωγή απλοειδών, κ.λ.π.).

3.1.3 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΛΛΟΥ

Ο τραυματισμός ενός φυτικού ιστού συνήθως έχει ως αποτέλεσμα την έναρξη κυτταρικών διαιρέσεων στην περιοχή ή σε γειτονικές περιοχές του τραύματος. Έτσι, όταν ένα φυτικό τμήμα καλλιεργηθεί σε θρεπτικό υπόστρωμα, υπό την επίδραση φυτορμονών, λαμβάνουν χώρα κυτταροδιαιρέσεις που οδηγούν στο σχηματισμό κάλλου, μιας άμορφης μάζας φαινομενικά ανοργάνωτων κυττάρων. Οι καλλιέργειες κάλλου αποτελούν χρήσιμο εργαλείο τόσο για ερευνητικούς σκοπούς (μελέτη του φυτικού μεταβολισμού, της οργανογένεσης και της σωματικής εμβρυογένεσης) όσο και για πρακτικές εφαρμογές (π.χ. μικροπολλαπλασιασμός φυτών).

3.1.4 ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Μεμονωμένα κύτταρα μπορούν να καλλιεργηθούν σε *in vitro* συνθήκες, παρόμοια με την καλλιέργεια μικροβιακών κυττάρων. Η τεχνολογία των κυτταροκαλλιιεργειών περιλαμβάνει την ανάπτυξη κυττάρων σε ένα τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα υπό ασηπτικές συνθήκες. Οι κυτταροκαλλιιεργειες έχουν σήμερα αποφασιστικό ρόλο τόσο στη βασική βιολογική έρευνα, για τη μελέτη διαφόρων πτυχών του μεταβολισμού των κυττάρων, όσο και σε εφαρμογές, όπως η σωματική εμβρυογένεση ή η μαζική παραγωγή χρήσιμων φυτικών ενώσεων .

3.1.5 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΤΩΝ

Πρωτοπλάστης ονομάζεται το μέρος του φυτικού κυττάρου που απομένει μετά την αφαίρεση του κυτταρικού τοιχώματος. Πρωτοπλάστες μπορούν να απομονωθούν τόσο από άθικτους ιστούς (συνήθως από φύλλα, αλλά και από ρίζες, βλαστούς, ενδοσπέρμια, έμβρυα κ.α) όσο και από αιωρούμενες καλλιέργειες κυττάρων.

Μέχρι σήμερα, έχουν αναγεννηθεί από πρωτοπλάστες περισσότερα από 280 φυτικά είδη, ανάμεσα στα οποία περιλαμβάνονται αρκετά Solanaceae, όπως ο καπνός, η τομάτα και η πατάτα καθώς και μέλη των οικογενειών Cruciferae και Umbelliferae .

3.2 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΗΣ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Η ιστοκαλλιέργεια είναι χωρίς αμφιβολία μια επαναστατική μέθοδος παραγωγής φυτικού υλικού και δίνει λύσεις σε προβλήματα που αδυνατούν να επιλύσουν οι κλασσικές μέθοδοι. Τα πλεονεκτήματα που παρουσιάζει είναι πολλά με βασικότερο τη δυνατότητα μαζικής παραγωγής φυτών. Ο θεωρητικός ρυθμός μικροπολλαπλασιασμού είναι εξαιρετικά μεγάλος, αρχίζοντας από 1 φυτό και πολλαπλασιάζοντας το μπορεί κανείς να πάρει 1.000.000 φυτά σε διάστημα 6 μηνών. Ο μικροπολλαπλασιασμός (in vitro) βρίσκει επίσης ευρεία εφαρμογή στην ταχεία αναπαραγωγή νέων ή βελτιωμένων ποικιλιών που δημιουργούνται στα βελτιωτικά προγράμματα και την εισαγωγή τους στην παραγωγική διαδικασία.

Ο έλεγχος των παθογόνων, όπως είναι οι ιοί και τα βακτήρια, σε φυτά που αποτελούν τράπεζες φυτικού πολλαπλασιαστικού υλικού, διευκολύνεται σε in vitro συστήματα. Εάν χρησιμοποιηθούν υγιή φυτά μπορούν να παραχθούν φυτά σε μεγάλη κλίμακα που εγγυημένα είναι ελεύθερα ιώσεων. Άλλα πλεονεκτήματα είναι ότι το πολλαπλασιαστικό υλικό παράγεται σε μικρό χώρο, σε ασηπτικές συνθήκες, οι οποίες αποκλείουν απώλειες από διάφορα παθογόνα. Οι ελεγχόμενες συνθήκες (φωτός, θερμοκρασίας, σύνθεσης θρεπτικού μέσου, ορμονών κ.λ.π) εξασφαλίζουν συνεχείς και υψηλούς ρυθμούς παραγωγής, ανεξάρτητα της εποχής του έτους. Με τις μεθόδους μικροπολλαπλασιασμού μπορούν να αναπαραχθούν φυτά in vitro που είναι δύσκολο ή και αδύνατο να αναπαραχθούν in vitro. Με τη μαχανοποίηση των μεθόδων, τουλάχιστον για μερικά είδη, μπορεί το εργατικό κόστος να μειωθεί.

Βασικό μειονέκτημα της ιστοκαλλιέργειας είναι το υψηλό κόστος που απαιτείται για τη δημιουργία εξοπλισμού και τη λειτουργία του. Το οικονομικό πρόβλημα συχνά είναι απαγορευτικό για τον εμπορικό πολλαπλασιασμό πολλών φυτικών ειδών. Το πρόβλημα βέβαια του κόστους, αντιμετωπίζεται με τη μαζικοποίηση της παραγωγής και με την παραγωγή φυταρίων υψηλής προστιθέμενης αξίας. Απαιτείται επίσης εξειδικευμένο προσωπικό που επιλαμβάνεται των εργασιών, οι οποίες πρέπει να γίνονται σε ασηπτικές συνθήκες. Εάν γίνει λάθος ταυτοποίηση ενός αγνώστου παθογόνου ή εάν δημιουργηθεί μια μετάλλαξη και διαφύγει της προσοχής, τότε θα υπάρξει πολλαπλασιασμός σε μεγάλη έκταση σε σύντομο χρονικό διάστημα ανεπιθύμητων ή επιζήμιων στελεχών. Η αναπαραγωγή πρέπει να γίνεται σε συνθήκες που εξασφαλίζουν την γενετική σταθερότητα των αναπαραγόμενων φυτών.

Πρόβλημα υάλωσης και αποβολής τοξικών ουσιών αποτελούν συχνά δισεπίλυτα εμπόδια για τις καλλιέργειες *in vitro*. Η υάλωση είναι η κρυστάλλινη υδαρής μορφή που παίρνουν τα φυτικά μέρη και η ανωμαλία που παρατηρείται στα αγγεία και στα στομάτια, επιδρούν δυσμενώς στην φυσιολογική κατάσταση των εκφύτων. Τα αίτια είναι η απορρόφηση του νερού από το άγαρ και η μεγάλη σχετική υγρασία του σωλήνα. Αύξηση της συγκέντρωσης του άγαρ μπορεί να βοηθήσει στην αποφυγή του φαινομένου. Επίσης το αιθυλένιο και το διοξείδιο του άνθρακα που παράγονται στους σωλήνες και τα δοχεία καλλιέργειας *in vitro* οδηγούν στην παραγωγή κακής ποιότητας φυτών. Τέλος ένα άλλο βασικό μειονέκτημα είναι ότι κατά τη μεταφορά των νεαρών φυταρίων από το σωλήνα (*in vitro*) στο έδαφος χάνονται πολλά φυτά εξαιτίας της μη ικανοποιητικής προσαρμογής σε συνθήκες *in vitro*. Οι ρίζες που σχηματίζονται δεν λειτουργούν κανονικά σε συνθήκες εδάφους μέχρι να αντικατασταθούν από νέες, τα φύλλα είναι πολύ λεπτά και όχι πολύ ενεργά φωτοσυνθετικά. Οι αγγειακές συνδέσεις μεταξύ φύλλων και βλαστών είναι πολύ ασθενείς.

3.3 ΕΦΑΡΜΟΤΕΣ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Οι τεχνικές της ιστοκαλλιέργειας χρησιμοποιούνται σήμερα ευρύτατα τόσο για ερευνητικούς όσο και για εμπορικούς σκοπούς. Μερικές από τις τρέχουσες εφαρμογές καθώς και οι αναπτυσσόμενες τεχνολογίες που στηρίζονται στην ιστοκαλλιέργεια παρουσιάζονται στον Πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 1. Οι κυριότερες εφαρμογές εφαρμογές της ιστοκαλλιέργειας φυτικών ιστών και κυττάρων

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ	
❖ Μικροπολλαπλασιασμός	❖ Παραγωγή χημικών από καλλιεργούμενα κύτταρα
❖ Σωματική εμβιογένση	❖ Μελέτη του φυτικού μεταβολισμού
❖ Απαλλαγή από ιούς και παθογόνα	❖ Τροποποίηση φυτών με σωμακλωνική παραλλακτικότητα
❖ Διάσωση εμβρύων	❖ Μεταφορά γονιδίων με σύντηξη πρωτοπλαστών
❖ Παραγωγή απλοειδών φυτών	❖ Εισαγωγή γονιδίων στα φυτά μέσω του αγροβακτηρίου ή με άλλη μέθοδο
❖ Συντήρηση και διάσωση γενετικού υλικού	

Ο μικροπολλαπλασιασμός χρησιμοποιείται σήμερα από πολλές εταιρείες και εργαστήρια για την παραγωγή εκατομμυρίων φυταρίων διαφόρων φυτικών ειδών. Πολλές τέτοιες εταιρίες *in vitro* πολλαπλασιασμού φυτών δραστηριοποιούνται στην Ολλανδία, Μεγάλη Βρετανία, Γαλλία, Γερμανία, Ισραήλ, Η.Π.Α. και αλλού. Ο *in vitro* πολλαπλασιασμός είναι ιδιαίτερα επιτυχής σε καλλωπιστικά φυτά, σε λαχανοκομικά φυτά μεγάλης καλλιέργειας καθώς και σε ιατρικά και αρωματικά φυτά.

Εκτός του μικροπολλαπλασιασμού, η *in vitro* καλλιέργεια χρησιμοποιείται και σε πολλές άλλες εφαρμογές όπως η απαλλαγή των φυτών από ιώσεις και άλλα παθογόνα, η παραγωγή υβριδίων από διασταυρώσεις μεταξύ ταξινομικά απομακρυσμένων γονέων, η παραγωγή απλοειδών φυτών, η αποθήκευση γενετικού υλικού με σκοπό την συντήρηση και διάσωση του, η δημιουργία νέων ποικιλιών και η γενετική τροποποίηση των φυτών (Πίνακας 1).

Επιπλέον η ιστοκαλλιέργεια χρησιμοποιείται ευρύτατα τα τελευταία χρόνια για τη μελέτη διαφόρων θεμάτων βιοχημείας, φυσιολογίας, μοριακής βιολογίας και βιοτεχνολογίας φυτών. Μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται θέματα γενικότερου βιολογικού ενδιαφέροντος όπως ο προσδιορισμός της δραστηριότητας των ενζύμων, η σύνθεση αμινοξέων, πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων καθώς και ειδικότερα θέματα που

σχετίζονται με τα φυτά, όπως η φωτοσύνθεση και η σύνθεση κυτταρικών τοιχωμάτων. Η χρησιμοποίηση ιστοκαλλιεργειών αντί ολόκληρων φυτών παρουσιάζει ιδιότητες που αποτελούν άλλοτε μειονεκτήματα και άλλοτε πλεονεκτήματα, ανάλογα με τους ερευνητικούς στόχους. Μερικές από τις ιδιότητες αυτές είναι :

- Ο γρήγορος ρυθμός αύξησης των κυττάρων .
- Οι ελεγχόμενες συνθήκες καλλιέργειας (περιβαλλοντικές συνθήκες και σύσταση του θρεπτικού υποστρώματος).
- Η απουσία μικροοργανισμών και επομένως η έλλειψη αλληλεπίδρασης τους με τα φυτικά κύτταρα.
- Η δυνατότητα καλλιέργειας περιορισμένου αριθμού κυτταρικών φαινοτύπων .
- Η δυσχέρεια προέκτασης των αποτελεσμάτων σε ολόκληρα φυτά .
- Η έλλειψη αλληλεπίδρασης μεταξύ των διαφόρων οργάνων και ιστών .

4. ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΑΖΩΤΟΥ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

Το άζωτο έχει πρωταρχική σημασία για τα φυτά, γιατί είναι το σημαντικότερο ανόργανο στοιχείο στη θρέψη των φυτών και αποτελεί βασικό συστατικό πολλών οργανικών ενώσεων του κυττάρου, μεταξύ των οποίων οι πρωτεΐνες, που αποτελούν το κύριο μέρος του πρωτοπλάσματος και τα νουκλεϊκά οξέα, που περιέχουν την κωδικοποιημένη γενετική πληροφορία. Οι δύο αυτές μεγάλης σημασίας κατηγορίες αζωτούχων ενώσεων (πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα) αποτελούν τα κλειδιά της ζωής κάθε έμβιου οργανισμού. Το άζωτο επίσης αποτελεί συστατικό πολλών οργανικών ουσιών του φυτικού κυττάρου, όπως χλωροφύλλης, αμινοξέων, αλκαλοειδών και μερικών ορμονών. Αν και το ελεύθερο άζωτο αποτελεί το 78 % του ατμοσφαιρικού αέρα, τα φυτά δεν είναι σε θέση να το χρησιμοποιήσουν για τις ανάγκες τους.

Κύριες πηγές αζώτου για τα φυτά είναι οι νιτρικές ενώσεις NaNO_3 , KNO_3 , NH_4NO_3 και $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ καθώς και τα αμμωνιακά άλατα. Το νιτρικό άζωτο για να μεταβολισθεί πρέπει να αναχθεί πρώτα σε NH_3 . Επειδή όμως η αμμωνία είναι τοξική σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις μέσα στο κύτταρο, δεσμεύεται με αναγωγική αμίνωση των α-κετονοξέων και

ενσωματώνεται στα αμινοξέα μέσω του γλουταμικού οξέος και της γλουταμίνης, των δύο κεντρικών μορίων στον μεταβολισμό του αζώτου.

Ειδικότερα η αφομοίωση του αζώτου και η ενσωμάτωση του στην συνέχεια σε οργανικά μόρια στα φυτά, πραγματοποιείται με τη δράση τριών κυρίως ενζυμικών συστημάτων : της γλουταμικής αφυδρογονάσης (GDH), της συνθετάσης της γλουταμίνης (GS) και της συνθάσης του γλουταμικού (GOGAT). Αυτά τα ένζυμα υπάρχουν στους φυτικούς ιστούς σε πολλαπλές ισοενζυμικές μορφές, που συχνά εντοπίζονται σε διαφορετικά κυτταρικά οργανίδια και κωδικοποιούνται από διακριτά γονίδια. Ο ακριβής ρόλος κάθε μιας από τις ισομορφές των ενζύμων και ο τρόπος ρύθμισης των αντίστοιχων γονιδίων αποτελούν πεδία της έρευνας διεθνώς, καθώς η βελτίωση της αποτελεσματικότητας της αφομοίωσης του ανόργανου αζώτου από τα φυτά είναι ιδιαίτερης σημασίας όχι μόνο από επιστημονικής, αλλά και από πρακτικής και οικονομικής άποψης.

4.1 ΑΦΟΜΟΙΩΣΗ ΤΩΝ ΑΜΜΩΝΙΑΚΩΝ ΙΟΝΤΩΝ

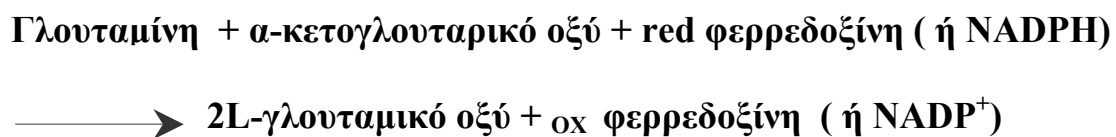
Το προϊόν της αναγωγής των νιτρικών ιόντων είναι τα αμμωνιακά ιόντα. Αμμωνιακά ιόντα μπορούν επίσης να προκύψουν, μέσα στο φυτό και από άλλες βιοχημικές διαδικασίες, όπως την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών, την αποκαρβοξυλίωση της γλυκίνης κατά την διάρκεια της φωτοαναπνοής, την απαμίνωση ή μπορεί να προσληφθούν άμεσα από το έδαφος. Καταλαβαίνουμε, λοιπόν, πόσο σημαντικό για τους ανώτερους οργανισμούς, στη σύνθεση και τον καταβολισμό του οργανικού αζώτου, είναι τα αμμωνιακά ιόντα, αφού αποτελούν τη βασική ανόργανη μορφή αζώτου. Παρόλο που το αμμώνιο είναι εύκολα διαθέσιμο στα περισσότερα φυτά είναι επίσης και αρκετά τοξικό. Τα φυτά όμως διαθέτουν μηχανισμούς για την αποφυγή της τοξικότητας αμμωνίου ενσωματώνοντας το στα αμινοξέα .

Οι αντιδράσεις που καταλύονται από τα ένζυμα GDH, και GS σε συνδυασμό με GOGAT θεωρούνται ως οι σημαντικότερες για την αφομοίωση της αμμωνίας. Τέτοιες αντιδράσεις είναι η αφομοίωση της αμμωνίας και η σύνθεση γλουταμίνης και γλουταμινικού οξέος, που επιτυγχάνονται με την συνδυασμένη δράση της γλουταμινικής συνθετάσης (GS) και της γλουταμικής συνθάσης (GOGAT).

Πιο συγκεκριμένα η GS καταλύει το σχηματισμό γλουταμίνης από γλουταμικό οξύ και αμμωνία:



Στη συνέχεια η GOGAT καταλύει τη μεταφορά της αμιδικής ομάδας της γλουταμίνης στο α-κετογλουταρικό οξύ, οδηγώντας στο σχηματισμό γλουταμικού οξέος:



Τα αποτελέσματα που παίρνουμε από τη παραπάνω διαδικασία, είναι η σύνθεση δύο μορίων γλουταμικού οξέως ξεκινώντας από ένα μόριο. Ένα από τα δύο μόρια γλουταμικού μπορεί να λειτουργήσει ως δέκτης αμμωνιακών, κατά την διάρκεια ενός νέου κύκλου GS/GOGAT, ενώ το άλλο μπορεί να συμμετάσχει ως υπόστρωμα σε αντιδράσεις τρανσαμίνωσης .

Η γλουταμική αφυδρογονάση (GDH) είναι το ένζυμο που καταλύει την αναγωγική αμίνωση του α-κετογλουταρικό οξέος σε γλουταμικό οξύ (αναβολική αντίδραση, NADH-GDH) και την απαμίνωση του γλουταμικού οξέος (καταβολική αντίδραση , NAD-GDH):



Τα ένζυμα αφομοίωσης του αζώτου υπάρχουν στους φυτικούς ιστούς σε πολλαπλές ισοενζυμικές μορφές, που συχνά εντοπίζονται σε διαφορετικά οργανίδια και κωδικοποιούνται από διακριτά γονίδια. Η έκφραση των γονιδίων τους επηρεάζεται σημαντικά από περιβαλλοντικούς και ενδογενείς παράγοντες, όπως το στάδιο ανάπτυξης, τα ανόργανα και οργανικά αζωτούχα άλατα, το φως, παράγοντες καταπόνησης κ.α.

4.2 ΓΛΟΥΤΑΜΙΚΗ ΑΦΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗ (GDH)

Ο ρόλος της γλουταμικής αφυδρογονάσης (GDH) σήμερα στο μεταβολισμό των ανωτέρων φυτών παραμένει αδιευκρίνιστος, παρά το

γεγονός ότι ανιχνεύεται σε όλα τα φυτά και συχνά υπάρχει σε υψηλά επίπεδα στους διάφορους φυτικούς ιστούς. Το ένζυμο μπορεί να λειτουργεί με δύο τρόπους. Στην αφομοίωση ή επαναφομοίωση του αμμωνίου, δρώντας έτσι συμπληρωματικά με το δίδυμο GS/GOGAT στη σύνθεση του γλουταμικού οξέος, ιδιαίτερα κάτω από συνθήκες stress (υψηλή θερμοκρασία, έλλειψη νερού, αλατότητα, μολύνσεις από παθογόνα) ή σε ειδικά στάδια ανάπτυξης. Εναλλακτικά, το ένζυμο μπορεί να καταλύει την οξειδωση γλουταμικού οξέος, εξασφαλίζοντας ανθρακικούς σκελετούς για την αποτελεσματική λειτουργία του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων (κύκλος Krebs), κάτω από περιοριστικές συνθήκες άνθρακα.

Στα ανώτερα φυτά έχουν αναφερθεί δύο κύριες μορφές της GDH : μία μορφή εξαρτώμενη από NADH (NADH-GDH) που εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια και μία NADPH εξαρτώμενη (NADPH-GDH) μορφή που σχετίζεται με τους χλωροπλάστες. Η NADH-GDH είναι όπως προαναφέρθηκε μιτοχονδριακό ένζυμο με πολλαπλές ισοενζυμικές μορφές. Σε βιοχημικό επίπεδο, το ένζυμο έχει μελετηθεί εκτενώς σε διάφορα φυτικά είδη, ιδιαίτερα στο αμπέλι, τη σόγια και το *Arabidopsis*. Τα μοριακά δεδομένα υποδεικνύουν την παρουσία δύο διακριτών γονιδίων της GDH, που εμφανίζουν διαφοροποιημένη έκφραση ανάλογα με το αναπτυξιακό στάδιο των ιστών /οργάνων και εξωγενείς παράγοντες όπως το φως και η πηγή αζώτου. Η GDH του αμπελιού παρουσιάζει πρότυπο επτά ισοενζύμων σε όλους τους ιστούς, σε διαφορετικές ποσοότητες. Το ένζυμο είναι εξαμερές αποτελούμενο από 2 είδη υπομονάδων, την α και την β, που διαφέρουν μεταξύ τους στο μοριακό βάρος και στο φορτίο τους . Βρέθηκε ότι όλα τα ισοένζυμα της GDH περιέχουν και τους δύο τύπους υπομονάδων. Το ισοένζυμο 7 της GDH περιέχει μόνο α-υπομονάδες και το ισοένζυμο 1 μόνο β-υπομονάδες, ενώ τα ενδιάμεσα ισοένζυμα αποτελούνται και από τις δύο υπομονάδες σε μια διατεταγμένη σειρά. Δηλαδή από το ισοένζυμο 1 προς το ισοένζυμο 7, η συμμετοχή της α-υπομονάδας αυξάνει και της β μειώνεται. Τα δύο ακραία είναι ομοεξαμερή ενώ τα ισοένζυμα δύο έως έξι περιέχουν τις α- και β- υπομονάδες σε αναλογία 1:5, 2:4, 3:3, 4:2, και 5:1 αντίστοιχα. Σε ότι αφορά το φυσιολογικό ρόλο των 7 ισοενζύμων της GDH, δείχθηκε ότι κάθε ένα από αυτά , εμφανίζει παρόμοια συμπεριφορά ως προς την *in vitro* αναβολική και καταβολική του ενεργότητα. Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και από την μελέτη της GDH του *Persea spp.* κ.ο. αβοκάντο. Το μοντέλο έχει επιβεβαιωθεί πρόσφατα από άλλους ερευνητές σε διάφορα φυτικά είδη, όπως το *Arabidopsis thaliana*.

Επίσης το αμπέλι ήταν το πρώτο φυτικό είδος στο οποίο μελετήθηκαν τα γονίδια της GDH. Συγκεκριμένα από μία cDNA

βιβλιοθήκη απομονώθηκε ένας κλώνος της GDH του αμπελιού. Ο κλώνος αυτός φέρει ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης 1233 νουκλεοτιδίων που κωδικοποιεί πρωτεΐνη αποτελούμενη από 411 αμινοξέα. Η παραγωγός αμινοξική αλληλουχία εμφανίζει υψηλή ομολογία με άλλες φυτικές GDHs και σχετικά υψηλότερη ομολογία με την GDH των εξτρεμόφιλων αρχαιοβακτηρίων, παρά με τις αλληλουχίες μη φυτικών ευκαρυωτικών οργανισμών. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει λειτουργική ή / και εξελικτική σχέση μεταξύ των δύο αυτών ενζύμων . Τα αποτελέσματα μπορούν να υποστηρίξουν την προσαρμογή του φυτικού ενζύμου για λειτουργία υπό συνθήκες καταπόνησης (stress). Εντοπίστηκε επίσης η ύπαρξη περισσότερων του ενός γονιδίων της GDH στο γονιδίωμα του αμπελιού, υποδηλώνοντας ότι η σύνθεση κάθε υπομονάδας του ενζύμου ελέγχεται από διαφορετικό γονίδιο. Ο κλώνος της GDH του αμπελιού που απομονώθηκε, αντιστοιχεί στο γονίδιο που κωδικοποιεί την α-υπομονάδα του ενζύμου .

4.3 ΓΛΟΥΤΑΜΙΝΙΚΗ ΣΥΝΘΕΤΑΣΗ (GS)

Η γλουταμινική συνθετάση των ανωτέρων φυτών είναι ένα οκταμερές ένζυμο με μοριακό βάρος 350-400 kDa το οποίο υφίσταται με την μορφή πολλαπλών ισοενζύμων της GS, που διακρίνονται μεταξύ τους με βάση τον ενδοκυτταρικό τους εντοπισμό : την GS1 που εντοπίζεται αποκλειστικά στο κυτταρόπλασμα, και την GS2 που περιορίζεται στα πλαστίδια. Οι υπομονάδες των ισοενζύμων παρουσιάζουν ετερογένεια τόσο ως προς το μέγεθος (37-44 kDa) όσο και ως προς το φορτίο. Γενικά όλα τα φυτικά είδη που εξετάστηκαν περιέχουν 1 GS2 ισοένζυμο που κωδικοποιείται από ένα πυρηνικό γονίδιο και αρκετά κυτταροπλασματικά GS1 ισοένζυμα που κωδικοποιούνται από μικρές γονιδιακές οικογένειες .

Εκτός από τον διαφορετικό κυτταρικό εντοπισμό, η σχετική ποσότητα κάθε ισοένζυμου της GS μπορεί να διαφέρει ανάλογα με το φυτικό είδος την φυσιολογική κατάσταση του φυτού, το στάδιο ανάπτυξης και το εξεταζόμενο φυτικό όργανο. Στα φωτοσυνθετικά όργανα το φως και η αμμωνία αυξάνουν την έκφραση της GS2. Η GS2 είναι ένα οκταμερές ένζυμο που αποτελείται από ένα πολυπεπίδιο MB 43-45 kDa (εξαρτώμενο από το φυτικό είδος που εξετάζεται). Τα νιτρικά από κοινού με το φως, παίζουν ένα ρυθμιστικό ρόλο στην παραγωγή της GS2 στα φύλλα. Παρουσία νιτρικών ιόντων και φωτισμού, σε σπορόφυτα τομάτας, ανιχνεύθηκαν δύο μορφές πολυπεπτιδίων της GS2, ενώ παρουσία αμμωνιακών ιόντων ανιχνεύθηκε μία μορφή πολυπεπτιδίου της GS2. Στην πλειοψηφία των φυτικών ειδών, τα αμμωνιακά ιόντα δεν

φαίνονται να έχουν κάποια επίδραση στην ενεργότητα της GS2. Σε C₄ βρέθηκε ότι η GS1 είναι ένα οκταμερές ένζυμο που αποτελείται από ένα ή δύο πολυπεπτίδια MB 39-44 kDa. Οι σχετικές αναλογίες των δύο GS πολυπεπτιδίων μπορεί να ποικίλει εξαρτώμενο από το στάδιο ανάπτυξης των ριζών ή τη πηγή του ανόργανου αζώτου. Η σύνθεση των ριζικών GS πολυπεπτιδίων και η έκφραση των υπεύθυνων γονιδίων έχει ολοκληρωτικά ερευνηθεί στο μέγιστο, δείχνοντας το ριζικό GSI ότι κωδικοποιείται από μικρές γονιδιακές οικογένειες (μέχρι 5 γονίδια) και ότι υπάρχουν διαφορές στην έκφραση τους, ανάμεσα στους ιστούς της ρίζας. Η μετάφραση του GS₁₋₁ γονιδίου εκφράζεται στις ηθμαγγειώδης δεσμίδες, ενώ τα προϊόντα των GS₁₋₁ και GS₁₋₅ γονιδίων ανιχνεύονται στους μεσοκυττάρους χώρους. Σ' αντίθεση, τα γονίδια GS₁₋₃ και GS₁₋₄ εκφράζονται σ' όλους τους ιστούς. Επιπροσθέτως, στους συγκεκριμένους ιστούς έκφρασης των παραπάνω γονιδίων, τα γονίδια GS₁₋₁ και GS₁₋₅ παρουσιάζουν μία αυξητική ρύθμιση υπό την εξωγενή επίδραση αμμωνιακών ιόντων, ενώ αντίθετα τα GS₁₋₃ και GS₁₋₄ γονίδια παρουσιάζουν μία μειωτική ρύθμιση. Οι οικογένειες γονιδίων GS έχουν σχετικά χαρακτηριστεί σε είδη ψυχανθών αλλά και σε άλλα ετήσια φυτά. Στον αραβόσιτο έχουν βρεθεί 6 γονίδια που αντιστοιχούν στη GS, 5 από τα οποία ελέγχουν τη σύνθεση των υπομονάδων της GS και κωδικοποιεί την GS2.

4.4 ΓΛΟΥΤΑΜΙΚΗ ΣΥΝΘΑΣΗ (GOGAT)

Στους ιστούς των ανωτέρων φυτών έχουν ανιχνευτεί δύο τύποι γλουταμικής συνθάσης με διαφορετική αναγωγική ειδικότητα. Ο ένας χρησιμοποιεί ανηγμένη φερρεδοξίνη (εξαρτώμενη από φερρεδοξίνη, Fd-GOGAT) σαν δότης ηλεκτρονίων. Οι δύο μορφές του ενζύμου είναι δομικά διακριτές πρωτεΐνες που διαφέρουν ως προς τα μοριακά τους βάρη, τα κινητικά χαρακτηριστικά και την ανοσοαντίδραση. Τα είδη που μελετήθηκαν έχουν 1 γονίδιο της Fd-GOGAT με εξαίρεση το *Arabidopsis* και το καλαμπόκι που φαίνεται να έχουν 2 γονίδια, τα οποία κωδικοποιούν διακριτές μορφές του ενζύμου. Στα φυτά αυτά εκτός από την Fd-GOGAT (GLU1) που εντοπίζονται στα φύλλα, έχει βρεθεί και μία δεύτερη μορφή Fd-GOGAT (GLU2) εντοπίζεται στις ρίζες. Η σύνθεση της NADH-GOGAT ελέγχεται από ένα πυρηνικό γονίδιο, που κωδικοποιεί πρωτεΐνη με μοριακή μάζα μεγαλύτερη από 200 kDa.

Η Fd-GOGAT εντοπίζεται στους χλωροπλάστες και είναι η κύρια ενζυμική μορφή στους πράσινους ιστούς αντιπροσωπεύοντας μέχρι το 1% του πρωτεϊνικού περιεχομένου των φύλλων. Στο *Arabidopsis* για

παράδειγμα, η Fd-GOGAT είναι υπεύθυνη για το 96% της συνολικής ενεργότητας GOGAT στα φύλλα. Το ένζυμο είναι μία σιδηρο-θειούχος φλαβοπρωτεΐνη που αποτελείται από ένα μόνο πολυπεπτίδιο μοριακού βάρους 140-165 kDa, μαζί με ένα μεταφορικό πεπτίδιο για μεταφορά στους χλωροπλάστες και κωδικοποιείται από ένα πυρηνικό γονίδιο . Στους φωτοσυνθετικούς ιστούς ο φυσιολογικός ρόλος της Fd-GOGAT φαίνεται να σχετίζεται με τη λειτουργία του κύκλου GS/GOGAT, κατά την πρωτογενή αφομοίωση των αμμωνιακών ιόντων και την επαναδέσμευση της φωτοαναπνευστικής αμμωνίας.

Η NADH-GOGAT είναι μια μονομερής σιδηρο-θειούχος φλαβοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 200-240 kDa. Το ένζυμο εντοπίζεται κυρίως στα πλαστίδια μη φωτοσυνθετικών ιστών, συμμετέχοντας πιθανά στην πρωτογενή αφομοίωση ή στην επαναφομοίωση της αμμωνίας, που ελευθερώνονται κατά τον καταβολισμό των αμινοξέων. Οι δύο τύποι GOGAT δείχνουν διαφορετική έκφραση στα πρώτα στάδια της ανάπτυξης των σπορόφυτων. Η έκφραση τους ρυθμίζεται από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως το φως και η πηγή του εξωγενούς αζώτου.

Συμπερασματικά, οι μέχρι τώρα μελέτες δείχνουν ότι η σύνθεση των τριών ενζύμων στους φυτικούς ιστούς επηρεάζεται σημαντικά από διάφορους παράγοντες και κυρίως από συνθήκες καταπόνησης. Για το λόγο αυτό η μελέτη των χαρακτηριστικών των τριών ενζύμων σε φυτικούς ιστούς που αναπτύσσονται παρουσία επεξεργασμένων υγρών αποβλήτων μπορεί να δώσει σημαντική πληροφορία για τυχόν αρνητικές ή/και θετικές επιδράσεις των αποβλήτων στις λειτουργίες των φυτών και κατ' επέκταση για την καταλληλότητα τους να χρησιμοποιηθούν για την άρδευση φυτικών καλλιεργειών.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1.1 Φυτικό Υλικό

Για να μελετηθεί η επίδραση των αποβλήτων στην ανάπτυξη των φυτών και στα βιοχημικά χαρακτηριστικά τους χρησιμοποιήθηκε φυτικό υλικό από τρία είδη και συγκεκριμένα :

- ◆ Κόμβοι από φυτά χρυσάνθεμου (*Chrysanthemum* sp.) που αναπτύχθηκαν στο θερμοκήπιο .
- ◆ Σπόροι αγγουριάς (*Cucumis sativus*).
- ◆ Σπόροι τομάτας (*Lycopersicon esculentum*).

Συγκεκριμένα οι σπόροι τόσο του αγγουριού όσο και της τομάτας καθώς και οι κόμβοι από τα φυτά χρυσανθέμων αφού απολυμάνθηκαν (διαδικασία η οποία περιγράφεται παρακάτω) τοποθετήθηκαν σε κατάλληλα θρεπτικά υποστρώματα με την διαδικασία της *in vitro* καλλιέργειας.

1.2 *In vitro* Καλλιέργεια κόμβων Χρυσάνθεμου, Αγγουριάς , Τομάτας

Για την διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν κόμβοι φυτών χρυσάνθεμου, καθώς σπόροι αγγουριάς και τομάτας. Το φυτικό υλικό, απολυμάνθηκε και τοποθετήθηκε σε κατάλληλα θρεπτικά υποστρώματα.

Συγκεκριμένα το φυτικό υλικό αφού πλύθηκε με νερό, τοποθετήθηκε σε πλαστικά σακουλάκια και ξεπλύθηκε για μερικά δευτερόλεπτα με διάλυμα αλκοόλης 70%. Στη συνέχεια εμβαπτίστηκε σε διάλυμα 10% εμπορικού σκευάσματος υποχλωριώδους νατρίου (χλωρίνη) για 10 min. Ακολούθησαν τρία ξεπλύματα με απεσταγμένο – αποστειρωμένο νερό διάρκειας 1, 1, 5 λεπτών, αντίστοιχα το καθένα, μέσα στην εστία νηματικής ροής, με στόχο τη αποστείρωση τυχόν υπολειμμάτων χλωρίνης από τους σπόρους. Κατά την αποστείρωση και την προετοιμασία των σπόρων – κόμβων, τα εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν (λαβίδες , νυστέρια κ.τ.λ.) είχαν απολυμανθεί με εμβάπτιση τους σε 90% αλκοόλη και στη συνέχεια με φλόγα λύχνου Bunsen.

Για την καλλιέργεια *in vitro* του φυτικού υλικού χρησιμοποιήθηκε το υπόστρωμα MS (Πίνακας 1). Παρασκευάστηκαν διαφορετικά

υποστρώματα όπου το κάθε ένα περιείχε λύματα από διαφορετικό στάδιο επεξεργασίας . Συγκεκριμένα :

- Υπόστρωμα 1^ο : Μάρτυρας - Θρεπτικό υλικό MS .
- Υπόστρωμα 2^ο : Θρεπτικό υλικό MS κανονικής συγκέντρωσης που περιείχε 900 ml στο λίτρο λύματα από το στάδιο της πρωτοβάθμιας επεξεργασίας.
- Υπόστρωμα 3^ο : Θρεπτικό υλικό MS κανονικής συγκέντρωσης που περιείχε 900 ml στο λίτρο λύματα από το στάδιο της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας.
- Υπόστρωμα 4^ο : Θρεπτικό υλικό MS κανονικής συγκέντρωσης που περιείχε 900 ml στο λίτρο λύματα από το στάδιο της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας (φιλτραρισμένα) .
- Υπόστρωμα 5^ο : Θρεπτικό υλικό MS κανονικής συγκέντρωσης που περιείχε 900 ml στο λίτρο από λύματα τα οποία είχαν υποστεί χλωρίωση .
- Υπόστρωμα 6^ο : Θρεπτικό υλικό MS μισής συγκέντρωσης (1/2 MS), που περιείχε 500 ml στο λίτρο λύματα από το στάδιο της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας, χωρίς σακχαρόζη .
- Υπόστρωμα 7^ο : Θρεπτικό υλικό MS, ¼ συγκέντρωσης MS που περιείχε 250 ml στο λίτρο λύματα από το στάδιο της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας, χωρίς σακχαρόζη.

Πίνακας 1. Σύσταση του βασικού θρεπτικού υποστρώματος MS , που χρησιμοποιήθηκε για την in vitro καλλιέργεια χρυσάνθεμου, αγγουριάς και τομάτας

ΜΑΚΡΟΣΤΟΙΧΕΙΑ	ΤΕΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (mg/ l)
KNO ₃	1900
NH ₄ NO ₃	1650
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
CaCl ₂ ·2H ₂ O	150
ΜΙΚΡΟΣΤΟΙΧΕΙΑ	
KI	0.83
H ₃ BO ₃ ·4H ₂ O	6.2
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.83
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0.25
FeNa EDFS	43
ΒΙΤΑΜΙΝΕΣ	
Biotin	0.1
Nicotinic acid	5
Pyridoxine HCl	5
Thiamine HCl	5
D- Pantothenic acid	5
Myoinositol	100

Κάθε λίτρο διαλύματος περιείχε εκτός των άλλων και 7 gr άγαρ (agar), 30 gr σακχαρόζη, ενώ το pH του υποστρώματος ρυθμίστηκε στο 6.0 με 1 N NaOH. Στη συνέχεια το υπόστρωμα μοιράστηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες οι οποίοι σφραγίστηκαν με βαμβάκι, πάνω από το οποίο τοποθετήθηκε αλουμινόχαρτο και οι οποίοι στην συνέχεια τοποθετήθηκαν στο αυτόκαυστο για αποστείρωση στους 121 °C για 20 min.

Όλη η διαδικασία εμφύτευσης εκτελέστηκε μέσα σε εστία νηματικής ροής υπό ασηπτικές συνθήκες. Μετά την εμφύτευση οι δοκιμαστικοί

σωλήνες με το θρεπτικό υπόστρωμα τοποθετήθηκαν στη συνέχεια σε θάλαμο ανάπτυξης με ελεγχόμενες συνθήκες φωτισμού (16 h φως και 8 h σκοτάδι) και θερμοκρασία 25 ± 2 °C.

1.3 Εκχύλιση Πρωτεϊνών από Ιστούς και Φύλλα Χρυσανθέμου, Αγγουριού και Τομάτας

1.3.1 Διαλύματα

Διάλυμα εκχύλισης (Extraction buffer) : 100mM Tris-HCl pH 8.0, 10% Glycerol, 1mM EDTA, 3 mM MgCl₂ και 0,1% Triton X 100.

1.3.2 Διαδικασία

Ακολούθησε η διαδικασία που περιγράφεται από τον Λουλακάκη (1999). Όλα τα στάδια της εκχύλισης πρωτεϊνών εκτελέστηκαν μέσα σε πάγο. Όλα τα διαλύματα και οι μικροσυσκευές που χρησιμοποιήθηκαν διατηρήθηκαν μέσα σε πάγο. 5 γραμμάρια βλαστών και φύλλων αγγουριού, 3 γραμμάρια βλαστών και φύλλων τομάτας, χρυσανθέμου και ρίζας από την κάθε επέμβαση, λειοτριβήθηκαν σε γουδί παρουσία 3 όγκων (v/w) κρύου διαλύματος εκχύλισης. Τα μίγματα ομογενοποιήθηκαν σε ομογενοποιητή για 30 sec. Στην συνέχεια έγινε προσθήκη του Triton σε κάθε μίγμα και ανάδευση αυτών στο Vortex. Δεύτερο πέρασμα των μιγμάτων από τον ομογενοποιητή και στην συνέχεια τα μίγματα αφέθηκαν στο πάγο για 10 min και αφού ομογενοποιήθηκαν ξανά, αναδεύτηκαν, ισοζυγίστηκαν, φυγοκεντρήθηκαν σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στις 10000 rpm (στροφές ανά λεπτό) για 30 min στους 4 °C. Τα υπερκείμενα μοιράστηκαν σε μικροσωλήνες erpendorf και φυλάχτηκαν στον καταψύκτη για να χρησιμοποιηθούν σε επόμενους προσδιορισμούς.

1.4 Ποσοτικός Προσδιορισμός των Πρωτεϊνών με τη Μέθοδο Lowry

Ο προσδιορισμός της ποσότητας των πρωτεϊνών στα διαφορετικά εκχυλίσματα από ιστούς αγγουριάς, τομάτας και χρυσανθέμου έγινε με

τη χρωματομετρική μέθοδο Lowry. Το χρώμα που παράγεται με τη μέθοδο αυτή οφείλεται: α) στη δημιουργία συμπλόκων πρωτεΐνης και ιόντων Cu^{++} , σε αλκαλικό περιβάλλον και β) στην αναγωγή των ιόντων φωσφοβολφραμικού από τα αμινοξέα τυροσίνη και τρυπτοφάνη των πρωτεϊνών, παρουσία ιόντων Cu^{++} . Η ποσοτικοποίηση του χρώματος γίνεται με μέτρηση της απορρόφησης στα 625 nm και την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης. Για την κατασκευή της χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα με γνωστή συγκέντρωση μιας πρωτεΐνης, της BSA (bovine serum albumin, αλβουμίνη από όρο βοδιού).

1.4.1 Διαλύματα

- *Διάλυμα Α* : 2 g NaOH, 10 g Na_2CO_3 , 0,1 g τρυγικό K-Na σε 500 ml H_2O .
- *Διάλυμα Β* : 0,5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ σε 100 ml H_2O
- *Διάλυμα Γ* : Αποτελείται από 50 ml διάλυμα Α και 1 ml διάλυμα Β. Παρασκευάζεται λίγο πριν την χρήση του .
- *ΙΧ Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu* : Εμπορικά διαθέσιμο. Αραιώνεται 1:1 με H_2O .

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης :

- Διαλύματα 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120 μg BSA/0.1 ml. Παρασκευάζονται από πυκνό διάλυμα BSA 2 mg/ml.

1.4.2 Διαδικασία

ο προσδιορισμός της ποσότητας των πρωτεϊνών κάθε δείγματος έγινε σε τρεις επαναλήψεις. Για κάθε αντίδραση προστέθηκαν σε μικροσωλήνες erpendorf τα παρακάτω :

- ❖ Πρωτεϊνικό δείγμα σε όγκο 0,1 ml.
- ❖ Διάλυμα Γ 1 ml (ανάδευση και επώαση για 10 min).
- ❖ Αντιδραστήριο Folin- Ciocalteu 0,1 ml (ανάδευση και επώαση για 20 min).

Στη συνέχεια μετρήθηκε η απορρόφηση (OD) των διαλυμάτων στα 625 nm σε φασματοφωτόμετρο.

1.5 Αποδιατακτική Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών

Η μέθοδος έγινε σύμφωνα με τον Λουλακάκη (1999).

1.5.1 Διαλύματα

- *Διαλύματα μετουσίωσης δειγμάτων (3x sample buffer)* : 150 mM Tris-HCl pH 6,8, 9% SDS, 15% β-μερκαπτοαιθανόλη (β-mercaptoethanol), 0,1% κυανού της βρωμοφαινόλης, 30% γλυκερόλη (το διάλυμα αυτό είναι τρεις φορές συγκεντρωμένο 3x).
- *Μητρικό διάλυμα ακρυλαμίδης* : 29,2% ακρυλαμίδη (acrylamide), 0,8% δισ-ακρυλαμίδη (bis-acrylamide).
- *Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτώματος διαχωρισμού (separating gel buffer)* : 1,5 M Tris-HCl pH 8,9.
- *Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτώματος επιστοίβασης (stacking gel buffer)* : 0,5 Tris-HCl pH 6,8.
- *Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (running buffer)* : 25 mM Tris, 192 mM γλυκίνης, 0,1% SDS.
- *10% διάλυμα ammonium persulfate (APS).*
- *20% διάλυμα SDS .*
- *50% διάλυμα γλυκερόλη .*
- *Temed.*

1.5.2 Διαδικασία

Παρασκευάστηκαν επίπεδο πήκτωμα (gel) πάχους 1,5 mm τα οποία μετά την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκαν για χρώση ολικών πρωτεϊνών ή για μεταφορά των πρωτεϊνών σε φίλτρα νιτροκυτταρίνης (western bolt). Κάθε πήκτωμα αποτελείται από δύο επιμέρους πηκτώματα όπου το ένα (πήκτωμα επιστοίβασης, stacking gel) προηγείται του άλλου (πήκτωμα διαχωρισμού, separating gel). Το πήκτωμα διαχωρισμού περιείχε 10% πολυακρυλαμίδης και το πήκτωμα επιστοίβασης 4% πολυακρυλαμίδη. Η επιμέρους σύσταση κάθε πηκτώματος φαίνεται στον Πίνακα 2.

Μετουσίωση δειγμάτων : Σε κάθε πρωτεϊνικό δείγμα προστέθηκε διάλυμα μετουσίωσης σε αναλογία 2:1 . Το μίγμα επώαστηκε στους 100 °C για 5 min και στη συνέχεια μεταφέρθηκε σε πάγο.

Ηλεκτοφόρηση : Η συσκευή ηλεκτοφόρησης συναρμολογήθηκε προσεκτικά (χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο Mini Protean II της Bio Rad). Το πήκτωμα διαχωρισμού τοποθετήθηκε στη συσκευή και αφέθηκε μέχρι να πολυμεριστεί (30-60 min). Στη συνέχεια παρασκευάστηκε και εφαρμόστηκε στη συσκευή το πήκτωμα επιστοίβασης. Αμέσως εφαρμόστηκε στον υποδοχέα η κτένα δημιουργίας <<πηγαδιών>> στα οποία τοποθετήθηκαν στη συνέχεια τα προς ανάλυση δείγματα. Το διάλυμα αφέθηκε να πολυμεριστεί (20-30 min). Τα δοχεία της ηλεκτοφόρησης γεμίστηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτοφόρησης. Τέλος ποσότητα μετουσιωμένων δειγμάτων (30 µg ολικής πρωτεΐνης κάθε δείγματος) μεταφέρθηκε με μικροσύριγγα στις κατάλληλες θέσεις (πηγάδια, wells) και ηλεκτροφορήθηκαν αρχικά στα 120 και στη συνέχεια στα 150 V για 1 περίπου ώρα .

Πίνακας 2. Ποσοτική σύσταση τω πηκτωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην αποδιατακτική ηλεκτοφόρηση .

	ΠΗΚΤΩΜΑ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ			ΠΗΚΤΩΜΑ ΕΠΙΣΤΟΙΒΑΣΗΣ
	5%	7,5%	10%	4,0%
Lower buffer (1,5 Tris pH 8,9)	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	
Upper buffer (0,5 M Tris pH 6,8)				1,25 ml
H ₂ O	5,57 ml	4,65 ml	3,9 ml	3,05 ml
Διάλυμα ακρυλαμίδης (30%)	1,66 ml	2,5 ml	3,33 ml	0,67 ml
50% Γλυκερόλη	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	
10% Ammonium persulfate (APS)	65µl	65 µl	65 µl	25 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl	6 µl
ΣΥΝΟΛΟ	10 ml	10 ml	10 ml	5 ml

1.6 Χρωματισμός των Πρωτεϊνών με Coomassie Blue R-250

Η μέθοδος έγινε σύμφωνα με τον Λουλακάκη (1999).

1.6.1 Διαλύματα

- *Διάλυμα χρώσης* : 0,1% Coomassie Brilliant blue R-250, 50% μεθανόλη, 10% οξικό οξύ .
- *Διάλυμα αποχρωματισμού* : 20% μεθανόλη, 7% οξικό οξύ .

1.6.2 Διαδικασία

Με τη συμπλήρωση της SDS-PAGE ηλεκτοφόρησης, το πήκτωμα μεταφέρθηκε σε κατάλληλο δοχείο το οποίο περιέχει διάλυμα χρώσης (περίπου 100 ml). Το δοχείο τοποθετήθηκε σε ανακινούμενη πλάκα και αφήθηκε να αναδευτεί ελαφρά για τουλάχιστον 1 ώρα. Στη συνέχεια αφού απομακρύνθηκε το διάλυμα χρώσης, προστέθηκε το διάλυμα αποχρωματισμού και η ανάδευση συνεχίστηκε για αρκετές ώρες . Με τη διαδικασία αυτή η πηκτή αποχρωματίστηκε και παρέμειναν χρωματισμένες (μπλε – μοβ) μόνο οι ζώνες των πρωτεϊνών. Τα πρωτεϊνικά πρότυπα παρατηρήθηκαν σε φωτεινή τράπεζα.

1.7 Αποξήρανση του Πηκτώματος της Αποδιατακτικής Ηλεκτροφόρησης

1.7.1 Διαλύματα

Διαλύματα φιξαρίσματος : 20% αιθανόλη και 10% γλυκερόλη.

1.7.2 Διαδικασία

Μετά τον αποχρωματισμό του πηκτώματος το εμβαπτίζουμε μέσα στο διάλυμα φιξαρίσματος για τουλάχιστον 30 min. Αυτό βοηθάει στο να μειωθούν τα τυχόν σπασίματα του πηκτώματος, στη διάρκεια της αποξήρανσης, με αποτέλεσμα να έχουμε ένα πιο εύκαμπτο ξηρό πήκτωμα. Στην συνέχεια τοποθετούμε 2 φύλλα σελοφάν σε νερό για 1-2 min, ώστε να μαλακώσουν. Βάζουμε το ένα σελοφάν στην μεγάλη επιφάνεια της συσκευής αποξήρανσης αποφεύγοντας τις εγκλωβισμένες φυσαλίδες από αέρα μεταξύ τους και οι κομμένες άκρες της συσκευής να είναι προς τα κάτω .

Τοποθετούμε το πήκτωμα στο κέντρο της συσκευής, αποφεύγοντας και πάλι να εγκλωβίσουμε φυσαλίδες από αέρα, οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν σπασίματα στο πήκτωμα κατά την διάρκεια της αποξήρανσης του. Προσθέτουμε 1-2 ml από το διάλυμα φιξαρίσματος στο πήκτωμα επάνω. Τοποθετούμε το δεύτερο σελοφάν προσέχοντας οι άκρες του να ταιριάζουν με τις άκρες του προηγούμενου σελοφάν. Εάν υπάρχουν εγκλωβισμένες φυσαλίδες κυλάμε πάνω από το σελοφάν μια ράβδο ώστε να τις αποφύγουμε.

Τέλος τοποθετούμε και το μικρότερο μέρος της συσκευής αποξήρανσης, προσέχοντας οι κομμένες άκρες να είναι προς τα πάνω. Προσαρμόζουμε τα πλαστικά clips στις τέσσερις πλευρές της συσκευής. Τη συσκευή της τοποθετούμε σε οριζόντια θέση και θερμοκρασία δωματίου. Το πήκτωμα για να αποξηρανθεί πλήρως χρειάζεται 3-4 ημέρες.

1.8 Μεταφορά κατά Western blot-Ανοσοανίχνευση

1.8.1 Διάλυμα

- Διάλυμα μεταφοράς : 25 mM Tris, 192 mM γλυκίνη.
- *PSA (phosphate buffered saline)* : 0,8% NaCl, 0,02% KCl, 0,115% Na₂HPO₄, 0,02% KH₂PO₄.
- 2% BSA (αλβουμίνη από ορό βοδιού) σε PBS.
- 20% Tween-20.
- Διάλυμα πλύσης : 0,05% Tween-20 σε PBS.
- 1% BSA σε διάλυμα πλύσης.

1.8.2 Διαδικασία

Μετά το τέλος της ηλεκτοφόρησης το πήκτωμα αφαιρέθηκε από την συσκευή και τοποθετούμε προσεκτικά σε δοχείο που περιείχε διάλυμα μεταφοράς για 5 λεπτά. Στη συνέχεια το πήκτωμα και τα άλλα απαραίτητα υλικά τοποθετήθηκαν στην κασέτα της συσκευής ηλεκτρομεταφοράς με την εξής σειρά (από κάτω προς τα πάνω) : σπόγγος – χαρτί Whatman – πήκτωμα – μεμβράνη νιτροκυτταρίνης – χαρτί Whatman – σπόγγος.

Η μεταφορά των πρωτεϊνών έγινε στα 70 V για μια ώρα. Κάθε μεμβράνη που ετοιμάστηκε με αυτό τον τρόπο χρησιμοποιήθηκε για την

ανίχνευση των πολυπεπτιδίων ενός εκ των ενζύμων γλουταμική αφυδρογονάση (GDH), συνθετάση της γλουταμίνης (GS) ή συνθάση του γλουταμικού (GOGAT) με τη βοήθεια του κατάλληλου αντισώματος. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν είχαν παρασκευαστεί προηγούμενα σε κουνέλια εναντίον των αντίστοιχων ενζύμων του αμπελιού .

Τα κύρια στάδια της διαδικασίας ανίχνευσης ήταν :

- Επώαση των φίλτρων για 1 ώρα σε διάλυμα 2% BSA σε PBS.
- Πλύσιμο 3X5 λεπτά με διάλυμα πλύσης.
- Επώαση για 1 ώρα με το κατάλληλο αντίσωμα (αραίωση 1:5000 σε 1% BSA σε διάλυμα πλύσης).
- Πλύσιμο 5X5 λεπτά με διάλυμα πλύσης.
- Επώαση για 1 ώρα με το κατάλληλο αντι-αντίσωμα (αντίσωμα γουρουνιού που αναγνωρίζει τα αντισώματα του κουνελιού, συνδεδεμένο με αλκαλική φωσφατάση, αραίωση 1:5000) σε 1% BSA σε διάλυμα πλύσης.
- Επώαση στο διάλυμα αντίδρασης (περιέχει να υποστρώματα του ενζύμου αλκαλική φωσφατάση) μέχρι την εμφάνιση των ζωνών.

1.9 Μέτρηση Ενεργότητας του Ενζύμου GDH (Λουλακάκης , 1999)

1.9.1 Διαλύματα

- 1 M Tris-HCl pH 8,0.
- 2 M NH₄Cl.
- 10 mM CaCl₂.
- 200 mM α-κετογλουταρικό οξύ.
- 2 mM NADH.

1.9.2 Διαδικασία

Η ενεργότητα της GDH μετρήθηκε μέσω της αμινωτικής αντίδρασης (Λουλακάκης, 1999). Από τα παραπάνω διαλύματα παρασκευάστηκε μίγμα που αποτελούνταν από : 5ml 1 M Tris-HCl, 5 ml 2 M NH₄Cl, 5 ml 10mM CaCl₂, 5 ml 200 mM Α-κετογλουταρικό οξύ και 22,5 ml H₂O. Για την αμινωτική αντίδραση προστέθηκαν σε κυψελίδα του 1 ml 850 μl μίγματος, 20 μl εκχυλίσματος αγγουριού, 30 μl απιονισμένο H₂O και εξισορροπήθηκαν στους 30 °C για 3 min. Στην συνέχεια προστέθηκαν 100 μl 2 mM NADH για την έναρξη της αντίδρασης. Η ενζυμική ενεργότητα προσδιορίστηκε με την μέτρηση της αλλαγής της απορρόφησης στα 340 nm σε φασφατοφωτόμετρο. Στη συνέχεια υπολογίστηκε η ειδική ενεργότητα της GDH { Specific activity = GDH

ενεργότητα ($\Delta OD / \text{min ml}$) / συνολικές πρωτεΐνες (mg/ml)). Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν επίσης σε mUnits/mg πρωτεΐνης ($1000 \text{ mUnits} = 1 \text{ Unit} = 1 \mu\text{mol NADH}$ που καταναλώθηκε $/\text{min}$). Η διαδικασία αυτή ακολουθήθηκε και για τα υπόλοιπα φυτικά είδη, την τομάτα, το χρυσάνθεμο και της ρίζες αυτών.

2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2.1 Χαρακτηρισμός των Ενζύμων Γλουταμικής Αφυδρογονάσης (GDH), Γλουταμινικής Συνθετάσης (GS) και Γλουταμικής Συνθάσης (GOGAT) στα Φυτά Χρυσάνθεμου, Αγγουριάς και Τομάτας.

Φυτά χρυσάνθεμου, αγγουριάς και τομάτας τα οποία είχαν αναπτυχθεί σε θάλαμο ανάπτυξης με ελεγχόμενες συνθήκες φωτισμού και θερμοκρασίας, εκχειλίστηκαν με σκοπό την απομόνωση των πρωτεϊνών τους, ώστε να μπορέσουμε να μελετήσουμε τα βιοχημικά χαρακτηριστικά τους στα εξεταζόμενα φυτικά είδη. Η εκχύλιση έγινε σε φύλλα-βλαστούς και ρίζες φυτών αγγουριάς, τομάτας και χρυσανθέμων.

Στα εκχυλίσματα που προέκυψαν έγινε ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Lowry, με σκοπό την εκτίμηση της σχετικής περιεκτικότητας κάθε ενός από τους ιστούς σε πρωτεΐνες. Τα αποτελέσματα του προσδιορισμού παρουσιάζονται στον Πίνακα 3, από τα οποία βλέπουμε ότι μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες (mg πρωτεΐνης $/\text{ml}$ εκχυλίσματος) παρουσίασε το υπέργειο μέρος του χρυσάνθεμου, ενώ την μικρότερη το αγγούρι. Οι ρίζες αγγουριάς και χρυσάνθεμου έδωσαν μεγαλύτερη ποσότητα πρωτεϊνών σε σχέση με την τομάτα.

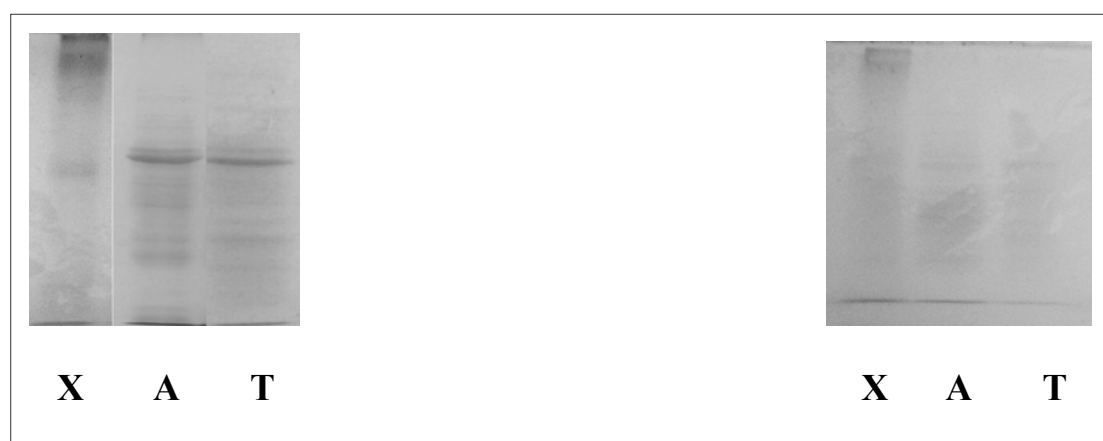
Στην συνέχεια ίση ποσότητα πρωτεϊνών από κάθε φυτικό ιστό μετουσιώθηκε και ηλεκτροφορήθηκε με SDS-PAGE σε επίπεδα πηκτώματος 10% ακρυλαμίδης, με απώτερο σκοπό την ανάλυση των εκχυλισμάτων στις επιμέρους πρωτεϊνικές ζώνες. Το πρωτεϊνικό πρότυπο κάθε ιστού που προέκυψε μετά τη χρώση του πηκτώματος με Coomassie brilliant blue R-250 φαίνεται στην Εικόνα 1. Στην Εικόνα αυτή διακρίνονται διαφορές στην παρουσία αλλά και στην ένταση των ζωνών μεταξύ των ιστών.

Πίνακας 3. Ολικές πρωτεΐνες και ενζυμική ενεργότητα GDH σε ιστούς χρυσάνθεμου, αγγουριάς και τομάτας.

		ΜΕΘΟΔΟΣ LOWRY	ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ GDH
		ΟΛΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ mg / ml	ΕΙΔΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ OD/min* mg
ΧΡΥΣΑΝΘΕΜΟ	ΥΠΕΡΓΕΙΟ ΜΕΡΟΣ	1,47	0,98
	ΡΙΖΑ	0,7	0,92
ΑΓΓΟΥΡΙ	ΥΠΕΡΓΕΙΟ ΜΕΡΟΣ	0,92	2,91
	ΡΙΖΑ	0,7	7,07
ΤΟΜΑΤΑ	ΥΠΕΡΓΕΙΟ ΜΕΡΟΣ	1,26	2,63
	ΡΙΖΑ	0,4	5,62

Στα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα εκτιμήθηκε επίσης η ενζυμική ενεργότητα της GDH. Η ενεργότητα της GDH προσδιορίστηκε μέσω της αμινωτικής αντίδρασης, μετρώντας τη μεταβολή της απορρόφησης (ΔOD) στα 340 nm σε φασματοφωτόμετρο. Επίσης, υπολογίστηκε η

ειδική ενεργότητα σε κάθε ιστό (Πίνακας 3). Η υψηλότερη ειδική ενεργότητα της GDH παρατηρήθηκε στους ιστούς του υπέργειου μέρους (2,91 OD/min*mg πρωτεΐνης) του φυτού αγγουριάς, ενώ η μικρότερη στους ιστούς του υπέργειου μέρους (0,98 OD/min*mg πρωτεΐνης) του φυτού χρυσάνθεμου. Όσον αφορά την ρίζα η υψηλότερη ειδική ενεργότητα της GDH παρατηρήθηκε στους ιστούς της ρίζας (7,07 OD/min*mg πρωτεΐνης) του φυτού αγγουριάς ενώ η μικρότερη στους ιστούς της ρίζας (0,92 OD/min*mg πρωτεΐνης) του φυτού χρυσάνθεμου (Πίνακας 3).

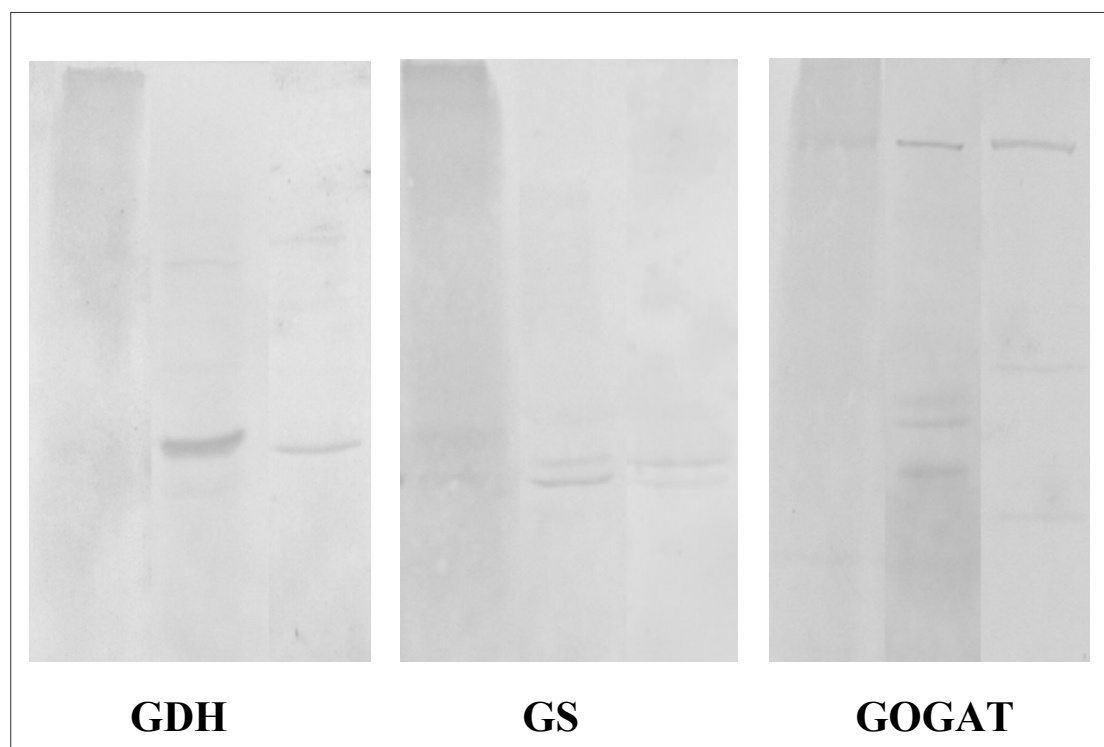


ΕΙΚΟΝΑ 1. Πρωτεϊνικά πρότυπα υπέργειου μέρους φυτών χρυσανθέμου, αγγουριού και τομάτας (αριστερά) και των ριζών τους αντιστοίχως (δεξιά), που προέκυψαν μετά την ανάλυση με SDS-PAGE και την χρώση ολικών πρωτεϊνών .

Με σκοπό τη μελέτη των υπομονάδων των τριών ενζύμων, τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από τους διάφορους ιστούς αναλύθηκαν με SDS-PAGE, υποβλήθηκαν σε Western blot (με τη μέθοδο αυτή οι πρωτεΐνες μεταφέρονται από την πηχτή σε σταθερό υπόστρωμα, στην προκειμένη περίπτωση σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, όπου στη συνέχεια μπορεί εύκολα να ανιχνευτεί μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη, από το σύνολο των πρωτεϊνών που έχουν αναλυθεί) και στη συνέχεια τα τρία ένζυμα ανιχνεύθηκαν ανοσολογικά. Η ανοσοανίχνευση των ενζύμων έγινε με τη βοήθεια αντισωμάτων κουνελιού που αναγνωρίζουν τα αντίστοιχα ένζυμα του αμπελιού .

Στην περίπτωση της GS ανιχνεύθηκαν οι δύο τύποι υπομονάδων με τη μορφή δύο διακριτών ζωνών που αντιστοιχούν στα δύο ισοένζυμα (στην κυτοπλασμική GS1 και στη χλωροπλαστική GS2) του ενζύμου (Εικόνα 2). Σε όλους τους ιστούς που μελετήθηκαν οι δυο υπομονάδες αναλύθηκαν με τον ίδιο τρόπο, με τη χλωροπλαστική υπομονάδα να έχει μεγαλύτερο μέγεθος (44 kDa) από την κυτοπλασμική (41 kDa). Η GS1

ανιχνεύτηκε σε όλους τους ιστούς, με εντονότερη εμφάνιση στους ιστούς αγγουριάς, τομάτας και στις ρίζες αυτών, ενώ είχε μειωμένη εμφάνιση στους ιστούς χρυσαυθάνου. Η GS2 εντοπίστηκε σε μεγαλύτερη ποσότητα στο υπέργειο μέρος και των τριών ειδών, ενώ είχε μειωμένη εμφάνιση στους ιστούς της ρίζας .

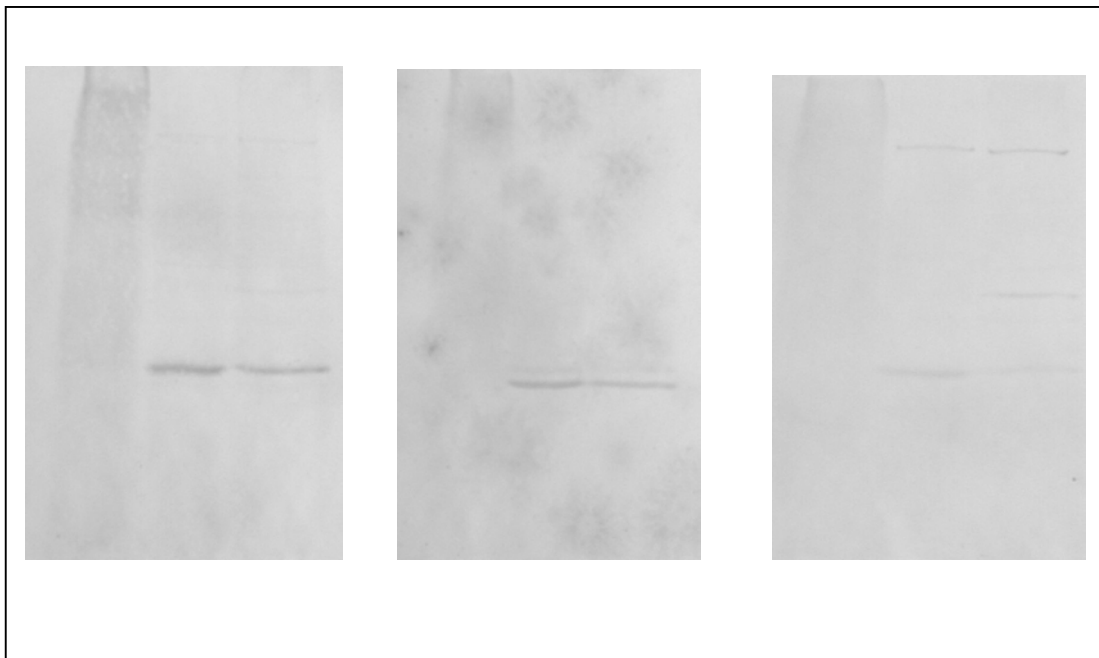


ΕΙΚΟΝΑ 2. Πρωτεϊνικές ζώνες της GDH, GS και GOGAT από το υπέργειο μέρος χρυσαυθάνου, αγγουριού και τομάτας. Οι ολικές πρωτεΐνες αναλύθηκαν με SDS-PAGE και μεταφέρθηκαν σε φίλτρα νιτοκυτταρίνης με τη μέθοδο Western Blot.

Στην περίπτωση της GDH αναπτύχθηκε μια ζώνη σε κάθε ιστό (Εικόνα 2). Στο υπέργειο μέρος της αγγουριάς παρατηρήθηκε αυξημένη συσσώρευση της GDH, όπως και στη ρίζα του, ακολουθεί η GDH της τομάτας η οποία εμφανίζεται μειωμένη και τέλος η GDH του χρυσαυθάνου εμφανίστηκε σε ελάχιστη ποσότητα τόσο στο υπέργειο μέρος, όσο και στην ρίζα.

Τέλος η GOGAT ανιχνεύτηκε σε μεγάλη ποσότητα στα φύλλα, ενώ η παρουσία της στους ιστούς της ρίζας ήταν οριακή (Εικόνα 2). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, το ένζυμο αυτό εμφανίζεται κυρίως στο υπέργειο

μέρος των φυτών στα οποία έχει μελετηθεί ενώ στα άλλα όργανα η παρουσία του είναι αμελητέα .



ΕΙΚΟΝΑ 2. Πρωτεϊνικές ζώνες της GDH, GS και GOGAT από το υπόγειο μέρος χρυσάνθεμου, αγγουριού και τομάτας. Οι ολικές πρωτεΐνες αναλύθηκαν με SDS-PAGE και μεταφέρθηκαν σε φίλτρα νιτοκυτταρίνης με τη μέθοδο Western Blot.

2.2 Επίδραση επεξεργασμένων υγρών αποβλήτων στην ανάπτυξη και στα βιοχημικά χαρακτηριστικά του φυτού Χρυσάνθεμου

Στο πείραμα αυτό κόμβοι φυτών χρυσάνθεμου εμφυτεύτηκαν σε 7 διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα που περιείχαν επεξεργασμένα υγρά απόβλητα και παρακολούθηθηκε η ανάπτυξη τους. Στο τέλος του πειράματος συλλέχθηκαν δείγματα από το υπέργειο μέρος των φυτών και τις ρίζες και χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη της επίδρασης των αποβλήτων στην ποσότητα πρωτεϊνών και στα ένζυμα GDH, GS και GOGAT.

2.2.1 Επίδραση των υγρών αποβλήτων σε μακροσκοπικά χαρακτηριστικά των φυτών Χρυσάνθεμου

Σε όλες τις περιπτώσεις η ανάπτυξη των φυτών ήταν φυσιολογική χωρίς να παρατηρηθούν αξιοσημείωτες διαφορές μεταξύ των φυτών των διαφορετικών επεμβάσεων, με εξαίρεση τα φυτά του μάρτυρα που για κάποιο πειραματικό λόγο παρουσίασαν μειωμένη ανάπτυξη. Όλα είχαν πλούσιο υπέργειο μέρος με καλά ανεπτυγμένο βλαστό και φύλλα πράσινου χρώματος χωρίς την εμφάνιση οποιουδήποτε συμπτώματος τοξικότητας, επίσης τα φυτά ανέπτυξαν κανονικό ριζικό σύστημα.

Στις εικόνες 3 και 4 παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά φυτά χρυσάνθεμου που αναπτύχθηκαν στα διαφορετικά υποστρώματα του πειράματος.



ΕΙΚΟΝΑ 3. Αντιπροσωπευτικά in vitro φυτά χρυσάνθεμου που αναπτύχθηκαν υπό την επίδραση των υγρών αποβλήτων, μέσα σε σωλήνα. Ξεκινώντας αριστερά από τον μάρτυρα (MS), ακολουθεί η επέμβαση 2^η (MS+υγρά απόβλητα σε στάδιο πρωτοβάθμιας επεξεργασίας), ΕΠ 3^η (MS+υγρά απόβλητα σε στάδιο δευτεροβάθμιας επεξεργασίας), ΕΠ 4^η (MS+υγρά απόβλητα σε στάδιο δευτεροβάθμια επεξεργασία, φιλτραρισμένα), ΕΠ 5^η (MS+υγρά απόβλητα σε στάδιο χλωρίωσης), ΕΠ 6^η (1/2 MS+υγρά απόβλητα σε στάδιο δευτεροβάθμια επεξεργασία) και ΕΠ 7^η (1/4 MS+υγρά απόβλητα σε στάδιο δευτεροβάθμια επεξεργασία).

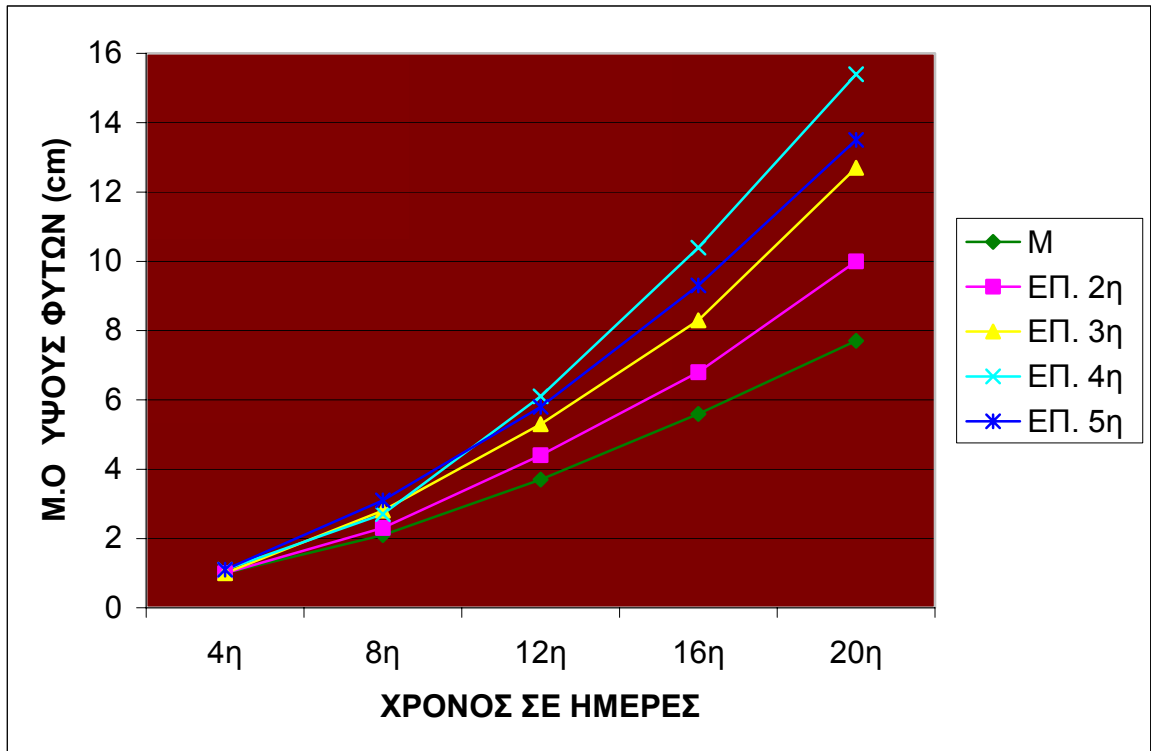


ΕΙΚΟΝΑ 4. Αντιπροσωπευτικά in vitro φυτά χρυσάνθεμου που αναπτύχθηκαν υπό την επίδραση των υγρών αποβλήτων, εκτός σωλήνα. Ξεκινώντας αριστερά από τον μάρτυρα (MS), ακολουθεί η επέμβαση 2^η (MS+υγρά απόβλητα σε στάδιο πρωτοβάθμιας επεξεργασίας), ΕΠ 3^η (MS+υγρά απόβλητα σε στάδιο δευτεροβάθμιας επεξεργασίας), ΕΠ 4^η (MS+υγρά απόβλητα σε στάδιο δευτεροβάθμιας επεξεργασίας, φιλτραρισμένα), ΕΠ 5^η (MS+υγρά απόβλητα σε στάδιο χλωρίωσης), ΕΠ 6^η (1/2 υγρά

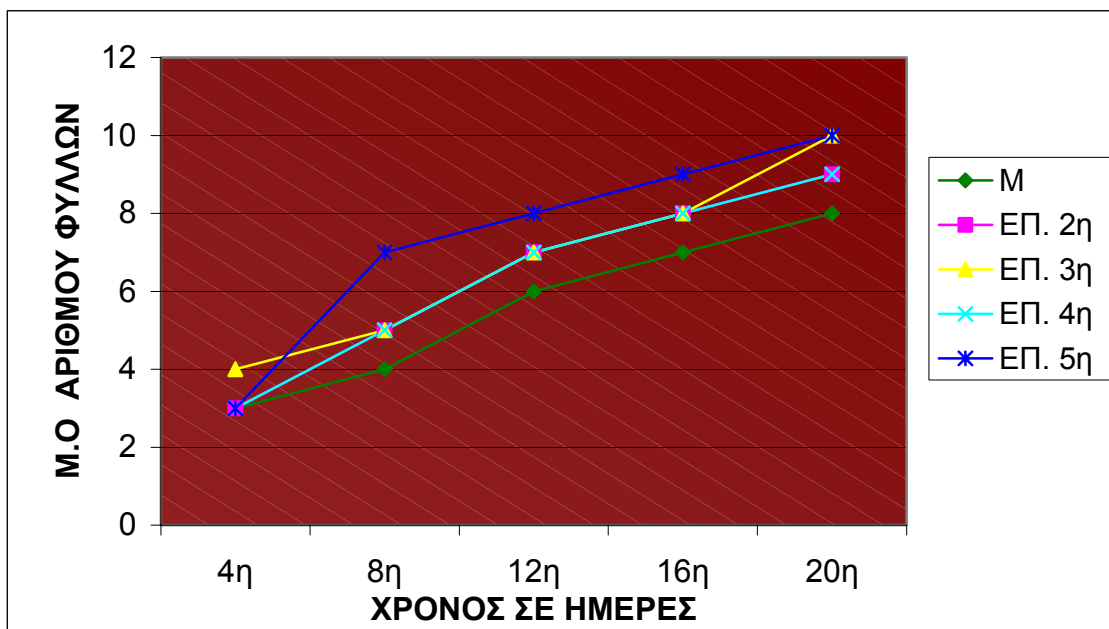
Στην συνέχεια έγινε μέτρηση του ύψους και του αριθμού των φύλλων των φυτών χρυσάνθεμου, ώστε να δούμε την επίδραση των απόβλητων στην ανάπτυξη των φυτών (Πίνακας 4). Αυτό το οποίο παρατηρούμε από τον ακόλουθο Πίνακα είναι ότι η επέμβαση με τα υψηλότερα φυτά είναι η επέμβαση 4 (MS με λύματα σε στάδιο δευτεροβάθμιας επεξεργασίας, φιλτραρισμένα), και παρόμοια ανάπτυξη είχαν και οι υπόλοιπες επεμβάσεις.

Πίνακας 4. Μέσος όρος μεταβολής ύψους και αριθμού φύλλων φυτών χρυσάνθεμου ανεπτυγμένα σε θρεπτικό υπόστρωμα, με λύματα σε διαφορετικά στάδια επεξεργασίας. Τα φυτά αναπτύχθηκαν για 20 ημέρες.

ΧΡΥΣΑΝΘΕΜΟ		ΧΡΟΝΟΣ ΗΜΕΡΕΣ				
ΥΨΟΣ		4 ^η	8 ^η	12 ^η	16 ^η	20 ^η
ΕΠΕΜΒΑΣΕΙΣ	ΜΑΡΤΥΡΑΣ	1	2.1	3.7	5.6	7.7
	ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ 2	1	2.3	4.4	6.8	10
	ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ 3	1	2.8	5.3	8.3	12.7
	ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ 4 ^ο	1.1	2.7	6.1	10.4	15.4
	ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ	1.1	3.1	5.8	9.3	13.5
ΦΥΛΛΑ						
ΕΠΕΜΒΑΣΕΙΣ	ΜΑΡΤΥΡΑΣ	3	4	6	7	8
	ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ 2	3	5	7	8	9
	ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ 3	4	5	7	8	10
	ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ 4 ^ο	3	5	7	8	9
	ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ 5 ^ο	3	7	8	9	10



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 1. Μέσος όρος ύψους φυτών χρυσάνθεμου, που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικά υποστρώματα, με λύματα από διαφορετικά στάδια επεξεργασίας. Τα φυτά αναπτύχθηκαν συνολικά για 20 ημέρες.



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 2. Μέσος όρος αριθμού φύλλων φυτών χρυσάνθεμου, που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικά υποστρώματα, με λύματα από διαφορετικά στάδια επεξεργασίας. Τα φυτά αναπτύχθηκαν συνολικά για 20 ημέρες.

2.2.2 Επίδραση των υγρών αποβλήτων σε βιοχημικά χαρακτηριστικά των φυτών Χρυσάνθεμου

Οι πρωτεΐνες από το υπέργειο μέρος των φυτών χρυσάνθεμου εκχειρίστηκαν με σκοπό να μελετηθεί η επίδραση των υγρών αποβλήτων στα βιοχημικά χαρακτηριστικά τους.

Στα εκχυλίσματα που προέκυψαν έγινε ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Lowry, με σκοπό την εκτίμηση της σχετικής περιεκτικότητας κάθε ενός από τους ιστούς σε πρωτεΐνες. Επίσης έγινε προσδιορισμός της ενεργότητας (GDH). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.

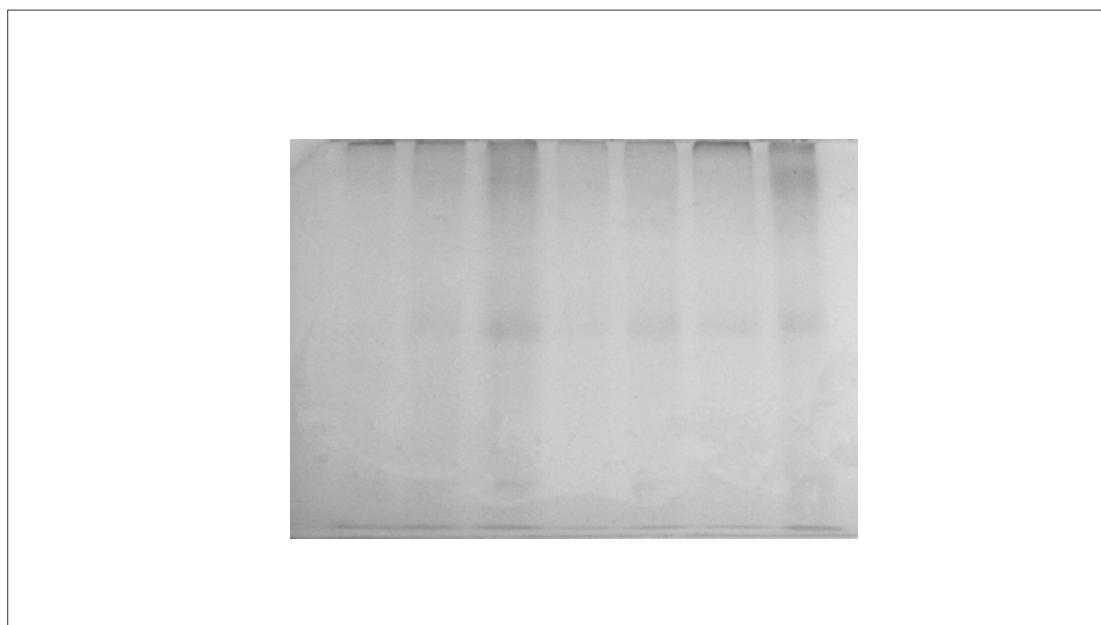
Πίνακας 5. Ολικές πρωτεΐνες και ειδική ενεργότητα της GDH στο υπέργειο μέρος φυτών χρυσάνθεμου.

ΥΠΕΡΓΕΙΟ		ΜΕΘΟΔΟΣ LOWRY		ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ GDH
		ΑΠΟΡΡΟΦΗΣ	ΟΛΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ	ΕΙΔΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ
	Μ	0.46	1.47	0.98
	ΕΠ. 2 ^η	0.63	2.01	0.64
	ΕΠ 3 ^η	0.38	1.12	0.78
	ΕΠ 4 ^η	0.31	0.99	1.56
	ΕΠ 5 ^η	0.68	2.17	0.57
	ΕΠ 6 ^η	0.44	1.40	0.99
	ΕΠ 7 ^η	0.37	1.18	0.92

Από τα αποτελέσματα τα οποία βλέπουμε στον Πίνακα 5 παρατηρούμε ότι ο ιστός με την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες (mg πρωτεΐνης/g φυτικού ιστού) είναι εκείνος της 5^η Επέμβασης (λύματα τα οποία βρίσκονταν στο στάδιο χλωρίωσης).

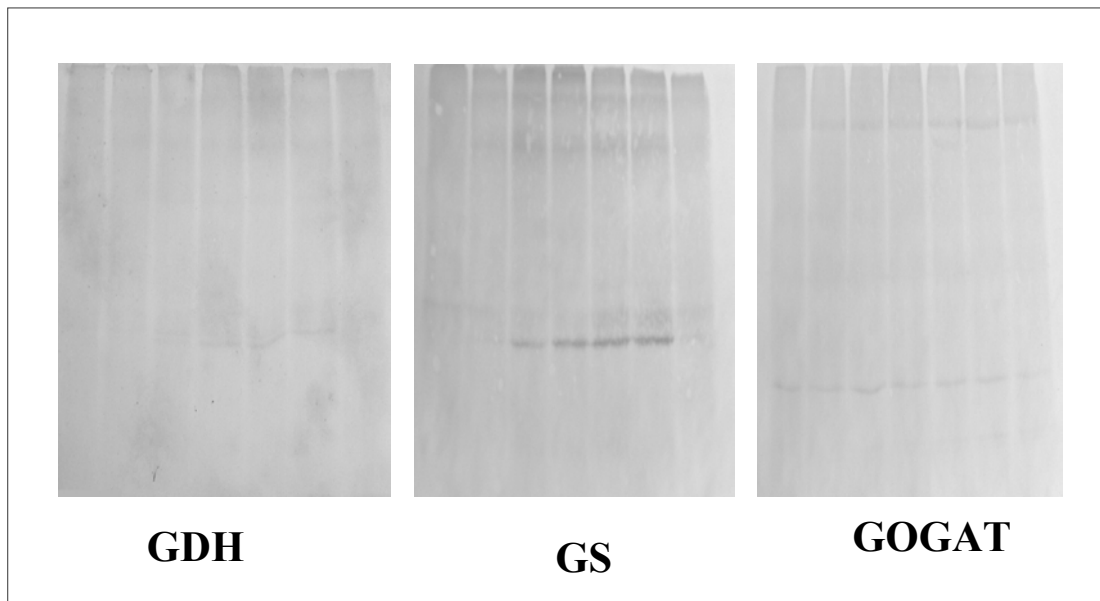
Όσον αφορά την ενεργότητα, ο ιστός ο οποίος αναπτύχθηκε σε λύματα τα οποία βρίσκονταν στο στάδιο της Δευτεροβάθμιας Επεξεργασίας είχε την μεγαλύτερη ενεργότητα.

Στην συνέχεια ίση ποσότητα πρωτεϊνών από κάθε φυτικό ιστό μετουσιώθηκε και ηλεκτοφορήθηκε με SDS-PAGE, με σκοπό την ανάλυση των εκχυλισμάτων στις επιμέρους πρωτεϊνικές ζώνες. Το πρωτεϊνικό πρότυπο κάθε ιστού που προέκυψε μετά τη χρώση του πηκτώματος με Coomassie brilliant blue R-250 φαίνεται στην Εικόνα 5.



ΕΙΚΟΝΑ 5. Πρωτεϊνικά Πρότυπα υπέργειου μέρους φυτού χρυσάνθεμου, που προέκυψαν μετά την ανάλυση με SDS-PAGE και την Χρώση Ολικών Πρωτεϊνών .

Με σκοπό τη μελέτη των υπομονάδων των τριών ενζύμων (GDH, GS, GOGAT), τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των διαφορετικών επεμβάσεων από τα φυτά χρυσάνθεμου αναλύθηκαν με SDS-PAGE, υποβλήθηκαν σε Western blot και στη συνέχεια τα τρία ένζυμα ανιχνεύτηκαν ανοσολογικά. Η ανοσοανίχνευση των ενζύμων έγινε με τη βοήθεια αντισωμάτων κουνελιού που αναγνωρίζουν τα αντίστοιχα ένζυμα του αμπελιού. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην Εικόνα 6.



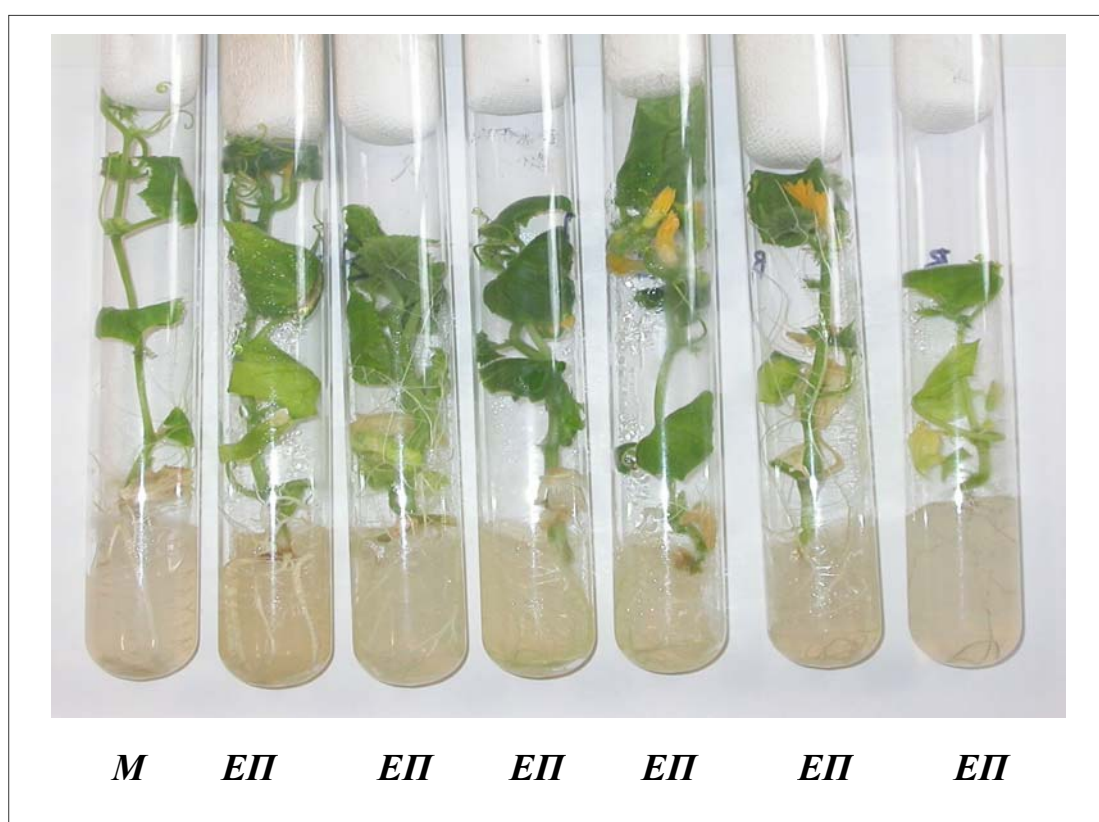
ΕΙΚΟΝΑ 6. Πρωτεϊνικές ζώνες της GDH, της GS και της GOGAT από το Υπέργειο Μέρος του φυτού χρυσάνθεμου, που προέκυψαν μετά από ανάλυση SDS-PAGE, μεταφορά με Western blot και ανίχνευση με τα κατάλληλα αντισώματα .

2.3 Επίδραση επεξεργασμένων υγρών αποβλήτων στην ανάπτυξη και στα βιοχημικά χαρακτηριστικά του φυτού αγγουριάς

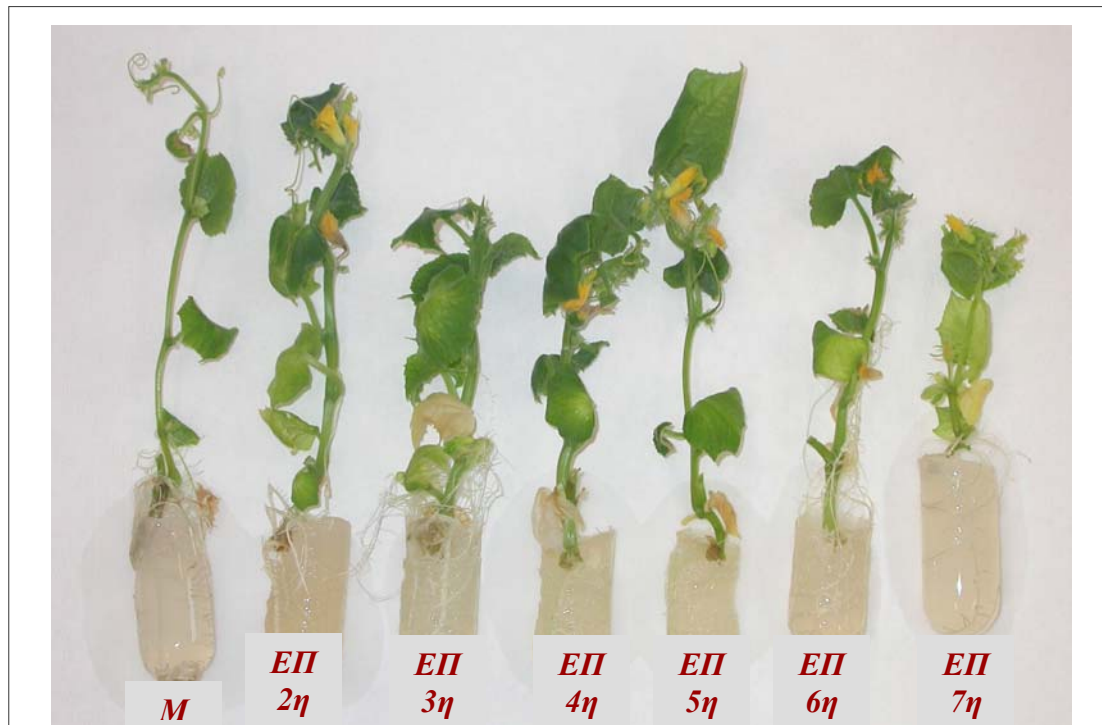
Σπόροι αγγουριάς καλλιεργήθηκαν με την μέθοδο της *in vitro* καλλιέργειας και εμφυτεύτηκαν σε 7 διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα που περιείχαν επεξεργασμένα υγρά απόβλητα τα οποία στην συνέχεια αναπτύχθηκαν σε θάλαμο με αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες και παρακολούθηθηκε η ανάπτυξη τους. Στο τέλος του πειράματος συλλέχθηκαν δείγματα από το υπέργειο μέρος των φυτών και τις ρίζες και χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη της επίδρασης των αποβλήτων στην ποσότητα πρωτεϊνών και στα ένζυμα GDH, GS και GOGAT.

2.3.1 Επίδραση των υγρών αποβλήτων σε μακροσκοπικά χαρακτηριστικά του φυτού αγγουριάς

Σε όλες τις περιπτώσεις η ανάπτυξη των φυτών ήταν φυσιολογική χωρίς να παρατηρηθούν αξιοσημείωτες διαφορές μεταξύ των φυτών των διαφορετικών επεμβάσεων, με εξαίρεση τα φυτά του μάρτυρα που για κάποιο πειραματικό λόγο παρουσίασαν μειωμένη ανάπτυξη. Όλα είχαν πλούσιο υπέργειο μέρος με καλά ανεπτυγμένο βλαστό και φύλλα πράσινου χρώματος χωρίς την εμφάνιση οποιουδήποτε συμπτώματος τοξικότητας, επίσης τα φυτά ανέπτυξαν κανονικό ριζικό σύστημα. Στις εικόνες 7 και 8 παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά φυτά χρυσάνθεμου που αναπτύχθηκαν στα διαφορετικά υποστρώματα του πειράματος.



ΕΙΚΟΝΑ 7. Αντιπροσωπευτικά in vitro φυτά αγγουριάς που αναπτύχθηκαν υπό την επίδραση των υγρών αποβλήτων, μέσα σε σωλήνα. Ξεκινώντας αριστερά από τον μάρτυρα(MS), ακολουθεί η επέμβαση 2^η(MS+υγρά απόβλητα σε στάδιο πρωτοβάθμιας επεξεργασίας), EΠ 3^η (MS+υγρά απόβλητα σε στάδιο δευτεροβάθμιας επεξεργασίας), EΠ 4^η (MS+υγρά απόβλητα σε στάδιο δευτεροβάθμια επεξεργασία, φιλτραρισμένα), EΠ 5^η (MS+υγρά απόβλητα σε στάδιο χλωρίωσης), EΠ 6^η (1/2 MS+υγρά απόβλητα σε στάδιο δευτεροβάθμια επεξεργασία) και EΠ 7^η (1/4 MS+υγρά απόβλητα σε στάδιο δευτεροβάθμια επεξεργασία).

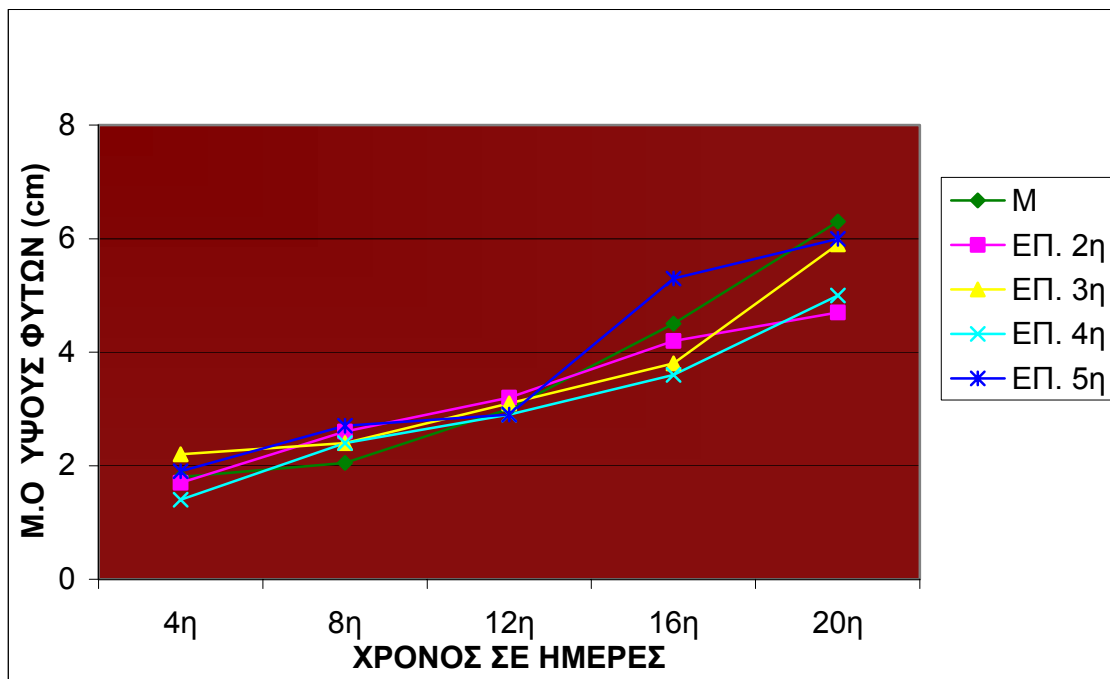


ΕΙΚΟΝΑ 8. Αντιπροσωπευτικά in vitro φυτά αγγουριάς που αναπτύχθηκαν υπό την επίδραση των υγρών αποβλήτων, εκτός σωλήνα. Ξεκινώντας αριστερά από τον μάρτυρα(MS), ακολουθεί η επέμβαση 2^η(MS+υγρά απόβλητα σε στάδιο πρωτοβάθμιας επεξεργασίας), ΕΠ 3^η (MS+υγρά απόβλητα σε στάδιο δευτεροβάθμιας επεξεργασίας), ΕΠ 4^η (MS+υγρά απόβλητα σε στάδιο δευτεροβάθμια επεξεργασία, φιλτραρισμένα), ΕΠ 5^η (MS+υγρά απόβλητα σε στάδιο χλωρίωσης), ΕΠ 6^η (1/2 MS+υγρά απόβλητα σε στάδιο δευτεροβάθμια επεξεργασία) και ΕΠ 7^η (1/4 MS+υγρά απόβλητα σε στάδιο δευτεροβάθμια επεξεργασία).

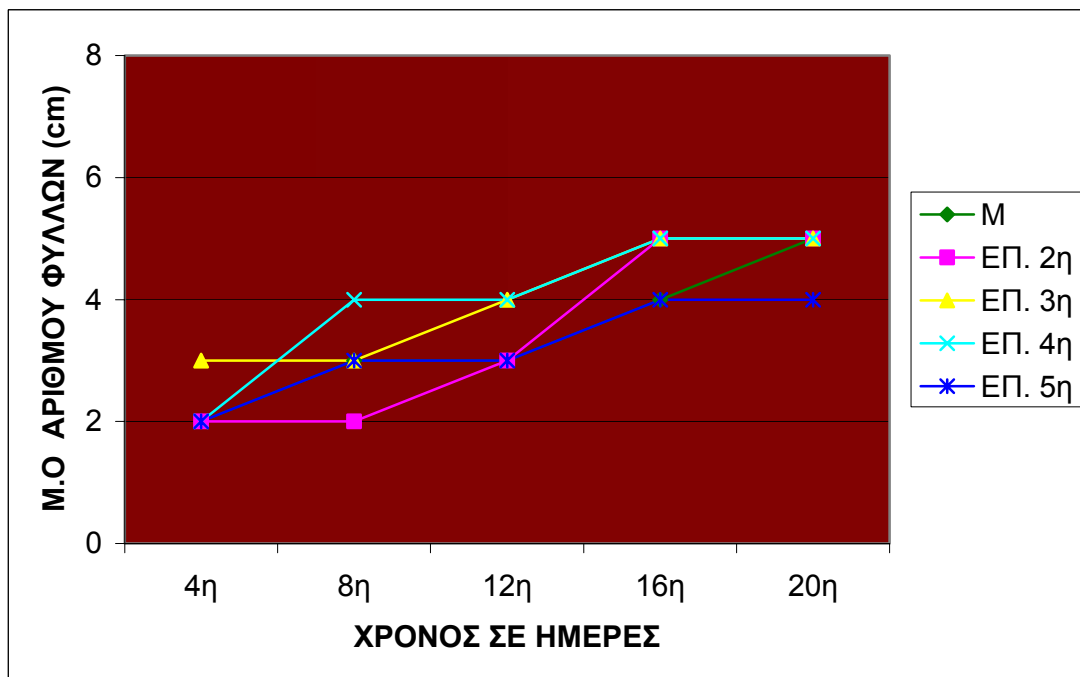
Με την παρέλευση 20 ημερών των φυτών αγγουριάς στον θάλαμο ανάπτυξης με ελεγχόμενες συνθήκες, έγινε μέτρηση τόσο του ύψους όσο και του αριθμού των φύλλων τους όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε από τον Πίνακα 6. Αυτό το οποίο βλέπουμε είναι ότι τα φυτά όλων των επεμβάσεων είχαν σχεδόν όλα την ίδια ανάπτυξη και τον ίδιο αριθμό φύλλων.

Πίνακας 6. Μέσος όρος μεταβολής ύψους και αριθμού φύλλων φυτών αγγουριάς ανεπτυγμένα σε θρεπτικό υπόστρωμα, με λύματα σε διαφορετικά στάδια επεξεργασίας. Τα φυτά αναπτύχθηκαν για 20 ημέρες.

ΑΓΓΟΥΡΙ		ΧΡΟΝΟΣ ΣΕ ΗΜΕΡΕΣ				
ΥΨΟΣ		4 ^η	8 ^η	12 ^η	16 ^η	20 ^η
ΕΠΕΜΒΑΣΕΙΣ	ΜΑΡΤΥΡΑΣ	1.8	2.05	3	4.5	6.3
	ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ 2 ^ο	1.7	2.6	3.2	4.2	4.7
	ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ 3 ^ο	2.2	2.4	3.1	3.8	5.9
	ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ 4 ^ο	1.4	2.4	2.9	3.6	5
	ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ 5 ^ο	1.9	2.7	2.9	5.3	6
ΦΥΛΛΑ						
ΕΠΕΜΒΑΣΕΙΣ	ΜΑΡΤΥΡΑΣ	2	3	3	4	5
	ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ 2 ^ο	2	2	3	5	5
	ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ 3 ^ο	3	3	4	5	5
	ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ 4 ^ο	2	4	4	5	5
	ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ 5 ^ο	2	3	3	4	4



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 3. Μέσος όρος ύψους φυτών αγγουριάς, που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικά υποστρώματα, με λύματα από διαφορετικά στάδια επεξεργασίας. Τα φυτά αναπτύχθηκαν για 20 ημέρες.



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 4. Μέσος όρος αριθμού φύλλων φυτών αγγουριάς, που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικά υποστρώματα, με λύματα από διαφορετικά στάδια επεξεργασίας. Τα φυτά αναπτύχθηκαν για 20 ημέρες.

2.3.2 Επίδραση των υγρών αποβλήτων σε βιοχημικά χαρακτηριστικά των φυτών αγγουριάς

Οι πρωτεΐνες από το υπέργειο μέρος των φυτών αγγουριάς εκχειλίστηκαν με σκοπό να μελετηθεί η επίδραση των υγρών αποβλήτων στα βιοχημικά χαρακτηριστικά τους.

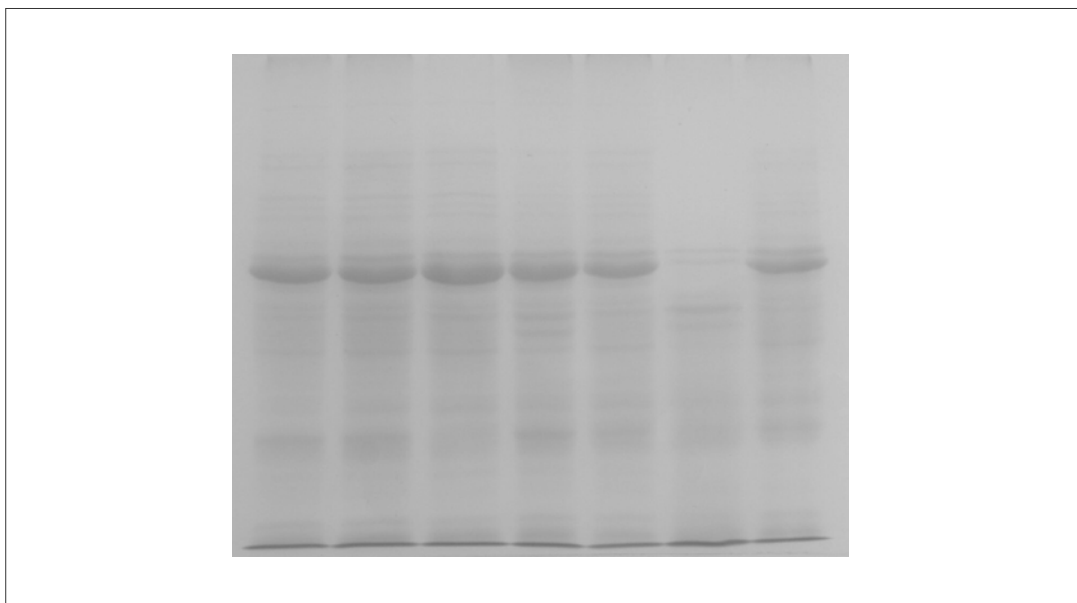
Στα εκχυλίσματα που προέκυψαν έγινε ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Lowry, με σκοπό την εκτίμηση της σχετικής περιεκτικότητας κάθε ενός από τους ιστούς σε πρωτεΐνες. Επίσης έγινε προσδιορισμός της ενεργότητας (GDH). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7. Ολικές πρωτεΐνες και ειδική ενεργότητα της GDH στο υπέργειο μέρος φυτών αγγουριάς.

ΥΠΕΡΓΕΙΟ ΜΕΡΟΣ		ΜΕΘΟΔΟΣ LOWRY		ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ GDH
		ΑΠΟΡΡΟΦΗΣ Η OD/min*mL	ΟΛΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ mg / ml	ΕΙΔΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ OD/min* mg
ΑΓΓΟΥΡΙ	Μ	0.29	0.92	2,91
	ΕΠ. 2 ^η	0.25	0.8	2,18
	ΕΠ 3 ^η	0.25	0.8	0,2
	ΕΠ 4 ^η	0.26	0.8	0,2
	ΕΠ 5 ^η	0.26	0.8	2,1
	ΕΠ 6 ^η	0.26	0.8	2,4
	ΕΠ 7 ^η	0.25	0.8	3,1

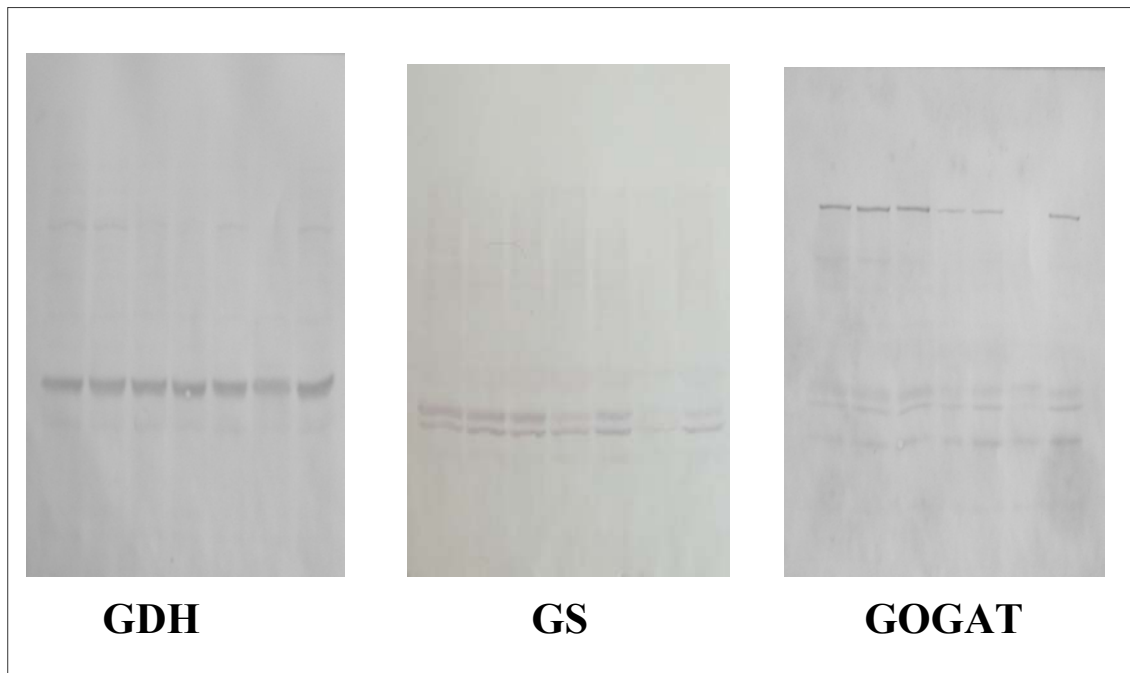
Από τα αποτελέσματα τα οποία βλέπουμε στον Πίνακα 7 παρατηρούμε ότι ο ιστός με την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες (mg πρωτεΐνης/g φυτικού ιστού) είναι ο Μάρτυρας.

Όσον αφορά την ενεργότητα, ο Μάρτυρας είχε την μεγαλύτερη ενεργότητα ενώ οι ιστοί της Επέμβασης 3 και 4 είχαν την μικρότερη . Στην συνέχεια ίση ποσότητα πρωτεϊνών από κάθε φυτικό ιστό μετουσιώθηκε και ηλεκτοφορήθηκε με SDS-PAGE, με σκοπό την ανάλυση των εκχυλισμάτων στις επιμέρους πρωτεϊνικές ζώνες. Το πρωτεϊνικό πρότυπο κάθε ιστού που προέκυψε μετά τη χρώση του πηκτώματος με Coomassie brilliant blue R-250 φαίνεται στην Εικόνα 8.



ΕΙΚΟΝΑ 9. Πρωτεϊνικά Πρότυπα υπέργειου μέρους φυτού αγγουριάς, που προέκυψαν μετά την ανάλυση με SDS-PAGE και την Χρώση Ολικών Πρωτεϊνών

Με σκοπό τη μελέτη των υπομονάδων των τριών ενζύμων (GDH, GS, GOGAT), τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των διαφορετικών επεμβάσεων από τα φυτά χρυσάνθεμου αναλύθηκαν με SDS-PAGE, υποβλήθηκαν σε Western blot και στη συνέχεια τα τρία ένζυμα ανιχνεύθηκαν ανοσολογικά. Η ανοσοανίχνευση των ενζύμων έγινε με τη βοήθεια αντισωμάτων κουνελιού που αναγνωρίζουν τα αντίστοιχα ένζυμα του αμπελιού. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην Εικόνα 10.



ΕΙΚΟΝΑ 10. Πρωτεϊνικές ζώνες της GDH, της GS και της GOGAT από το Υπέργειο Μέρος του φυτού αγγουριάς, που προέκυψαν μετά από ανάλυση SDS-PAGE, μεταφορά με Western blot και ανίχνευση με τα κατάλληλα αντισώματα

2.4 Επίδραση των επεξεργασμένων υγρών αποβλήτων στην ανάπτυξη και στα βιοχημικά χαρακτηριστικά του φυτού Τομάτας

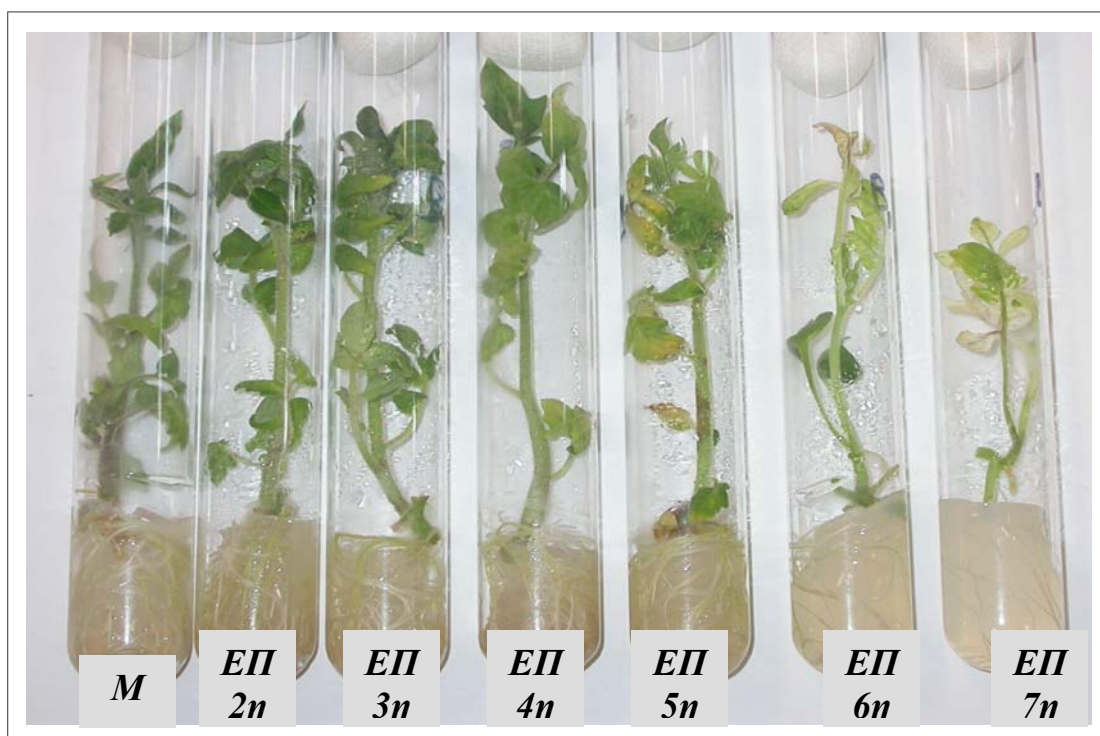
Στο πείραμα αυτό σπόροι τομάτας εμφυτεύτηκαν σε 7 διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα που περιείχαν επεξεργασμένα υγρά απόβλητα και παρακολούθηθηκε η ανάπτυξη τους. Στο τέλος του πειράματος συλλέχθηκαν δείγματα από το υπέργειο μέρος των φυτών και τις ρίζες και χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη της επίδρασης των αποβλήτων στην ποσότητα πρωτεϊνών και στα ένζυμα GDH, GS και GOGAT.

2.4.1 Επίδραση των υγρών αποβλήτων σε μακροσκοπικά χαρακτηριστικά των φυτών τομάτας

Σε όλες τις περιπτώσεις η ανάπτυξη των φυτών ήταν φυσιολογική χωρίς να παρατηρηθούν αξιοσημείωτες διαφορές μεταξύ των φυτών των

διαφορετικών επεμβάσεων, με εξαίρεση τα φυτά του μάρτυρα που για κάποιο πειραματικό λόγο παρουσίασαν μειωμένη ανάπτυξη. Όλα είχαν πλούσιο υπέργειο μέρος με καλά ανεπτυγμένο βλαστό και φύλλα πράσινου χρώματος χωρίς την εμφάνιση οποιουδήποτε συμπτώματος τοξικότητας, επίσης τα φυτά ανέπτυξαν κανονικό ριζικό σύστημα.

Στις εικόνες 11 και 12 παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά φυτά χρυσάνθεμου που αναπτύχθηκαν στα διαφορετικά υποστρώματα του πειράματος.



ΕΙΚΟΝΑ 11. Αντιπροσωπευτικά in vitro φυτά τομάτας που αναπτύχθηκαν υπό την επίδραση των υγρών αποβλήτων, μέσα σε σωλήνα. Ξεκινώντας αριστερά από τον μάρτυρα(MS), ακολουθεί η επέμβαση 2^η(MS+υγρά απόβλητα σε στάδιο πρωτοβάθμιας επεξεργασίας), ΕΠ 3^η (MS+υγρά απόβλητα σε στάδιο δευτεροβάθμιας επεξεργασίας), ΕΠ 4^η (MS+υγρά απόβλητα σε στάδιο δευτεροβάθμια επεξεργασία, φιλτραρισμένα), ΕΠ 5^η (MS+υγρά απόβλητα σε στάδιο χλωρίωσης), ΕΠ 6^η (1/2 MS+υγρά απόβλητα σε στάδιο δευτεροβάθμια επεξεργασία) και ΕΠ 7^η (1/4 MS+υγρά απόβλητα σε στάδιο δευτεροβάθμια επεξεργασία).

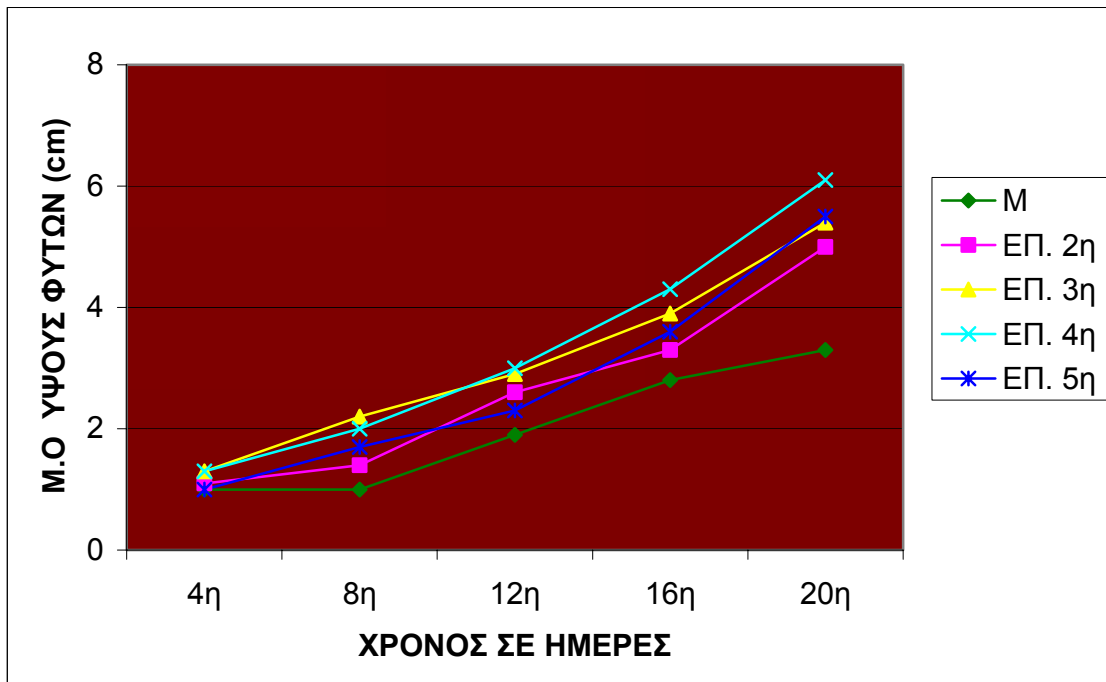


ΕΙΚΟΝΑ 12. Αντιπροσωπευτικά in vitro φυτά τομάτας που αναπτύχθηκαν υπό την επίδραση των υγρών αποβλήτων, εκτός σωλήνα. Ξεκινώντας αριστερά από τον μάρτυρα(MS), ακολουθεί η επέμβαση 2^η(MS+υγρά απόβλητα σε στάδιο πρωτοβάθμιας επεξεργασίας), ΕΠ 3^η (MS+υγρά απόβλητα σε στάδιο δευτεροβάθμιας επεξεργασίας), ΕΠ 4^η (MS+υγρά απόβλητα σε στάδιο δευτεροβάθμια επεξεργασία, φιλτραρισμένα), ΕΠ 5^η (MS+υγρά απόβλητα σε στάδιο χλωρίωσης), ΕΠ 6^η (1/2 MS+υγρά απόβλητα σε στάδιο δευτεροβάθμια επεξεργασία) και ΕΠ 7^η (1/4 MS+υγρά απόβλητα σε στάδιο δευτεροβάθμια επεξεργασία).

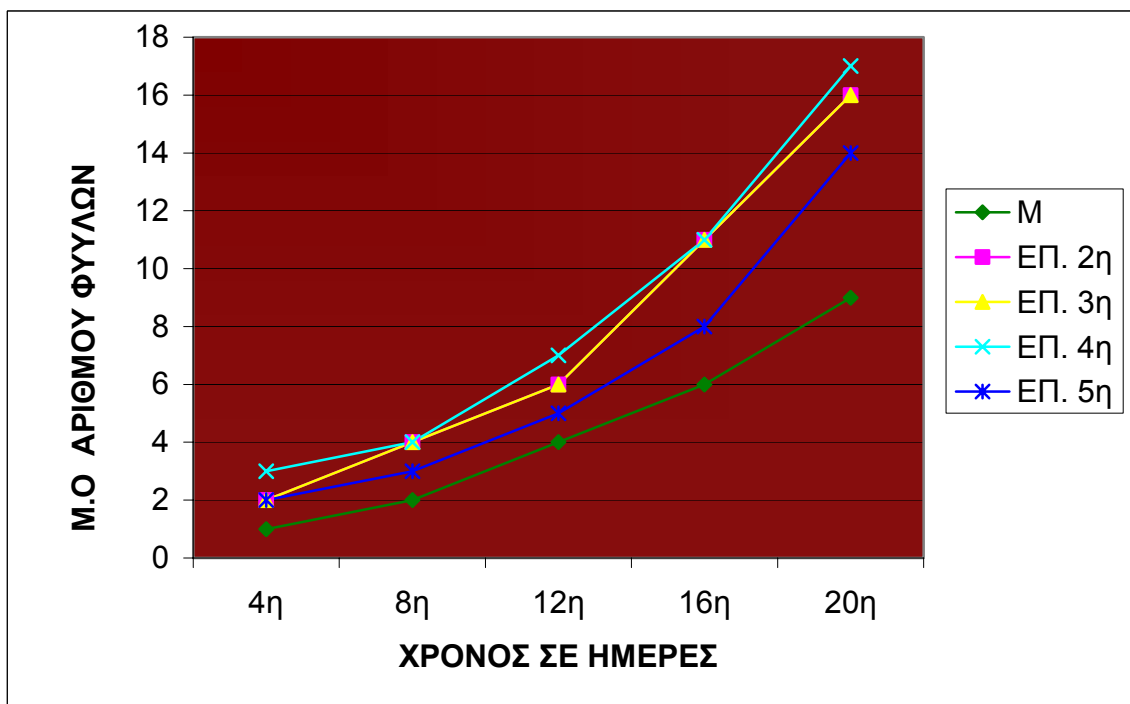
Στα φυτά τομάτας μετά από διάστημα 20 ήμερης ανάπτυξης τους στο θάλαμο με ελεγχόμενες συνθήκες ανάπτυξης, έγινε μέτρηση τόσο του ύψους όσο και του αριθμού των φύλλων τους για να μπορέσουμε να μελετήσουμε την επίδραση των υγρών αποβλήτων στην ανάπτυξη τους (Πίνακας 8). Αυτό το οποίο βλέπουμε από τον Πίνακα είναι ότι τα φυτά τα οποία έχουν την μεγαλύτερη ανάπτυξη σε ύψος είναι εκείνα τα οποία αναπτύσσονται σε υπόστρωμα στο οποίο τα λύματα βρίσκονται στο στάδιο της Δευτεροβάθμιας Επεξεργασίας, φιλτραρισμένα, ενώ εκείνα με την μικρότερη ανάπτυξη είναι τα φυτά τα οποία αναπτύσσονται σε υπόστρωμα με λύματα που βρίσκονται σε στάδιο Δευτεροβάθμιας Επεξεργασίας. Ομοίως και στα φύλλα, τα φυτά με το μεγαλύτερο αριθμό φύλλων είναι εκείνα τα οποία αναπτύσσονται με λύματα σε Δευτεροβάθμια Επεξεργασία, φιλτραρισμένα.

Πίνακας 8. Μέσος όρος μεταβολής ύψους και αριθμού φύλλων φυτών τομάτας ανεπτυγμένα σε θρεπτικό υπόστρωμα, με λύματα σε διαφορετικά στάδια επεξεργασίας. Τα φυτά αναπτύχθηκαν για 20 ημέρες.

ΤΟΜΑΤΑ		ΧΡΟΝΟΣ ΣΕ ΗΜΕΡΕΣ				
ΥΨΟΣ		4 ^η	8 ^η	12 ^η	16 ^η	20 ^η
ΕΠΕΜΒΑΣΕΙΣ	ΜΑΡΤΥΡΑΣ	1	1	1,9	2,8	3,3
	ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ 2 ^ο	1,1	1,4	2,6	3,3	5
	ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ 3 ^ο	1,3	2,2	2,9	3,9	5,4
	ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ 4 ^ο	1,3	2	3	4,3	6,1
	ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ 5 ^ο	1	1,7	2,3	3,6	5,5
ΦΥΛΛΑ						
ΕΠΕΜΒΑΣΕΙΣ	ΜΑΡΤΥΡΑΣ	1	2	4	6	9
	ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ 2 ^ο	2	4	6	11	16
	ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ 3 ^ο	2	4	6	11	16
	ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ 4 ^ο	3	4	7	11	17
	ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ 5 ^ο	2	3	5	8	14



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 5. Μέσος όρος ύψους φυτών τομάτας που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικά υποστρώματα, με λύματα από διαφορετικά στάδια επεξεργασίας. Τα φυτά αναπτύχθηκαν για 20 ημέρες.



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 6. Μέσος όρος αριθμού φύλλων φυτών τομάτας, που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικά υποστρώματα, με λύματα από διαφορετικά στάδια επεξεργασίας. Τα φυτά αναπτύχθηκαν για 20 ημέρες.

2.4.2 Επίδραση των υγρών αποβλήτων στα βιοχημικά χαρακτηριστικά των φυτών Χρυσάνθεμου

Φυτά τομάτας εκχειρίστηκαν με σκοπό την απομόνωση των πρωτεϊνών, ώστε να μπορέσουμε να μελετήσουμε την επίδραση των υγρών αποβλήτων στα βιοχημικά χαρακτηριστικά τους.

Στα εκχυλίσματα που προέκυψαν έγινε ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Lowry, με σκοπό την εκτίμηση της σχετικής περιεκτικότητας κάθε ενός από τους ιστούς σε πρωτεΐνες. Επίσης έγινε προσδιορισμός της ενεργότητας (GDH). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 9.

Πίνακας 9. Απορρόφηση, Ολικές πρωτεΐνες και ενζυμική ενεργότητα GDH σε ιστούς και ρίζα Τομάτας

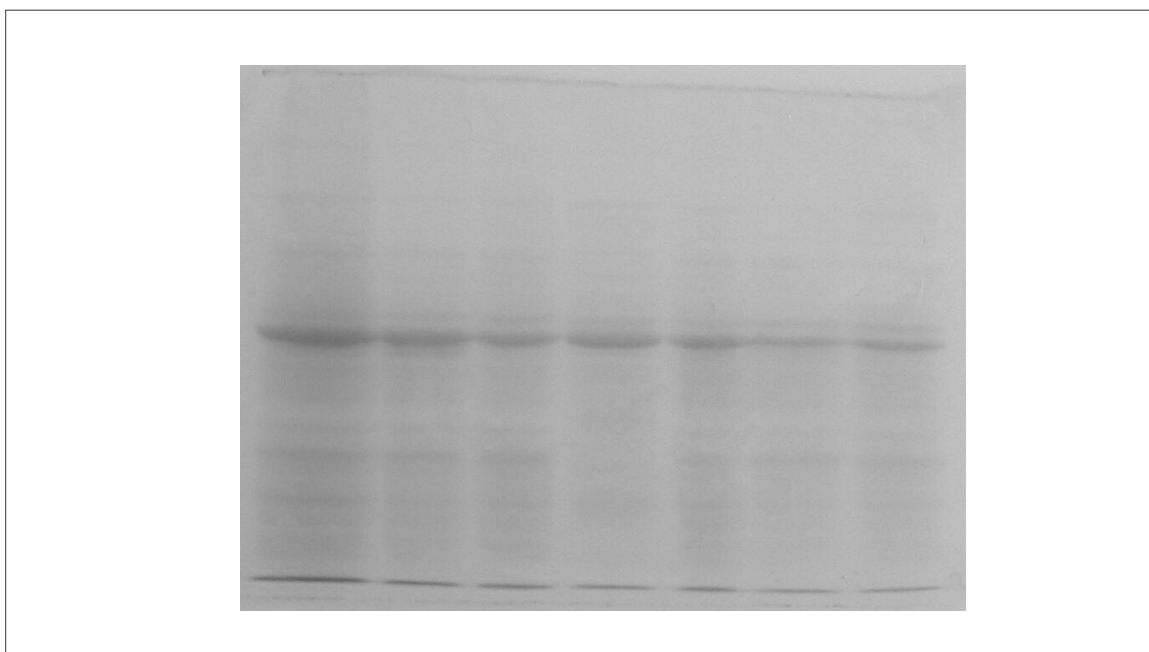
ΥΠΕΡΓΕΙΟ ΜΕΡΟΣ		ΜΕΘΟΔΟΣ LOWRY		ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ GDH
		ΑΠΟΡΡΟΦΗΣ Η OD/min*mL	ΟΛΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ mg / ml	ΕΙΔΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ OD/min* mg
ΤΟΜΑΤΑ	Μ	0,39	1,26	2,63
	ΕΠ 2 ^η	0,45	0,69	3,39
	ΕΠ 3 ^η	0,36	1,16	1,89
	ΕΠ 4 ^η	0,39	1,27	2,17
	ΕΠ 5 ^η	0,30	0,96	2,13
	ΕΠ 6 ^η	0,48	1,56	1,52
	ΕΠ 7 ^η	0,31	1,01	3

Από τα αποτελέσματα τα οποία βλέπουμε στον Πίνακα 9 παρατηρούμε ότι ο ιστός με την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες

(mg πρωτεΐνης/g φυτικού ιστού) είναι ο οποίος αναπτύσσεται σε υπόστρωμα μισής συγκέντρωσης (1/2 MS), ενώ εκείνος με τη μικρότερη ήταν ο ιστός της ρίζας .

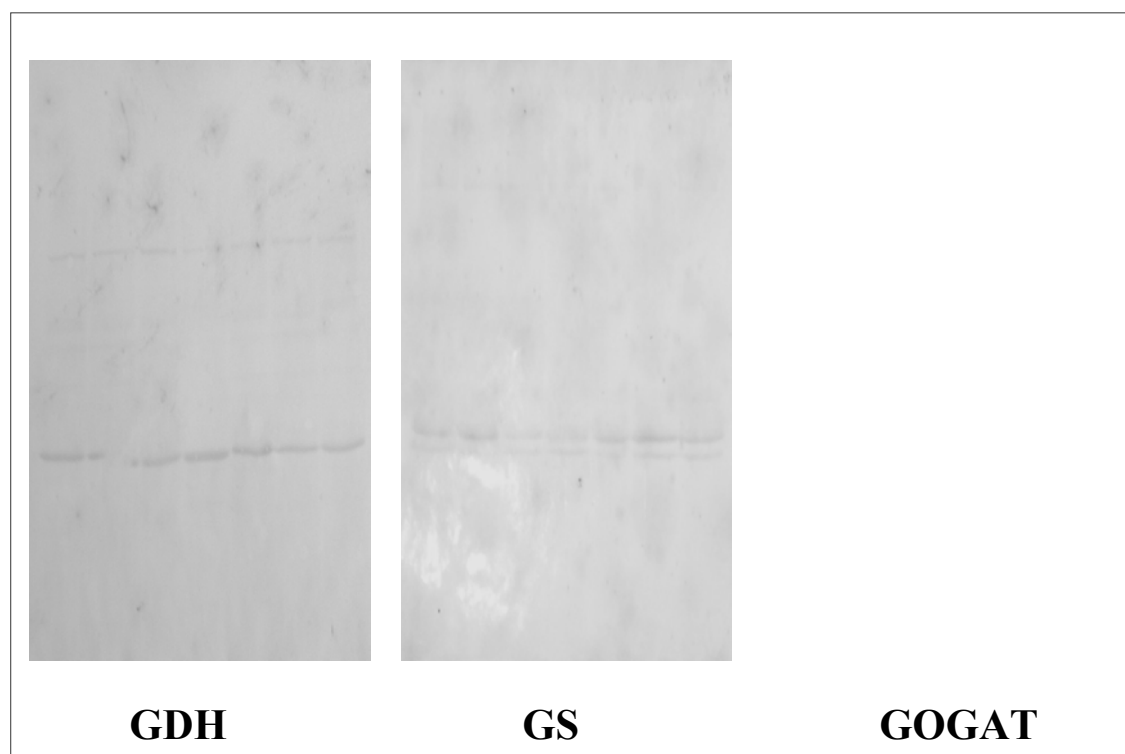
Όσον αφορά την ενεργότητα, ο ιστός της ρίζας είχε την μεγαλύτερη ενεργότητα ενώ οι ιστοί της Επέμβασης 6 είχε την μικρότερη .

Στην συνέχεια ίση ποσότητα πρωτεϊνών από κάθε φυτικό ιστό μετουσιώθηκε και ηλεκτοφορήθηκε με SDS-PAGE, με απώτερο σκοπό την ανάλυση των εκχυλισμάτων στις επιμέρους πρωτεϊνικές ζώνες. Το πρωτεϊνικό πρότυπο κάθε ιστού που προέκυψε μετά τη χρώση του πηκτώματος με Coomassie brilliant blue R-250 φαίνεται στην Εικόνα 9.



ΕΙΚΟΝΑ 13. Πρωτεϊνικά Πρότυπα Υπέργειου Μέρους φυτού Τομάτας, που προέκυψαν μετά την ανάλυση με SDS-PAGE και την Χρώση Ολικών Πρωτεϊνών

Με σκοπό τη μελέτη των υπομονάδων των τριών ενζύμων (GDH, GS, GOGAT), τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των διαφορετικών επεμβάσεων από τα φυτά χρυσάνθεμου αναλύθηκαν με SDS-PAGE, υποβλήθηκαν σε Western blot και στη συνέχεια τα τρία ένζυμα ανιχνεύτηκαν ανοσολογικά. Η ανοσοανίχνευση των ενζύμων έγινε με τη βοήθεια αντισωμάτων κουνελιού που αναγνωρίζουν τα αντίστοιχα ένζυμα του αμπελιού. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην Εικόνα 14.



ΕΙΚΟΝΑ 10. Πρωτεϊνικές Ζώνες της GDH, της GS και της GOGAT από το Υπέργειο Μέρος του φυτού Χρυσάνθεμου, που προέκυψαν μετά από ανάλυση SDS-PAGE, μεταφορά με Western blot και ανίχνευση με τα κατάλληλα αντισώματα

3 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η εργασία αυτή έγινε με σκοπό τη μελέτη της επίδρασης των επεξεργασμένων υγρών αποβλήτων στην ανάπτυξη και στα βιοχημικά χαρακτηριστικά των φυτικών ειδών Χρυσάνθεμο, Αγγούρι, Τομάτα. Στα αρχικά πειράματα μελετήθηκαν οι ιδιότητες των ενζύμων GDH, GS, GOGAT στα φυτά χρυσάνθεμο, αγγούρι και τομάτα. Για την ανίχνευση τους χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα από κουνέλι τα οποία αναγνώριζαν την GDH, την GS και την GOGAT του αμπελιού, αντίστοιχα. Το γεγονός ότι τα αντισώματα αυτά αναγνώρισαν και τα ένζυμα των τριών φυτικών ειδών υποδηλώνει την συγγένεια των ενζύμων των τεσσάρων φυτικών ειδών. Γενικά τα τρία αυτά ένζυμα παρουσιάζουν υψηλό βαθμό ομολογίας σε όλα τα ανώτερα φυτά που έχουν μελετηθεί.

Η GDH των διαφόρων φυτικών ειδών που έχουν μελετηθεί παρουσιάζει πρότυπο επτά ισοενζύμων και είναι εξαμερές ένζυμο αποτελούμενο από δύο είδη υπομονάδων. Αν και έγινε προσπάθεια διαχωρισμού των υπομονάδων της GDH, τα αποτελέσματα δεν ήταν ικανοποιητικά ώστε να υποστηρίξουμε την παρουσία δυο υπομονάδων στους ιστούς χρυσάνθεμου, αγγουριάς και τομάτας. Τα αποτελέσματα της μέτρησης της ενεργότητας της GDH και της ανάλυσης με Western blot έδειξαν την παρουσία του ενζύμου σε όλους τους εξεταζόμενους ιστούς.

Όσο αφορά την GS, ανιχνεύτηκαν δύο ισοένζυμα (GS1 και GS2) με μορφή δύο πρωτεϊνικών ζωνών διαφορετικού βάρους, που παρουσίασαν ποσοτική διακύμανση μεταξύ του υπέργειου μέρους και της ρίζας στα τρία φυτικά είδη. Η GS αναλύθηκε με ηλεκτροφόρηση σε δύο πρωτεϊνικές ζώνες. Η ζώνη με το μεγαλύτερο μοριακό βάρος αντιστοιχεί στο χλωροπλαστικό ισοένζυμο ενώ η ζώνη μικρότερου μοριακού βάρους αντιστοιχεί στην κυτταροπλαστική GS.

Τέλος η GOGAT, που όπως είναι γνωστό εντοπίζεται στους χλωροπλάστες και αποτελεί την κύρια ενζυμική μορφή στους πράσινους ιστούς, αναλύθηκε ως μια πρωτεϊνική ζώνη στο υπέργειο μέρος των τριών φυτικών ειδών.

Το φυτικό υλικό εμφυτεύτηκε σε 7 διαφορετικά υποστρώματα, με την μέθοδο της Ιστοκαλλιέργειας. Κάθε υπόστρωμα περιείχε λύματα σε διαφορετικό στάδιο επεξεργασίας, ώστε να δούμε την επίδραση τους ξεχωριστά σε κάθε φυτικό είδος. Για να παρατηρήσουμε την επίδραση των επεξεργασμένων υγρών αποβλήτων μακροσκοπικά και στα τρία φυτικά είδη, έγινε μέτρηση τόσο του ύψους όσο και του αριθμού φύλλων τους και αυτό το οποίο είδαμε είναι ότι σε όλες τις περιπτώσεις η

ανάπτυξη των φυτών ήταν φυσιολογική χωρίς να παρατηρηθούν αξιοσημείωτες διαφορές μεταξύ των φυτών των διαφορετικών επεμβάσεων, με εξαίρεση τα φυτά του μάρτυρα που για κάποιο πειραματικό λόγο παρουσίασαν μειωμένη ανάπτυξη. Όλα είχαν πλούσιο υπέργειο μέρος με καλά ανεπτυγμένο βλαστό και φύλλα πράσινου χρώματος χωρίς την εμφάνιση οποιουδήποτε συμπτώματος τοξικότητας, επίσης τα φυτά ανέπτυξαν κανονικό ριζικό σύστημα.

Στην συνέχεια για να δούμε την επίδραση των λυμάτων στα βιοχημικά χαρακτηριστικά των φυτικών ειδών έγινε εκχύλιση των πρωτεϊνών από το υπέργειο και το υπόγειο μέρος των φυτών χρυσάνθεμο, αγγουριάς και τομάτα. Στα εκχυλίσματα που προέκυψαν έγινε ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με την μέθοδο Lowry και μέτρηση της ενεργότητας. Μετά ακολούθησε η ανάλυση των εκχυλισμάτων στις επιμέρους πρωτεϊνικές ζώνες όπου ίση ποσότητα πρωτεϊνών από κάθε φυτικό ιστό μετουσιώθηκε και ηλεκτοφορήθηκε με SDS-PAGE.

Με σκοπό τη μελέτη των υπομονάδων των τριών ενζύμων (GDH, GS, GOGAT), τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των διαφορετικών επεμβάσεων από τα φυτά χρυσάνθεμου, αγγουριάς και τομάτας αναλύθηκαν με SDS-PAGE, υποβλήθηκαν σε Western blot και στη συνέχεια τα τρία ένζυμα ανιχνεύτηκαν ανοσολογικά. Η ανοσοανίχνευση των ενζύμων έγινε με τη βοήθεια αντισωμάτων κουνελιού που αναγνωρίζουν τα αντίστοιχα ένζυμα του αμπελιού. Αυτό το οποίο παρατηρήσαμε είναι ότι και τα τρία ένζυμα GDH, GS και GOGAT ανιχνεύτηκαν σε όλους τους ιστούς και των τριών φυτικών ειδών χωρίς να εμφανιστούν σημαντικές διαφορές.

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα της εργασίας αποδεικνύουν ότι τα υγρά απόβλητα δεν είχαν αρνητικές επιπτώσεις στην ανάπτυξη αλλά και στα βιοχημικά χαρακτηριστικά των φυτών χρυσάνθεμο, αγγούρι, τομάτα.

4 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Cren, M., and B. Hirel, 1999. Glutamine synthetase in higher plants: Regulation of Gene and Protein Expression from Organ to the Cell. *Plant Cell Physiol.* 40(12): 1187-1193.
- Hopkins, W.G., 1999. *Plant Physiology*, 2nd Edition. John Wiley & Sons, Inc. U.S.A.
- Καράταγλης, Σ.Σ., 1999. *Φυσιολογία Φυτών*, 3^η Έκδοση. Εκδόσεις Art of Text, Θεσσαλονίκη.
- Lea, J.P., and R.C. Leegood, 1993. *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. John Wiley & Sons Ltd. England.
- Loulakakis, K.A., and K.A. Roubelakis-Angelakis, 1991. Plant NAD(H)-glutamate dehydrogenase consists of two subunit polypeptides and their participation in the seven isoenzymes occurs in an ordered ratio. *Plant Physiol.* 97: 104-111.
- Loulakakis, K.A., and K.A. Roubelakis-Angelakis, 1992. Ammonium-induced increase in NAD(H)-glutamate dehydrogenase activity is caused by *de novo* synthesis of the α -subunit. *Planta* 187: 322-327.
- Loulakakis, K.A., and K.A. Roubelakis-Angelakis, 1996a. The seven NAD(H)-glutamate dehydrogenase isoenzymes exhibit similar anabolic and catabolic activities. *Plant Physiol.* 96: 29-35.
- Loulakakis, K.A., and K.A. Roubelakis-Angelakis, 1996b. Characterization of *Vitis vinifera* L. glutamine synthetase and molecular cloning of cDNAs for the cytosolic enzyme. *Plant Mol. Biol.* 31: 983-992.

- Loulakakis, K.A., and K.A. Roubelakis-Angelakis, 1997. Molecular cloning and characterization of cDNAs encoding for ferredoxin-dependent glutamate synthase from *Vitis vinifera*. *Plant Physiol.* 101: 220-228.
- Loulakakis, K.A., and K.A. Roubelakis-Angelakis, 2000. Enzymes of ammonia assimilation in *Vitis vinifera*. *Acta Hort.* 526: 209-223.
- Ruiz, J.M., and L. Romero, 1999. Cucumber yield and nitrogen metabolisms in response to nitrogen supply. *Scientia Horticulturae.* 82: 309-316.
- Sengar R.S., R.C. Pant, R.P. Singh, and H.S. Srivastava, 1995. Role and Regulation of Glutamine Synthetase and Glutamate Synthase in Higher Plants. *Plant Physiol. & Biochem.* 22(2): 89-100.
- Stryer L., 1997. Βιοχημεία, 3^η Έκδοση στα Ελληνικά. Τόμος I. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο.
- Stryer L., 1997. Βιοχημεία, 2^η Έκδοση στα Ελληνικά. Τόμος II. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο.
- Temple S.J., C.P. Vance., and J.S. Cantt, 1998. Glutamate synthase and nitrogen assimilation. *Trends in Plant Science Reviews.* 3(2): 51-56.
- Zeiger T., 1998. *Plant Physiology*, 2nd Edition. Sinauer Associates, Inc. U.S.A.
- Stamou, A.I.: Is international cost information applicable to typical sewage treatment plants in Greece?’, *International Symposium on Enviromental Management, Istanbul, Turkey, June 1987.*
- Stamou, A. I. : Hydraulic design of sewage treatment plants using Lotus 1-2-3, *Journal of Environmentl Technology*, Vol.14, pp.237-245, 1993.

- Λουλακάκης, Κ.Α., 2000. Σημειώσεις Βιοτεχνολογίας Φυτών. Σ.ΤΕ.Γ. Τ.Ε.Ι. Κρήτης, Ηράκλειο.
- Λουλακάκης, Κ.Α., 2000. Σημειώσεις Φυσιολογίας Φυτών. Σ.ΤΕ.Γ., Τ.Ε.Ι. Κρήτης, Ηράκλειο.
- Λουλακάκης, Κ.Α., 1999. Σημειώσεις Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών. Σ.ΤΕ.Γ. Τ.Ε.Ι. Κρήτης, Ηράκλειο.
- Στάμου, Α. Ι. και Βογιατζής, Ζ.: Βασικές αρχές και σχεδιασμός συστημάτων επεξεργασίας αποβλήτων, Β΄ έκδοση, ΤΕΕ, Αθήνα 1944. σ.371.
- Στάμου, Α. Ι: Μεθοδολογία σχεδιασμού εγκατάστασης επεξεργασίας αποβλήτων με τη βοήθεια πορωσπικού υπολογιστή, Πρακτικά Συνεδρίου Περιβαλλοντικής Επιστήμης και Τεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Αιγαίου, Μυτιλήνη, τ. Β, σ. 402-411, 1989.