

Τ.Ε.Ι. ΚΡΗΤΗΣ
Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας
Τμήμα Φυτικής Παραγωγής

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Επίδραση οργανικών υλικών στα ένζυμα
αφομοίωσης του αζώτου σε φυτά σπανακιού»**

Σπουδάστρια: Παναγιωτοπούλου Ανδριανή

Εισηγητής : Κωνσταντίνος Λουλακάκης

Ηράκλειο
Σεπτέμβριος 2004

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

2.1 Οργανική λίπανση

2.2 Οργανικά υλικά

2.3 Τι είναι η κομποστοποίηση

2.4 Οριακές τιμές βαρέων μετάλλων στην ιλύ.

2.5 Χημική σύσταση της ιλύος.

2.6 Βαρέα μέταλλα.

2.6.1 Πηγές βαρέων μετάλλων.

2.6.2 Όρια βαρέων μετάλλων.

2.6.3 Επιδράσεις των βαρέων μετάλλων στον άνθρωπο.

2.6.4 Βαρέα μέταλλα και ένζυμα αφομοίωσης του αζώτου

2.7 ΑΦΟΜΟΙΩΣΗ ΑΜΜΩΝΙΑΣ

2.7.1 Γλουταμινική συνθετάση

2.7.2 Γλουταμική συνθάση

2.7.3 Γλουταμική αφυδρογονάση

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Σχεδιασμός πειράματος

3.2 Εκχύλιση πρωτεϊνών από φυτικούς ιστούς

3.3 Ποσοτικός προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης (Modified Lowry)

3.4 Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών (Poly Acrylamide Gel Electrophoresis)

3.5 Χρωματισμός πρωτεϊνών με Coomassie Brilliant Blue R-250

3.6 Μεταφορά κατά Western Blot - Ανοσοανίχνευση

3.7 Μέτρηση Ενεργότητας του ενζύμου GDH

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. Γλουταμική Αφυδρογονάση (GDH).

4.2 Γλουταμική συνθάση (GOGAT)

4.3 Γλουταμινική συνθετάση (GS)

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία μελετήθηκε η επίδραση πέντε επιπέδων που πραγματοποιήθηκε στο Τ.Ε.Ι. Κρήτης. Το πείραμα έγινε σε φυτά σπανακιού, τα οποία καλλιεργήθηκαν σε διάφορα οργανικά υλικά, ώστε να διαπιστωθεί η επίδραση των οργανικών υλικών, στην παραγωγικότητα των φυτών και την απορρόφηση των βαρέων μετάλλων από τα διάφορα μέρη του φυτού.

Το πείραμα αποτελείται από οχτώ επεμβάσεις, και δυο επαναλήψεις. Από τις οχτώ επεμβάσεις, οι πέντε αποτελούνταν από λάσπη βιολογικού καθαρισμού σε πέντε διαφορετικές αναλογίες, μία αποτελούνταν από κόμποστ κουτσουλιάς ορνίθων και μία από ένα εμπορικό κόμποστ. Σαν μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε σκέτο χώμα.

Μετά την ανάπτυξη των φυτών έγινε εκχύλιση πρωτεϊνών από το έλασμα των φύλλων, ακολούθησε ηλεκτροφόριση τους και τελικά πραγματοποιήθηκε ανοσοανίχνευση των τριών ενζύμων αφομοίωσης του αζώτου (GDH, GS και GOGAT). Η μελέτη των ενζύμων αυτών πραγματοποιήθηκε για να εξετάσουμε την επίδραση των υποστρωμάτων στους φυσιολογικούς μηχανισμούς ανάπτυξης των φυτών. Η επιλογή των ενζύμων αυτών έγινε, διότι από μελέτες είναι αποδεδειγμένο πως σε καταστάσεις καταπόνησης αυτά επάγονται.

Από τα αποτελέσματα του πειραματος δεν προκύπτουν αξιόλογες μεταβολές στα επίπεδα των τριών ενζύμων και στις δυο επαναλήψεις. Τα στοιχεία αυτά υποδεικνύουν την καταλληλότητα της ιλύος βιολογικού και των υπολοίπων οργανικών υλικών ως εδαφοβελτιωτικά εδάφους στην ανάπτυξη των φυτών σπανακιού.

EFFECT OF APPLICATION OF ORGANIC MATERIALS IN THE FERMENTS OF ASSIMILATION OF NITROGEN IN PLANTS OF SPINACH

SUMMARY

In the present final work was studied the effect of five levels that was became in Technological Educational Institute of Crete. The experiment became in plants of spinach, which were cultivated in various organic materials, so that is realised the effect of organic materials, in the productivity of plants and the absorption of heavy metals from the various parts of plant.

The experiment is constituted by eight interventions, and two repetitions. By the eight interventions, the five they was constituted by mud of biological cleaning in five different proportions, one they was constituted from compost manure hens and one of one commercial compost. As witness was used only earth.

Afterwards the growth of plants became extraction of proteins from the lamina of leaves, followed their electrophoresi and finally was realised immunosorbent assay of three ferments of assimilation of nitrogen (GDH, GS and GOGAT). The study of this ferments was realised in order to we examine the effect of sublayers in the physiologic mechanisms of growth of plants. The choice of this ferments became, because from studies it is proved that in situations of stress these influenced.

From the results of experiment was realized that we didn't have appreciable changes in the levels of three ferments and in the two repetitions. This elements indicate the appropriateness of silt biological and rests organic material as improved soil in the growth of plants of spinach.

2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

2.1 Οργανική λίπανση

Οργανικό λίπασμα είναι κάθε φυσικό οργανικό υλικό όπου ένα μέρος των θρεπτικών στοιχείων βρίσκεται σε οργανικές ενώσεις, δεν περιέχει τοξικές ουσίες ούτε και παθογόνους οργανισμούς. Ο όρος οργανικά λιπάσματα αναφέρεται σε λιπάσματα μεγάλης σχετικά περιεκτικότητας σε ένα ή περισσότερα θρεπτικά, που περιέχουν μόνο μικρές ποσότητες οργανικής ουσίας στο έδαφος.

2.2 Οργανικά υλικά

Τα οργανικά υλικά χρησιμοποιούνται συνήθως σε δύο ξεχωριστούς τομείς της γεωργικής πρακτικής. Ο ένας είναι η βελτίωση των καλλιεργούμενων εδαφών ή και δασικών εκτάσεων και ο άλλος η παρασκευή υποστρωμάτων, συνήθως χωρίς χόμα για την ανάπτυξη κηπευτικών, ανθοκομικών και καλλωπιστικών φυτών.

Η προσθήκη των οργανικών υλικών στο έδαφος, οδηγεί στα θετικά αποτελέσματα που προκαλεί η αύξηση της οργανικής ουσίας του εδάφους, η οποία συμβάλει στην βελτίωση ορισμένων φυσικών και χημικών χαρακτηριστικών του, όπως το πορώδες, την υδατοχωρητικότητα, τη σχέση νερού-αέρα, την C.E.C., το pH, την διαθέσιμη ποσότητα θρεπτικών στοιχείων, κ.α.

Η εντατικοποίηση των καλλιεργειών, επέβαλε την αύξηση της προσθήκης χημικών λιπασμάτων, η οποία είχε ως αποτέλεσμα εκτός των άλλων και την μόλυνση του περιβάλλοντος. Δημιουργήθηκε λοιπόν η

πρόκληση για την γεωργία να παρέχει συστήματα και πρακτικές που να εξασφαλίζουν την αναγκαία παραγωγή φυτικών προϊόντων αλλά και την διατήρηση του περιβάλλοντος και των φυσικών πόρων.

Τα διάφορα οργανικά υπολείμματα δεν επανέρχονται σήμερα στο έδαφος από όπου παράχθηκαν, με αποτέλεσμα αφ' ενός μεν να δημιουργούνται περιβαλλοντικά προβλήματα στον τόπο απόρριψής τους και αφ' ετέρου να προκαλείται υποβάθμιση των γεωργικών εδαφών. Η άμεση όμως επαναφορά στο έδαφος των τεράστιων αυτών ποσοτήτων οργανικών υπολειμμάτων, προκαλεί προβλήματα ανισορροπίας σε αυτό, με εκδήλωση φυτοτοξικών και τροφοπενικών συμπτωμάτων στα φυτά.

Τα διάφορα οργανικά υπολείμματα που χρησιμοποιούνται για οργανική λίπανση είναι τα παρακάτω:

1. Κοπριές
2. Κόμποστ
3. Ζωικά υπολείμματα
4. Υγρά αστικά απόβλητα
5. Ιλύς βιολογικών καθαρισμών
6. Κόμποστ από σκουπίδια
7. Τύρφες και λιγνίτες
8. Ριζικά υπολείμματα

2.3 Τι είναι η κομποστοποίηση

Τα οργανικά υλικά προέρχονται από την αποδόμηση της οργανικής ύλης, που είναι και μία φυσική βιολογική διεργασία. Μπορεί όμως να γίνει υποβοήθηση της φύσης ώστε να έχουμε γρήγορη βιολογική αποδόμηση των

κάθε λογής οργανικών υπολειμμάτων και αποβλήτων και επιστροφή τους στους φυσικούς τους αποδέκτες και ιδιαίτερα στο έδαφος.

Η επεξεργασία αυτή των οργανικών υπολειμμάτων και αποβλήτων η οποία γίνεται εκτός εδάφους είναι γνωστή ως κομποστοποίηση ή με τον διεθνή όρο composting.

Με τον όρο κομποστοποίηση εννοούμε την διαδικασία της αερόβιας ή αναερόβιας αποδόμησης των οργανικών υπολειμμάτων που οδηγεί στην παραγωγή κόμποστ, δηλαδή ενός οργανικού εδαφοβελτιωτικού που μοιάζει με τον χούμο του εδάφους και προωθεί την ανάπτυξη των φυτών.

Μια πληθώρα οργανικών αποβλήτων μπορούν με την κατάλληλη επεξεργασία να μετατραπούν σε ένα πλούσιο φυτόχωμα, το κόμποστ, το οποίο μπορεί να βρει πολλές εφαρμογές στη γεωργία, στα πάρκα και στην ανάπλαση και αναδάσωση προβληματικών εκτάσεων, όπως εγκαταλελειμμένα λατομεία και πρανή δρόμων. Η κομποστοποίηση μιμείται και επιταχύνει τις διεργασίες αποδόμησης των οργανικών υλικών που συμβαίνουν έτσι κι αλλιώς στη φύση.

Οι μικροοργανισμοί που υπάρχουν φυσιολογικά στα οργανικά απόβλητα, χρησιμοποιούν τα οργανικά συστατικά των αποβλήτων ως τροφή για την ανάπτυξη τους. Η διαδικασία αυτή είναι αερόβια, δηλαδή είναι απαραίτητη η παρουσία οξυγόνου και εξώθερμη. Καθώς οι μικροοργανισμοί καταβολίζουν τα απόβλητα, αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται, το pH αλλάζει, η θερμοκρασία του σωρού των αποβλήτων αυξάνει και τα απόβλητα μετασχηματίζονται σε πιο πολύπλοκες σταθερές οργανικές ενώσεις, που μοιάζουν με τον φυσικό χούμο των εδαφών. Κατά την διαδικασία της κομποστοποίησης η θερμοκρασία, αν δεν ελεγχθεί, μπορεί να ξεπεράσει τους 70°C, να αδρανοποιήσει ή και να σκοτώσει τους μικροοργανισμούς και να γίνει απαγορευτική για την ομαλή και γρήγορη

ολοκλήρωση της διεργασίας. Η βέλτιστη θερμοκρασία κομποστοποίησης είναι γύρω στους 55°C.

Ο χρόνος, που απαιτείται για την περάτωση της κομποστοποίησης, ώστε να έχουμε τελικά ένα ώριμο κόμποστ, ποικίλει. Οι βιολογικές διαδικασίες δεν μπορούν να επιταχυνθούν πέρα από τα φυσιολογικά τους όρια, ενώ αντίθετα μια σειρά κακών χειρισμών μπορεί να τις επιβραδύνει πολύ. Ο ελάχιστος απαιτούμενος χρόνος κυμαίνεται γύρω στις 3-6 εβδομάδες, ανάλογα με το είδος των οργανικών υλικών. Συχνά τα κόμποστ που περατώνονται σε σύντομο χρονικό διάστημα χρειάζονται μια μακριά περίοδο ωρίμανσης σε ανοιχτό χώρο.

Για την κομποστοποίηση υπάρχουν τροφικές και περιβαλλοντικές παράμετροι, με ανώτατα και κατώτερα όρια, οι οποίες την επηρεάζουν. Έξω από αυτά τα όρια η διεργασία επιβραδύνεται σημαντικά ή και σταματά εντελώς. Ο περιοριστικός παράγοντας είναι εκείνος που βρίσκεται σε μικρή διαθέσιμη ποσότητα, εξαντλείται πρώτος ή παίρνει μη ευνοϊκές τιμές.

Για να μην υπάρξουν προβλήματα κατά την διάρκεια της κομποστοποίησης και να προχωρήσει με τον καλύτερο τρόπο πρέπει να εξετάζονται οι τροφικές και περιβαλλοντικές παράμετροι του συστήματος και να λαμβάνονται μέτρα ώστε να παραμένουν μέσα σε όρια κατάλληλα για την κομποστοποίηση. Αυτή η βασική αρχή ισχύει για όλα τα υλικά και συστήματα κομποστοποίησης.

2.4 Οριακές τιμές βαρέων μετάλλων στην ιλύ.

Στις χώρες που επιτρέπεται η χρήση της ιλύος στην γεωργία, επιβάλλεται η ανάλυση της κάθε εξάμηνο για να διαπιστωθεί το επίπεδο της σε βαρέα μέταλλα όπως: μόλυβδος (Pb), κάδμιο (Cd), χρώμιο (Cr), χαλκό

(Cu), νικέλιο (Ni), υδράργυρο (Hg) και ψευδάργυρο (Zn), καθώς επίσης και όσον αφορά τα μακροστοιχεία : άζωτο (N), φώσφορο (P), κάλιο (K), μαγνήσιο (Mg) και ασβέστιο (Ca). Στον πίνακα 1 φαίνονται οι οριακές τιμές των βαρέων μετάλλων στην ιλύ.

ΒΑΡΕΑ ΜΕΤΑΛΛΑ	mg/kg
Μόλυβδος (Pb)	1200
Κάδμιο (Cd)	20
Χρώμιο (Cr)	1200
Χαλκός (Cu)	1200
Νικέλιο (Ni)	200
Υδράργυρος (Hg)	25
Ψευδάργυρος (Zn)	3000

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Οριακές τιμές των βαρέων μετάλλων στην ιλύ (mg/kg ξηράς ουσίας).

2.5 Χημική σύσταση της ιλύος.

Στην ιλύ υπάρχουν σχετικά μεγάλες ποσότητες αφομοιώσιμων θρεπτικών στοιχείων, καθώς επίσης και οργανικές ουσίες που έχουν αποδομηθεί σε μικρό βαθμό. Η ιλύς είναι πολύ φτωχή σε κάλιο ενώ οι ποσότητες ασβεστίου βρίσκονται σε τέτοια επίπεδα ώστε με αυτές να επιτυγχάνεται ακόμη και διόρθωση της οξύτητας των υποβαθμισμένων

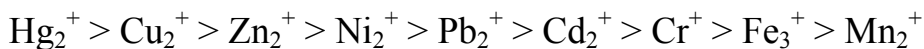
εδαφών. Ανάλογα με τον βαθμό αποστράγγισης όλα τα στοιχεία αυξάνονται σημαντικά. Τα θρεπτικά στοιχεία στην ιλύ και ειδικότερα το άζωτο είναι εξίσου αποτελεσματικά στην θρέψη των φυτών, όπως αυτά της ουρίας. Πάντως η σημασία της ιλύος ως λίπασμα οφείλεται στο φώσφορο και στο άζωτο. Στον Πίνακα 2 παρατίθενται η μέση οργανική και ανόργανη σύσταση της ιλύος, η οποία είναι κατάλληλη για γεωργική αξιοποίηση.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2: Μέση οργανική και ανόργανη σύσταση της ιλύος (από Σιδηράς Ν 1997).

	Υγρές λάσπες 12% ξηρά ουσία	Εν μέρει αποστραγγιζόμενη ξηρά ουσία 13-30%,	Αποστραγγιζόμενες λάσπες 30% ξηρά ουσία
Ξηρή ουσία %	5,6	20,3	45
Βάρος όγκου (t/m ³)	1	0,92	1,18
Μακροστοιχεία (ποσοστά στη φρέσκια ουσία)			
Άζωτο N (kg/ m ³)	2,2	5	8,5
Φώσφορος P ₂ O ₅ (kg/ m ³)	2	5,6	11,4
Κάλιο K ₂ O (kg/ m ³)	0,3	0,7	1,2
Ασβέστιο CaO (kg/ m ³)	4,2	17,6	71
Μαγνήσιο MgO (kg/ m ³)	0,6	1,9	4,2
Βαρέα μέταλλα (ποσοστά σε ξηρή ουσία)			
Μόλυβδος Pb (mg/kg)	176	188	198
Κάδμιο Cd (mg/kg)	4,1	4,2	4
Χρώμιο Cr (mg/kg)	73,8	89,2	103,8
Χαλκός Cu (mg/kg)	343	330	353
Νικέλιο Ni (mg/kg)	33,6	35,7	36,4
Υδράργυρος Hg (mg/kg)	2,7	2,8	2,8
Ψευδάργυρος Zn (mg/kg)	1448	1419	1249

2.6 Βαρέα μέταλλα.

Ως βαρέα μέταλλα χαρακτηρίζονται εκείνα τα στοιχεία που έχουν ειδικό βάρος μεγαλύτερο από $4,5 \text{ g/cm}^3$. Τα βαρέα μέταλλα είναι απαραίτητα σε μικρές ποσότητες για την ανάπτυξη της πλειονότητας των οργανισμών, αφού πολλά από αυτά είναι απαραίτητα για την δράση των ένζυμων και ζωτικών λειτουργιών. Σε μεγαλύτερες όμως συγκεντρώσεις γίνονται τοξικά προκαλώντας διάφορες βλάβες και δυσμενείς επιδράσεις. Τα κυριότερα βαρέα μέταλλα είναι το κάδμιο (Cd), Το νικέλιο (Ni), ο μόλυβδος (Pb), ο χαλκός (Cu), το χρώμιο (Cr) , ο ψευδάργυρος (Zn), το μαγγάνιο (Mn), ο σίδηρος (Fe) και ο υδράργυρος (Hg). Η σειρά τοξικότητας για τα διάφορα βαρέα μέταλλα είναι ως εξής:



Η τοξικότητα των βαρέων μετάλλων εξαρτάται από την συγκέντρωσή τους, το είδος του μετάλλου, την ύπαρξη και συνεργιστική δράση με άλλα μέταλλα και το είδος του οργανισμού.

2.6.1 Πηγές βαρέων μετάλλων.

Η αλματώδης εξέλιξη της τεχνολογίας και η ανάπτυξη της βιομηχανίας οδήγησαν στην ρύπανση του περιβάλλοντος (έδαφος, ατμόσφαιρα, νερό). Ένας βασικός παράγοντας της ρύπανσης είναι τα βαρέα μέταλλα.

Τα βαρέα μέταλλα προέρχονται κυρίως από βιομηχανικά απόβλητα, είτε αυτά είναι αέρια, υγρά ή στερεά. Η βιομηχανία παράγει μεγάλες ποσότητες χημικών υποπροϊόντων, τα οποία αποβάλλονται με διάφορους τρόπους. Ένα μέρος αποβάλλεται σε χερσαίες περιοχές, κρατήρες, παλιά

ορυχεία, ενώ ένα άλλο μέρος αποβάλλεται κατευθείαν στο υδάτινο περιβάλλον ή διοχετεύεται μέσω των αποχετεύσεων στους βιολογικούς καθαρισμούς κάθε περιοχής. Ένα μεγάλο μέρος των χημικών αποβλήτων περιέχει βαρέα μέταλλα. (Hg, Cd, Pb, Zn, Cu) ή ιχνοστοιχεία σε διάφορες ποσότητες. Τα ιχνοστοιχεία αυτά τα οποία απορροφούνται από τους οργανισμούς, συσσωρεύονται σε τροφικά πλέγματα σε ποσότητες οι οποίες είναι επικίνδυνες για τους οργανισμούς και για τον άνθρωπο.

Μία άλλη σημαντική πηγή βαρέων μετάλλων είναι τα αστικά απόβλητα είτε αυτά είναι στερεά είτε υγρά. Τα βαρέα μέταλλα στα αστικά απορρίμματα συσσωρεύονται κυρίως από μπαταρίες και ηλεκτρονικές συσκευές, ενώ στα υγρά αστικά απόβλητα από την εκτεταμένη χρήση των απορρυπαντικών.

Γνωρίζοντας ότι τα βαρέα μέταλλα δεν αποικοδομούνται από τους μικροοργανισμούς, μεταφέρονται στους βιολογικούς καθαρισμούς, όπου συσσωρεύονται και καθιζάνουν στην ιλύ. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα η ιλύ να περιέχει μεγάλες συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων και για το λόγο αυτό να θεωρείται αμφισβητήσιμη η χρήση της ως κόμποστ για καλλιέργειες εδώδιμων φυτών. Οι συγκεντρώσεις όμως των βαρέων μετάλλων στις ιλύες ποικίλουν από πόλη σε πόλη και ο βαθμός συγκέντρωσης εξαρτάται από τον τρόπο ζωής των κατοίκων της περιοχής, καθώς και από το αν καταλήγουν ή όχι βιομηχανικά απόβλητα στον βιολογικό καθαρισμό της περιοχής.

2.6.2 Όρια βαρέων μετάλλων.

Η απορρόφηση των βαρέων μετάλλων από το φυτό, διευκολύνεται κάτω από ορισμένες προϋποθέσεις στο έδαφος, με αποτέλεσμα να αυξάνεται

η συγκέντρωση τους στους φυτικούς ιστούς, καμία φορά, σε επίπεδα πάνω από τα επιτρεπτά όρια για τον καταναλωτή.

Είναι γνωστό ότι οι συνθήκες εδάφους που περιορίζουν την απορρόφηση των περισσότερων βαρέων μετάλλων από το φυτό, είναι το αλκαλικό pH και η αύξηση της οργανικής ουσίας του εδάφους, που συμβάλει στην αύξηση της ανταλαξιμότητας (C.E.C.).

Στον Πίνακα 3 παρουσιάζονται οι οριακές τιμές των βαρέων μετάλλων σε εδάδιμα φυτικά είδη.

ΒΑΡΕΑ ΜΕΤΑΛΛΑ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ppm
Μόλυβδος (Pb)	30-300
Κάδμιο (Cd)	5-30
Χρώμιο (Cr)	5-30
Χαλκός (Cu)	20-100
Νικέλιο (Ni)	10-100
Υδράργυρος (Hg)	1-3
Ψευδάργυρος (Zn)	100-400

ΠΙΝΑΚΑΣ 3

Οριακές τιμές βαρέων μετάλλων σε εδάδιμα φυτικά είδη (ppm)

2.6.3 Επιδράσεις των βαρέων μετάλλων στον άνθρωπο.

Η συσσώρευση των βαρέων μετάλλων στον άνθρωπο προκαλείται είτε άμεσα από την μόλυνση του υπόγειου υδροφόρου ορίζοντα και γενικά των πηγών πόσιμου νερού, είτε έμμεσα μέσω της θρεπτικής αλυσίδας. Τα βαρέα μέταλλα προκαλούν καρκίνο και τερατογενέσεις όπως αναφέρουν οι ειδικοί.

Το επίπεδο τοξικότητας μίας ουσίας σχετίζεται με την ποσότητα της και το είδος της επίδρασής της. Πολλά χημικά στοιχεία είναι απαραίτητα ή τουλάχιστον ωφέλιμα για τον άνθρωπο, αλλά μπορεί να γίνουν τοξικά όταν λαμβάνονται σε υπερβολικές ποσότητες. Η δράση ενός τέτοιου στοιχείου μπορεί να είναι είτε άμεση είτε χρόνια. Μία άμεση επίδραση προκαλείται από υψηλή πρόσληψη των τοξικών ουσιών, οι οποίες μπορεί να προκαλέσουν έως και τον θάνατο. Μία χρόνια επίδραση προέρχεται φυσικά από μικρότερη ποσότητα, αλλά συνεχή για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα. Η τοξική ουσία έχει την δυνατότητα να δομηθεί στο σώμα και να εμφανίζεται η τοξικότητα της σαν σύμπτωμα.

Οι μακροχρόνιες επιδράσεις στον άνθρωπο από τα βαρέα μέταλλα είναι κυρίως μεταλλάξεις στο DNA. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία όγκων αλλά και τερατογενέσεων. Οι συγκεντρώσεις των βαρέων μετάλλων στον οργανισμό μπορούν να επιδράσουν σε διάφορα όργανα καθώς και σε συστήματα του οργανισμού. Για παράδειγμα ο υδράργυρος και το κάδμιο μπορεί να προκαλέσουν πρόβλημα στα νεφρά, στα οστά και στο νευρικό σύστημα.

2.6.4 Βαρέα μέταλλα και ένζυμα αφομοίωσης του αζώτου

Η επίδραση των βαρέων μετάλλων στα ένζυμα αφομοίωσης του αζώτου (GDH, GS και GOGAT) δεν έχει διευκρινιστεί ως σήμερα, αφού μόνο πρόσφατα το συγκεκριμένο θέμα έχει αποτελέσει αντικείμενο έρευνας. Παρόλο που έχει αποδειχθεί ότι τα βαρέα μέταλλα μπορούν να παρεμποδίσουν την δράση διάφορων ενζύμων, αδιευκρίνιστη παραμένει η επίδραση που μπορούν να έχουν στα ένζυμα σύνθεσης της γλουταμίνης.

Σε ορισμένα πειράματα που έγιναν για αυτό το σκοπό, διάφορες συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων προστέθηκαν στο μέσο ανάπτυξης των φυτών και ακολούθως έγινε προσπάθεια να προσδιοριστούν οι αλλαγές που επήλθαν στα συγκεκριμένα ένζυμα. Παρακάτω παρουσιάζονται συνοπτικά τα μέταλλα και τα φυτικά είδη που χρησιμοποιήθηκαν σε κάποιες από αυτές τις έρευνες, καθώς και τα αποτελέσματα στα οποία αυτές κατέληξαν.

Σπορόφυτα σιταριού (*Triticum aestivum*) και κριθαριού (*Hordeum vulgare*), αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο που περιείχε Βόριο (B) σε συγκέντρωση 10 mM, για 5 ημέρες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι τοξικότητα του B αύξησε την ενεργότητα της GDH κατά 81 % στις ρίζες και κατά 30% στα φύλλα (Mahboobi et al., 2002).

Σπορόφυτα μπιζελιού (*Pisum sativum*) αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα συγκέντρωσης 10 mM σε Κάδμιο (Cd). Τα επίπεδα ενεργότητας της GDH πενταπλασιάστηκαν στις ρίζες και τριπλασιάστηκαν στους βλαστούς (Chugh et al., 1992).

Σπορόφυτα καλαμποκιού (*Zea mays*) αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα που περιείχε CdSO₄, έτσι ώστε η συγκέντρωσή του σε Κάδμιο (Cd) να κυμαίνεται στα 20 μM. Δεν παρατηρήθηκε καμία αξιοσημείωτη

μεταβολή όσον αφορά στα επίπεδα της GDH και της GOGAT ενώ παρατηρήθηκε σαφής αύξηση του επιπέδου της GS (Ju G. C. et al., 1997).

Σπορόφυτα καλαμποκιού (*Zea mays*) αναπτύχθηκαν σε θρεπτικά υποστρώματα με αυξανόμενες συγκεντρώσεις σε Κάδμιο (Cd), για 12 ημέρες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι παρεμποδίστηκε σημαντικά η δράση των ενζύμων GS και GOGAT , ενώ αντίθετα η δράση της GDH αυξήθηκε (Boussama et al., 1999).

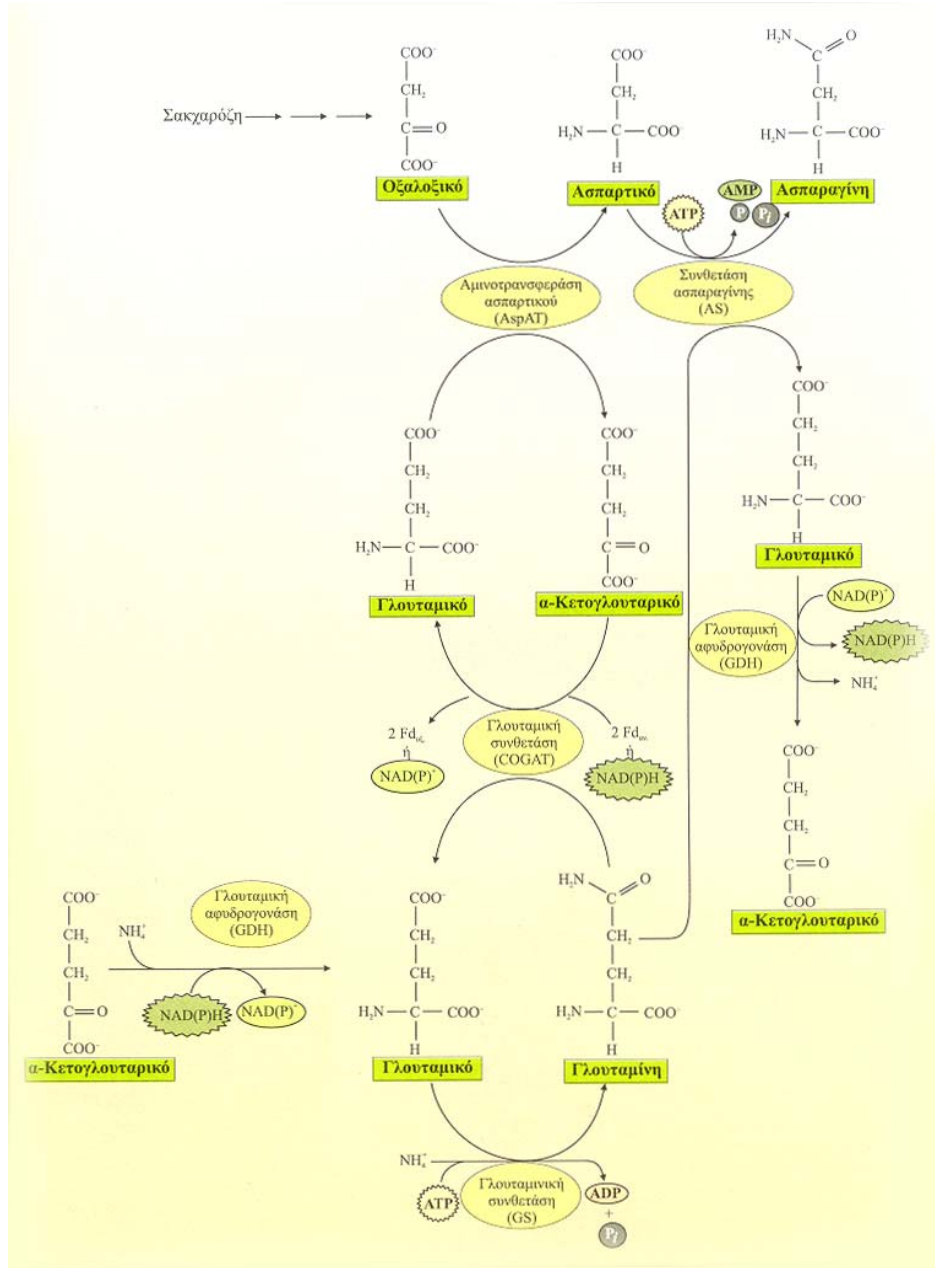
2.7 ΑΦΟΜΟΙΩΣΗ ΑΜΜΩΝΙΑΣ

Η αμμωνία είναι η μορφή του αζώτου που ενσωματώνεται στα αμινοξέα, στις πρωτεΐνες και στα άλλα αζωτούχα βιομόρια, στα κύτταρα. Αφομοίωση της αμμωνίας είναι η ενσωμάτωση της αμμωνίας σε αζωτούχα βιομόρια, κυρίως αμινοξέα, με ενζυμική κατάλυση.

Η αμμωνία, εκτός από την αναγωγή των νιτρικών, παράγεται κατά τη φωτοαναπνοή στα μιτοχόνδρια, από απαμινώσεις αμινοξέων και από άλλες καταλυτικές αντιδράσεις. Υψηλές ενδογενείς συγκεντρώσεις αμμωνίας είναι τοξικές για τα κύτταρα. Έτσι, υπάρχουν πολλές βιοχημικές οδοί για την αφομοίωσή της σε αζωτούχα βιομόρια. Όλες αυτές οι οδοί είναι στην ουσία η ενσωμάτωση του αμμωνιακού ιόντος σε ενώσεις με διαφορετικό αριθμό ατόμων σκελετικού άνθρακα.

Η συνηθέστερη οδός αφομοίωσης της αμμωνίας γίνεται με την συντονισμένη δράση των ενζύμων της γλουταμινικής συνθετάσης (glutamine synthetase, GS) και της Fd- ή NADH-γλουταμικής συνθάσης (glutamate synthase, GOGAT). Στην οδό αυτή, της GS/GOGAT, δέκτης της αμμωνίας είναι το γλουταμικό και το α-κετογλουταρικό, αντίστοιχα. Στους μικροοργανισμούς, γλουταμικό παράγεται επίσης με τη δράση της

γλουταμικής αφυδρογονάσης (glutamate dehydrogenase, GDH), αλλά δεν έχει ακόμη διευκρινισθεί ο βιοσυνθετικός της ρόλος στα φυτά (Εικόνα. 1).



Εικόνα 1: Κυριότερες αντιδράσεις αφομοίωσης των αμμωνιακών ιόντων (από. Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, 2003).

Η γλουταμίνη και το γλουταμικό, τα προϊόντα των κύριων αντιδράσεων αφομοίωσης της αμμωνίας, είναι οι κατ' εξοχήν αζωτούχες ενώσεις που μεταφέρονται και χρησιμεύουν ως δότες αμινομάδας για τη σύνθεση μεγάλου αριθμού ενώσεων, όπως άλλων αμινοξέων, νουκλεϊκών οξέων, χλωροφύλλης κ.ά. Επίσης, από τα αμινοξέα αυτά συντίθεται το ασπαρτικό οξύ, με τη δράση της ασπαρτικής αμινοτρανσφεράσης (aspartate aminotransferase, AT), και η ασπαραγίνη, με τη δράση της συνθετάσης της ασπαραγίνης (asparagine synthetase, AS). Τα 4 παραπάνω αμινοξέα αποτελούν το 64% του αμινοξικού κλάσματος στα φύλλα της *Arabidopsis*. Η γλουταμίνη είναι το κύριο αμινοξύ που μεταφέρεται από τις ρίζες στα φύλλα, όπως φαίνεται από την υψηλή του συγκέντρωση στα αγγεία του ξύλου.

2.7.1 Γλουταμινική συνθετάση

Η γλουταμινική συνθετάση, GS, καταλύει την αντίδραση της ένωσης αμμωνιακού ιόντος σε γλουταμικό οξύ παρουσία ATP για τη σύνθεση γλουταμίνης και ADP (Εικ. 1). Το ένζυμο αυτό βρίσκεται σε δύο ισομορφές, που εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα (GS1) και στους χλωροπλάστες ή στα πλαστίδια (GS2). Στα φύλλα, η χλωροπλαστική GS2 καταλύει την πρωτογενή ενσωμάτωση της αμμωνίας που παράγεται από την αναγωγή των νιτρικών και επίσης επαναχρησιμοποιεί την αμμωνία που παράγεται κατά τη φωτοαναπνοή. Η ποσότητα της GS2 είναι 10 φορές μεγαλύτερη από τη GS1 και, επομένως, η συνεισφορά της GS2 είναι πολύ σημαντική για την ανάπτυξη του φυτού. Επίσης στις ρίζες, η αμμωνία που προσλαμβάνεται από το έδαφος ή προέρχεται από την αναγωγή των νιτρικών αφομοιώνεται στο κυτταρόπλασμα με τη δράση της GS1 και στα πλαστίδια με τη δράση

της GS2.

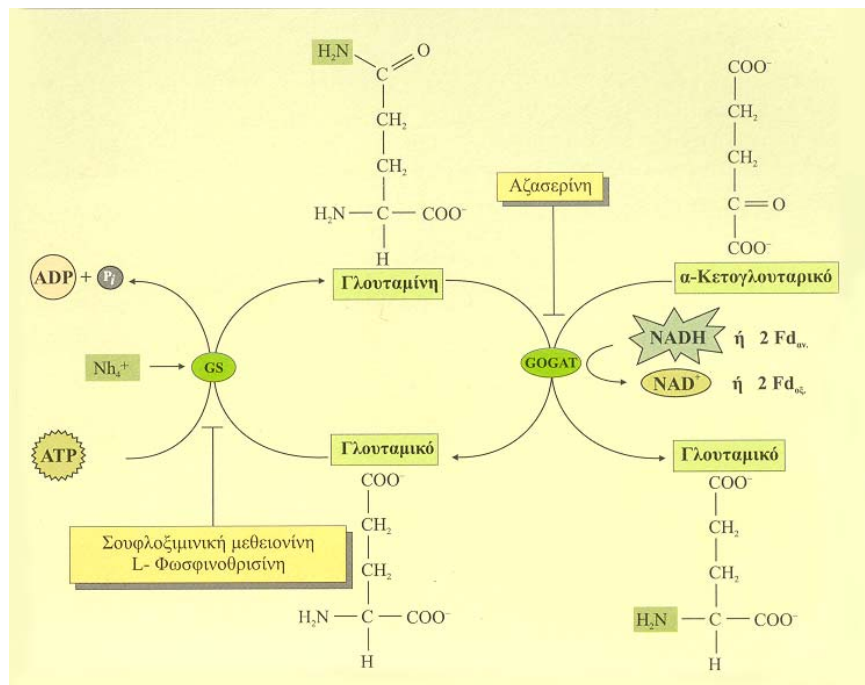
Στην *Arabidopsis* και στα άλλα φυτικά είδη που έχουν εξετασθεί υπάρχει ένα γονίδιο για την GS2 και από ένα έως πέντε για την κυτταροπλασματική GS1. Π.χ. υπάρχουν ένα στο μπιζέλι, τρία στην *Arabidopsis* και στο φασόλι και πέντε στο καλαμπόκι. Η φυσιολογική δράση της GS2 έχει διαλευκανθεί με μεταλλαγμένα φυτά *gs2*. Η επαναχρησιμοποίηση της φωτοαναπνευστικής αμμωνίας από την GS2 αμφισβητήθηκε εξαιτίας του υποκυτταρικού εντοπισμού της. Για τον λόγο αυτό προτάθηκε ότι η GDH είναι υπεύθυνη για την αφομοίωση της αμμωνίας που παράγεται κατά τη φωτοαναπνοή. Ωστόσο, μεταλλαγμένες μορφές που δεν έχουν GS2 δεν είναι σε θέση να επαναχρησιμοποιήσουν τη φωτοαναπνευστική αμμωνία, παρά το ότι διαθέτουν την κυτταροπλασματική GS1. Αυτό το παράδοξο αποσαφηνίστηκε με ανοσοεντοπισμό της έκφρασης των GS1 και GS2. Βρέθηκε λοιπόν ότι στα κύτταρα του μεσοφύλλου, όπου γίνεται η φωτοαναπνοή, η GS1 δεν εκφράζεται. Επομένως, η ύπαρξη κυτταροπλασματικής GS1 δεν μπορεί να υποκαταστήσει την έλλειψη GS2.

Το γεγονός ότι το μη ψυχανθές φυτό, η *Arabidopsis*, έχει τουλάχιστον 3 γονίδια για την κυτταροπλασματική GS1 εγείρει ερωτηματικά, αφού πιστευόταν ότι τα πολλαπλά γονίδια *gs* ήταν σημαντικά μόνο για τα ψυχανθή, όπου η έκφρασή τους στις ρίζες αποτελούσε προϋπόθεση για τη σύνθεση της γλουταμίνης, που χρησιμοποιείται για τη μεταφορά του αζώτου στο υπέργειο τμήμα. Μελέτη της δομής των 3 γονιδίων *gs* έδειξε ότι έχουν πολύ μικρές διαφορές στην έκφρασή τους. Φαίνεται ότι η ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων της GS είναι ιστοειδική και γίνεται σε μεταγραφικό ή και μεταφραστικό επίπεδο. Τα μεταλλάγματα που έχουν απομονωθεί στερούνται ενεργότητας GS επειδή είτε το mRNA είναι ασταθές είτε η

πρωτεΐνη ανενεργή, λόγω τροποποίησης του ενεργού κέντρου. Η μελέτη γενετικώς τροποποιημένων φυτών που έχουν δημιουργηθεί θα δώσει περισσότερες πληροφορίες για τον φυσιολογικό ρόλο των ισοενζύμων της GS.

2.7.2 Γλουταμική συνθάση

Μετά την πρώτη αντίδραση για την ενσωμάτωση των αμμωνιακών ιόντων με τη δράση της GS, ακολουθεί η αντίδραση που καταλύεται από τη γλουταμική συνθάση, GOGAT, μεταξύ ενός μορίου γλουταμίνης και ενός α-κετογλουταρικού για τη σύνθεση 2 μορίων γλουταμικού, παρουσία NADH ή ανηγμένης φερρεδοξίνης (Εικ. 2).



Εικόνα 2: Αντιδράσεις που καταλύονται από την γλουταμινική συνθετάση και τη Γλουταμική συνθάση. Στα πορτοκαλί τετράγωνα φαίνονται οι παρεμποδιστές των αντιστοιχών ένζυμων (από Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, 2003).

Έτσι συντίθεται το γλουταμικό οξύ, που σε πολλά φυτά και στην *Arabidopsis* είναι το κυριότερο συστατικό της αμινοξικής φάσης των φύλλων. Η GOGAT έχει δύο τύπους:

1. Αυτόν που χρησιμοποιεί φερρεδοξίνη (Fd-GOGAT), που υπερτερεί στους φωτοσυνθετικούς ιστούς.
2. Αυτόν που χρησιμοποιεί NADH (NADH-GOGAT), που υπερτερεί σε μη φωτοσυνθετικούς ιστούς.

Και οι δύο εντοπίζονται στους χλωροπλάστες και στα πλαστίδια, αντίστοιχα. Βιοχημική ανάλυση των GOGAT έδειξε ότι υπάρχουν πολλά ισοένζυμα, αλλά ο φυσιολογικός τους ρόλος είναι αδιευκρίνιστος. Μοριακή ανάλυση των γονιδίων και των μεταλλάξεών τους στην *Arabidopsis* έχουν αρχίσει να αποσαφηνίζουν τον ρόλο τους.

Στα φύλλα των άγριου τύπου *Arabidopsis*, η Fd-GOGAT αποτελεί περίπου το 95% της ενεργότητας GOGAT, ενώ η NADH-GOGAT αποτελεί το υπόλοιπο 5%. Σε φωτοαναπνευστικές μεταλλάξεις (μεταλλάγματα *gZs*), η Fd-GOGAT στα φύλλα σχεδόν δεν ανιχνεύεται, ενώ η NADH-GOGAT παραμένει σε χαμηλά επίπεδα. Τα φυτά αναπτύσσονται κανονικά σε ατμόσφαιρα υψηλού CO₂, ενώ σε αέρα πεθαίνουν, υποδηλώνοντας ότι η Fd-GOGAT είναι απαραίτητη για την επαναφομοίωση της αμμωνίας που παράγεται κατά τη φωτοαναπνοή.

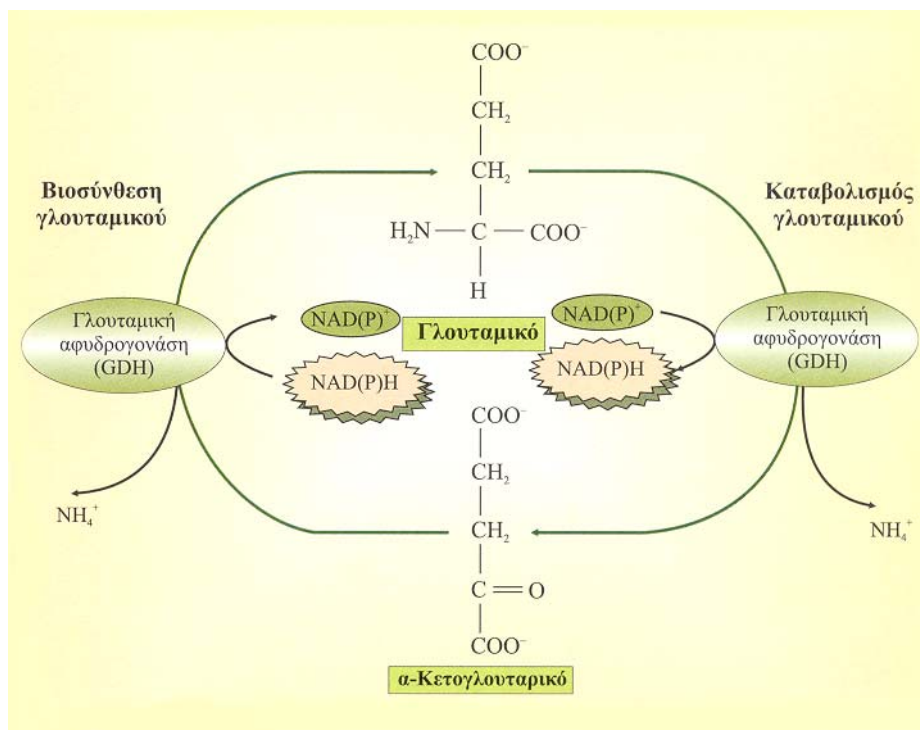
Κλώνοι cDNA για Fd-GOGAT έχουν απομονωθεί από αρκετά φυτικά είδη, μεταξύ αυτών δύο Fd-GOGAT cDNA από την *Arabidopsis*, οι *gZulKat* και *gZu2*, που εκφράζονται κυρίως στους βλαστούς και στις ρίζες, αντίστοιχα. Κλώνοι cDNA για NADH-GOGAT έχουν απομονωθεί μόνο από τη μηδική και την *Arabidopsis*. Η δομή τους μοιάζει με τον κλώνο της *E. coli*, όπου η GOGAT αποτελείται από 2 πολυπεπίδια, ένα μεγάλο και ένα μικρό.

Στα φυτά, οι δύο υπομονάδες της NADH-GOGAT συνδέονται μεταξύ

τους με το NADH κοντά στο C-άκρο. Η ενεργότητά της είναι χαμηλή στα φύλλα και υψηλή στις ρίζες και στις κοτυληδόνες. Στην *Arabidopsis*, το *glut* έχει υψηλή έκφραση στις ρίζες και χαμηλή στα φύλλα. Αυτός ο οργανοειδικός τρόπος έκφρασης υποδηλώνει ότι η NADH-GOGAT με την κυτταροπλασματική GS1 και η Fd-GOGAT με τη χλωροπλαστική GS2 δρουν για τη σύνθεση γλουταμίνης και γλουταμικού στις ρίζες και στα φύλλα, αντίστοιχα .

2.7.3 Γλουταμική αφυδρογονάση

Η γλουταμική αφυδρογονάση (glutamate dehydrogenase, GDH) βρίσκεται σε όλους τους οργανισμούς και καταλύει την αφομοίωση των αμμωνιακών ιόντων και τη σύνθεση γλουταμικού, καθώς και την απαμίνωση του γλουταμικού οξέος προς α-κετογλουταρικό (Εικόνα 3). Οι GDH είναι πολυμερικά αλλοστερικά ένζυμα που κατατάσσονται σε 2 κατηγορίες, ανάλογα με τη μεταβολική εξειδίκευση και τη δομή τους. Οι τετραμερείς GDH είναι NAD-ένζυμα που καταβολίζουν το γλουταμικό. Οι εξαμερείς είναι NAD(P)H-ένζυμα που αφομοιώνουν αμμωνία. Οι τετραμερείς και οι εξαμερείς GDH έχουν σημαντικές διαφορές στην πρωτοταγή τους δομή. Πρόσφατα, με βάση κρυσταλλογραφική ανάλυση, προτάθηκε ότι τα εξαμερή ένζυμα αποτελούν μια ξεχωριστή κατηγορία, ανεξάρτητα από την εξειδίκευση για συνένζυμο.



Εικόνα 3: Αμινωτική και απαμινωτική αντίδραση, που καταλύονται από τη γλουταμική αφυδρογονάση (από Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, 2003).

Στα φυτά, η GDH είναι εξαμερής και έχει 7 ισομορφές, που αποτελούνται από συνδυασμό δύο υπομονάδων, της α- και της β- υπομονάδας. Οι δύο ακραίες ισομορφές είναι ομοεξαμερείς της α- και β- υπομονάδας, αντίστοιχα, και οι 5 ενδιάμεσες είναι υβρίδια. Τα γονίδια της GDH έχουν κλωνοποιηθεί από πολλούς μικροοργανισμούς, τον άνθρωπο, το ποντίκι, το κοτόπουλο και, τελευταία, από πέντε φυτικά είδη, το αμπέλι, το καλαμπόκι, την τομάτα, τον καπνό και την *Arabidopsis*. Με βάση φυλογενετικό δενδρόγραμμα των αλληλουχιών 21 GDH, που έχουν χαρακτηριστεί, καταδείχθηκε ότι υπάρχουν 2 οικογένειες αντίστοιχων γονιδίων. Οι δύο μορφές των πρωτεϊνών GDH υπήρχαν σε έναν από τους τελευταίους κοινούς προγόνους των βασιλείων. Μετά τον διαχωρισμό σε ευβακτήρια, αρχαιοβακτήρια και ευκαρυωτικούς οργανισμούς, μόνο μία από αυτές τις μορφές κληρονομήθηκε στους οργανισμούς, χωρίς να

αποκλείεται ότι κάποιος από τους συγκεκριμένους οργανισμούς που υπάρχουν σήμερα κληρονόμησε γονίδια και από τις δύο οικογένειες.

Συμπερασματικά, σύμφωνα με τα μέχρι τώρα ερευνητικά αποτελέσματα, μπορούμε να πούμε ότι η βιοχημική οδός GS/GOGAT είναι η σημαντικότερη οδός ενσωμάτωσης της αμμωνίας σε αμινοξέα, στα φυτά. Ο ρόλος της GDH δεν έχει πλήρως διευκρινισθεί. Φαίνεται ότι ενδεχομένως συμμετέχει στη χρήση της αμμωνίας, σε περιπτώσεις υψηλής ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης, συμβάλλοντας στην αποτοξίνωση των κυττάρων. Σε αυτό συνηγορούν τα αποτελέσματα τελευταίων μελετών όπου, παρουσία υψηλών επιπέδων ενδοκυτταρικής αμμωνίας, παρατηρείται αύξηση της έκφρασης του γονιδίου της α-υπομονάδας, σύνθεση των GDH-ισομορφών, που αποτελούνται κυρίως από την α-υπομονάδα, και αύξηση της ενεργότητας του ενζύμου.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Σχεδιασμός πειράματος

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε από το Εργαστήριο θρέψης φυτών υπό την εισήγηση του Δρος Τσικαλά Π. από τις σπουδάστριες Τροχαλάκη Σ. και Μαρινίστη Ι.

Το πείραμα εγκαταστάθηκε στο θερμοκήπιο δρεπτών ανθέων στο αγρόκτημα του Τ.Ε.Ι. Κρήτης από και αποτελούνταν από οκτώ επεμβάσεις κάθε μια από τις οποίες είχε δυο επαναλήψεις. Το κάθε πειραματικό τεμάχιο αποτελούνταν από τέσσερις γλάστρες από τις οποίες κάθε μια περιείχε τρία φυτά σπανακιού. Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 64 γλάστρες με 192 φυτά σπανακιού.

Για την παρασκευή των υποστρωμάτων χρησιμοποιήθηκαν τρία διαφορετικά κόμποστ. Τα κόμποστ αυτά περιείχαν ίλη βιολογικού καθαρισμού κομποστοποιημένη και δυο εμπορικά κόμποστ, εκ των οποίων το ένα προερχόταν από κοπριά ορνίθων και το άλλο ήταν απλό κόμποστ με το εμπορικό όνομα (blumenerde). Τέλος το υπόστρωμα μιας επέμβασης αποτελούνταν από σκέτο έδαφος και είναι ο μάρτυρας του πειράματος.

Μετά την πάροδο δυο μηνών πραγματοποιήθηκε η συλλογή των φυτών και μέρος των δειγμάτων φυλάχτηκε σε ψυγείο στους -80°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

Οι αναλογίες των κόμποστ στις επεμβάσεις φαίνονται παρακάτω:

	ΕΠΕΜΒΑΣΗ
A	2,5 m³ ιλύος βιολογικού καθαρισμού, σε 1000 m ² εδάφους σε 30 cm βάθος.
B	5 m³ ιλύος βιολογικού καθαρισμού, σε 1000 m ² εδάφους σε 30 cm βάθος
Γ	10 m³ ιλύος βιολογικού καθαρισμού, σε 1000 m ² εδάφους σε 30 cm βάθος
Δ	15 m³ ιλύος βιολογικού καθαρισμού, σε 1000 m ² εδάφους σε 30 cm βάθος
E	20 m³ ιλύος βιολογικού καθαρισμού, σε 1000 m ² εδάφους σε 30 cm βάθος
Z	10 m³ κοπριά ορνίθων, σε 1000 m ² εδάφους σε 30 cm βάθος
H	10 m³ BLUMENERDE, σε 1000 m ² εδάφους σε 30 cm βάθος
Θ	Σκέτο έδαφος (Μάρτυρας).

3.2 Εκχύλιση πρωτεϊνών από φυτικούς ιστούς

Διαλύματα:

Διάλυμα εκχύλισης (extraction buffer): 100 mM Tris-HCl, pH:8,2, 10 mM EDTA, 3 mM MgCl, 10% Glycerol, 0,2% Triton X 100, 5 mM DTT

Διαδικασία:

Ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιγράφεται από τον. Λουλακάκη (1999). Όλα τα στάδια εκχύλισης των πρωτεϊνών εκτελέστηκαν μέσα σε πάγο. Όλα τα διαλύματα και οι μικροσυσκευές διατηρήθηκαν μέσα σε πάγο. Η αναλογία φυτικού ιστού και extraction buffer (διατηρημένου στους 4 °C), που λειοτριβήθηκε στο γουδί ήταν 1:4. Τα μίγματα μεταφέρθηκαν σε σωλήνες φυγοκέντρου και ομογενοποιήθηκαν σε ομογενοποιητή τρεις φορές, διάρκειας 30 sec η κάθε μία. Ακολούθησε επώαση σε πάγο, ανάδευση και αφού έγινε ισοζύγιση φυγοκεντρήθηκαν σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στις 10.000 rpm και 4 °C για 30 min. Τα υπερκείμενα μοιράστηκαν σε σωλήνες (Falcon) και φυλάχτηκαν στον καταψύκτη για τους επόμενους προσδιορισμούς.

3.3 Ποσοτικός προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης (Modified Lowry)

Διαλύματα:

Διάλυμα A: 2 g NaOH, 10 g Na₂CO₃, 0,1 g τρυγικό Na-K σε 500 mL H₂O

Διάλυμα B: 0,5 g CuSO₄ 5H₂O σε 100mL H₂O

Διάλυμα Γ: Διάλυμα A & Διάλυμα B σε αναλογία 100:2 (παρασκευάζεται λίγο πριν την χρήση).

Διάλυμα Δ: Folin-Phenol 2X αραιωμένο 1:1 με H₂O (παρασκευάζεται λίγο πριν την χρήση).

Πυκνό αντιδραστήριο Bradford: 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 διαλύονται σε 50 ml αιθανόλης με ισχυρή ανάδευση. Μετά την πλήρη διάλυση προστίθενται 100 ml 85% φωσφορικού οξέος.

Διάλυμα BSA 1 mg/ml

Διαδικασία:

Σε μικροσωλήνες eppendorf αναμειγνύονται 25 μL εκχυλίσματος και 25 μL 20% TCA, ακολουθεί φυγοκέντριση στις 14,000 rpm για 20 min. Έπειτα γίνεται άντληση του υπερκείμενου με αντλία Bernoulli. Επαναδιαλύεται η πελέτα (πρωτεϊνικό ίζημα) σε 100 μL διαλύματος Α. Προστίθεται 1 mL διαλύματος Γ και επώαση 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Προστίθεται 100 μL διαλύματος Δ και επώαση για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου.

Αφού μηδενιστεί το φασματοφωτόμετρο με το «τυφλό» διάλυμα ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησης (Absorbance) των διαλυμάτων στα 625 nm.

Δεκαπέντε ml πυκνού αντιδραστηρίου Bradford αραιώνονται με H₂O μέχρις όγκου 100 ml. Από το πυκνό διάλυμα BSA (1 mg/ml) παρασκευάζεται μία σειρά διαλυμάτων με περιεκτικότητα 0, 10, 20, 30, 40, 60, 80 και 100 μg BSA ανά 0.1 ml τελικού διαλύματος. Σε δοκιμαστικούς σωλήνες τοποθετείται 0.1 ml από τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα και από τα διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης BSA και προστίθενται 5 ml από το αραιωμένο διάλυμα Bradford. Ακολουθεί ανάδευση και μετά από 5 έως 30 min από την προσθήκη του αντιδραστηρίου μετράται η απορρόφηση στα 595 nm εντός.

Οι τιμές απορρόφησης των διαλυμάτων BSA (0-100 μg BSA) θα χρησιμοποιηθούν για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης (γραφική παράσταση της απορρόφησης σε σχέση με την περιεκτικότητα του διαλύματος σε BSA). Από την πρότυπη καμπύλη θα προσδιοριστεί η περιεκτικότητα κάθε φυτικού εκχυλίσματος σε πρωτεΐνη. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mg πρωτεϊνών ανά ml διαλύματος και ανά g φρέσκου βάρους

Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών (Poly Acrylamide Gel Electrophoresis)

Διαλύματα:

Διάλυμα μετουσίωσης δειγμάτων (6 X sample buffer): 150 mM Tris-HCl pH:6,8, 9% SDS, 15% β-μερκαπτοαιθανόλη (b-mercaptoethanol, 0,1% κυανού της βρωμοφαινόλης, 30% γλυκερόλη.

- Μητρικό διάλυμα ακρυλαμίδης: 29,2% ακρυλαμίδη (acrylamide), 0,8% δις-ακρυλαμίδη (bis-acrylamide).
- Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτώματος διαχωρισμού (resolving gel buffer): 1,5 M Tris-HCl pH 8,9 (Lower Tris 4X).
- Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτώματος επιστοίβασης (stacking gel buffer): 0,5 M Tris-HCl pH 6,8 (Upper Tris 4X).
- Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Tank Buffer): 25 mM Tris, 192 mM glycine, 0,1% SDS.
- 10% διάλυμα ammonium per sulfate (APS)
- 20% διάλυμα SDS
- 50% διάλυμα γλυκερόλης
- TEMED

Διαδικασία:

Παρασκευάστηκαν επίπεδα πηκτώματα (gel) πάχους 1,5 mm τα οποία μετά την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκαν για την χρώση ολικών πρωτεϊνών ή για την μεταφορά τους σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης (NC). Κάθε πήκτωμα αποτελείται από δυο επιμέρους πηκτώματα όπου το πήκτωμα επιστοιβάξης (stacking gel) προηγείται του πηκτώματος ανάλυσης (resolving gel). Το resolving gel περιείχε 10% πολυακρυλαμίδη και το stacking gel 4% πολυακρυλαμίδη.

Για την μετουσίωση των δειγμάτων προστέθηκε σε κάθε πρωτεϊνικό δείγμα διάλυμα μετουσίωσης (sample buffer) σε αναλογία 5:1. Το μίγμα επώαστηκε στους 100°C για 5 min και στην συνέχεια μεταφέρθηκε σε πάγο.

Ηλεκτροφόρηση: Το πήκτωμα διαχωρισμού τοποθετήθηκε στη συσκευή και αφέθηκε μέχρι να πολυμεριστεί. Στην συνέχεια παρασκευάστηκε και εφαρμόστηκε στη συσκευή το πήκτωμα επιστοιβάσης. Αμέσως εφαρμόστηκε στον υποδοχέα το χτένι δημιουργίας «πηγαδιών» στα οποία τοποθετήθηκαν στην συνέχεια τα προς ανάλυση δείγματα. Το διάλυμα αφέθηκε να πολυμεριστεί. Τα δοχεία της ηλεκτροφόρησης γεμίστηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Tank Buffer). Τέλος η ποσότητα μετουσιωμένων δειγμάτων μεταφέρθηκε με μικροσύριγγα στα πηγιάδια (wells) και ηλεκτροφορήθηκαν στα 80 V έως ότου το μέτωπο να βγει από το πήκτωμα ανάλυσης (για περίπου 2 ώρες).

3.5 Χρωματισμός πρωτεϊνών με Coomassie Brilliant Blue R-250

Η μέθοδος έγινε σύμφωνα με τον Λουλακάκη (1999).

Διαλύματα:

- Διάλυμα χρώσης (stain): 0,1% Coomassie Brilliant Blue R-250, 50%

μεθανόλη, 10% οξικό οξύ.

- Διάλυμα αποχρωματισμού (distain): 20% μεθανόλη, 7% οξικό οξύ.

Διαδικασία:

Με την συμπλήρωση της SDS-PAGE, το πήκτωμα μεταφέρθηκε σε κατάλληλο δοχείο το οποίο περιείχε διάλυμα χρώσης (περίπου 100 mL). Το δοχείο τοποθετήθηκε σε ανακινούμενη πλάκα και αφέθηκε να αναδευτεί ελαφρά για τουλάχιστον 1 ώρα. Στην συνέχεια αφού απομακρύνθηκε το διάλυμα χρώσης και το gel ξεπλύθηκε με D-H₂O, προστέθηκε το διάλυμα αποχρωματισμού και η ανάδευση συνεχίστηκε για αρκετές ώρες. Με την διαδικασία αυτή η πηκτή (gel) αποχρωματίστηκε και παρέμειναν χρωματισμένες (μπλε-μοβ) μόνο οι ζώνες των πρωτεϊνών. Τα πρωτεϊνικά πρότυπα παρατηρήθηκαν σε φωτεινή τράπεζα. Με την διαδικασία αυτή ανιχνεύτηκαν ζώνες που περιείχαν το λιγότερο 0,1 - 1 μg πρωτεΐνης.

3.6 Μεταφορά κατά Western Blot - Ανοσοανίχνευση

Διαλύματα:

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

Διαδικασία:

Η μεταφορά των πρωτεϊνών έγινε στα 80 V (400 mA σταθερά) για 1 ώρα και 15 λεπτά. Κάθε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης που ετοιμάστηκε με αυτό τον τρόπο χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των πολυπεπτιδίων

ενός εκ των ενζύμων γλουταμική αφυδρογονάση (GDH), συνθετάση της γλουταμίνης (GS) ή γλουταμινική συνθάση (GOGAT) με την βοήθεια του κατάλληλου αντισώματος. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν είχαν παρασκευαστεί προηγουμένως σε κουνέλια εναντίων των αντίστοιχων ενζύμων του αμπελιού.

Τα κύρια στάδια της ανίχνευσης ήταν:

1. Πλύσιμο της μεμβράνης σε PBS 1X για 10 - 15 min.
2. Η νιτροκυτταρίνη τοποθετείται σε διάλυμα 2% BSA in PBS 1X (0,5 g BSA in 25 mL PBS 1X) ανάδευση για 30 min (blocking).
3. Πλύσιμο 1 x 5 min in PBS 1X + 0,05% TWEEN 20
4. Προστίθεται το πρώτο αντίσωμα (1:1000) που είναι διαλυμένο σε 1% BSA σε PBS 1X + 0,05% TWEEN 20. Ανάδευση για τουλάχιστον 1 h και 30 min.
5. Πλύσιμο 5 x 5 min in PBS 1X + 0,05% TWEEN 20
6. Προστίθεται το αντιαντίσωμα(Alkaline Phosphatase) (Anti Rabbit 1:5000) in 1% BSA σε PBS 1X + 0,05% TWEEN 20. Ανάδευση 1 h 30 min
7. Πλύσιμο 2 x 5 min in PBS 1X + 0,05% TWEEN 20
Πλύσιμο 2x5 min 100 mM Tris pH 9 (stock 10X) ή DEA 1x (IM) (Diethylamine)
8. Επώαση στο διάλυμα χρώσης [staining: 30 mL Tris pH 9, 3 mg NBT, 30 μL BCiP (stock 10 mg / mL)], έως να εμφανιστούν οι ζώνες.
9. Πλύσιμο με D H₂O.

3.7 Μέτρηση Ενεργότητας του ενζύμου GDH (Λουλακάκης 1999)

Διαλύματα:

1M Tris-HCl pH 8,0.

2M NH₄Cl.

10 mM CaCl₂.

200 mM α-κετογλουταρικό οξύ.

2 mM NADH.

Διαδικασία:

Η ενεργότητα της GDH μετρήθηκε μέσω της αμινωτικής αντίδρασης (Λουλακάκης, 1999). Από τα παραπάνω διαλύματα παρασκευάστηκε μίγμα (GDH Mix) που αποτελούνταν από:

5 mL 1M Tris - HCl, 5 mL 2 M NH₄Cl, 5 mL 10 mM CaCl₂, 5 mL 200 mM α-κετογλουταρικό οξύ και 22,5 mL DH₂O.

Ακολούθησε εξισορρόπηση του μίγματος στους 27 °C. Για την αμινωτική αντίδραση προστέθηκαν σε κυβέτα του 1 mL, 850 μL GDH Mix, 50 μL εκχυλίσματος φυτικού ιστού και τελικά 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 φασματοφωτόμετρο. Στην συνέχεια υπολογίστηκε η ειδική ενεργότητα της GDH [Specific activity = GDH activity (ΔOD/min*mL)/ συνολικές πρωτεΐνες (mg/mL)]. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν επίσης σε μmol NADH που καταναλώθηκε / min και σε μmol NADH που καταναλώθηκε / g φυτικού ιστού.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Με σκοπό την μελέτη της επίδρασης της εφαρμογής διαφορετικών ποσοτήτων ιλύος βιολογικού και οργανικών υλικών στα ένζυμα αφομοίωσης του αζώτου του σπανακιού, χρησιμοποιήσαμε φυτά που αναπτύχθηκαν σε οκτώ διαφορετικά υποστρώματα και τα οποία είναι τα εξής:

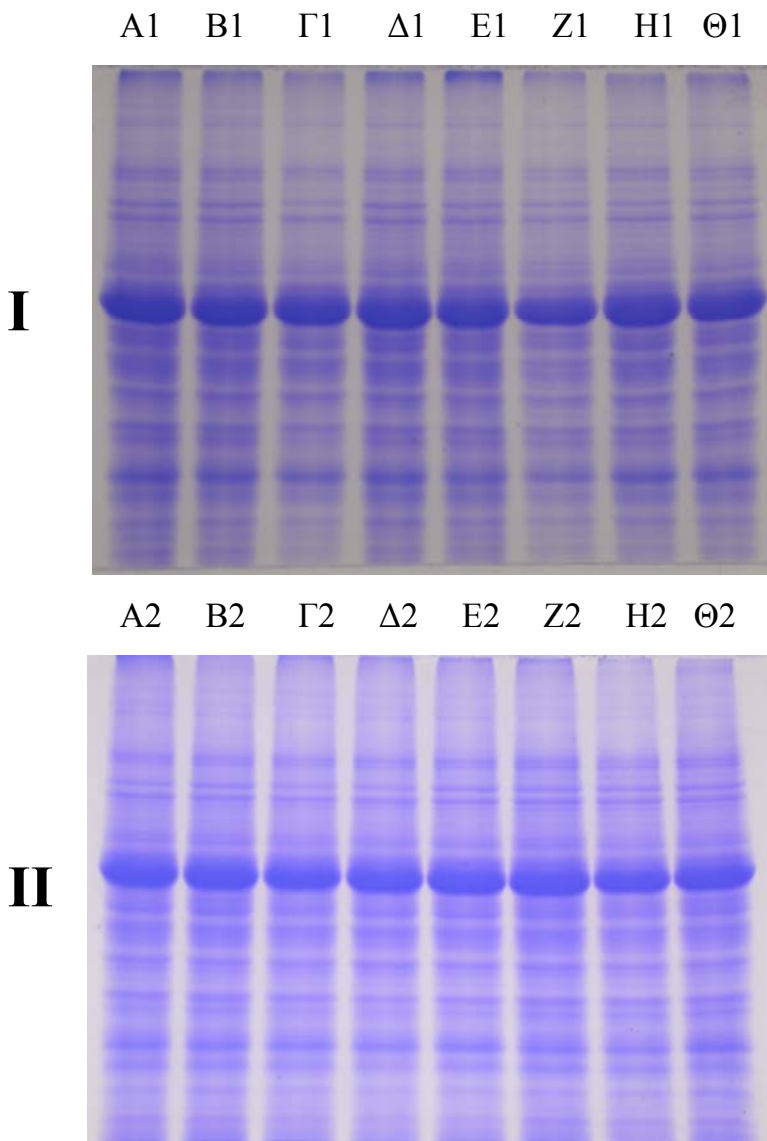
	ΕΠΕΜΒΑΣΗ
A	2,5 m³ ιλύος βιολογικού καθαρισμού, σε 1000 m ² εδάφους σε 30 cm βάθος.
B	5 m³ ιλύος βιολογικού καθαρισμού, σε 1000 m ² εδάφους σε 30 cm βάθος
Γ	10 m³ ιλύος βιολογικού καθαρισμού, σε 1000 m ² εδάφους σε 30 cm βάθος
Δ	15 m³ ιλύος βιολογικού καθαρισμού, σε 1000 m ² εδάφους σε 30 cm βάθος
E	20 m³ ιλύος βιολογικού καθαρισμού, σε 1000 m ² εδάφους σε 30 cm βάθος
Z	10 m³ κοπριά ορνίθων, σε 1000 m ² εδάφους σε 30 cm βάθος
H	10 m³ BLUMENERDE, σε 1000 m ² εδάφους σε 30 cm βάθος
Θ	Σκέτο έδαφος (Μάρτυρας).

Ακολούθησε εκχύλιση των πρωτεϊνών από φύλλα και τα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν για τον χαρακτηρισμό των ένζυμων GDH, GS και GOGAT.

Η περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων σε πρωτεΐνες προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Lowry και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 4. Παρατηρώντας τα αποτελέσματα που προέκυψαν διαπιστώνουμε μια τάση αύξησης της συγκέντρωσης των ολικών πρωτεϊνών αναλογικά της αύξησης της περιεκτικότητας της ιλύος του βιολογικού καθαρισμού στα υποστρώματα. Σε σχέση με τον μαρτυρά δεν παρατηρούμε αξιόλογη μεταβολή με τα υποστρώματα της ιλύς και του εμπορικού κομποστ (Blumenerde). Αντίθετα στο υπόστρωμα από κοπριά ορνίθων παρουσιάζεται

αύξηση των ολικών πρωτεϊνών σε σύγκριση με όλα τα υπόλοιπα υποστρώματα.

Στην Εικόνα 4 και 5 παρουσιάζονται τα ολικά πρότυπα που προέκυψαν μετά την SDS- PAGE των εκχυλισμάτων φύλλων σπανακιού. Σε όλα τα παραπάνω πρωτεϊνικά εκχυλίσματα έγινε ανοσοανίχνευση και μελέτη των τριών ένζυμων αφομοίωσης του αζώτου (GDH, GS και GOGAT) και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αναλυτικά για κάθε ένζυμο παρακάτω.



Εικόνα 4.(I, II) Πρωτεϊνικά πρότυπα φύλλων από φυτά σπανακιού που αναπτύχθηκαν σε υποστρώματα διαφορετικής συγκέντρωσης ιλός βιολογικού καθαρισμού, κοπριά ορνίθων και compost
I:Επανάληψη πρώτη
II. Επανάληψη δεύτερη
Τα πρότυπα προέκυψαν μετά από ανάλυση με SDS-PAGE και χρώση του πηκτώματος με Coomassie Brilliant Blue R-250.

4.1. Γλουταμική Αφυδρογονάση (GDH).

Η ενζυμική ενεργότητα της υπολογίσθηκε μέσω της αμινωτικής αντίδρασης και τα αποτελέσματα των επεμβάσεων παραθέτονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4: Ολικές πρωτεΐνες και ενζυμική ενεργότητα της GDH, ανά φυτικό ιστό και επέμβαση.

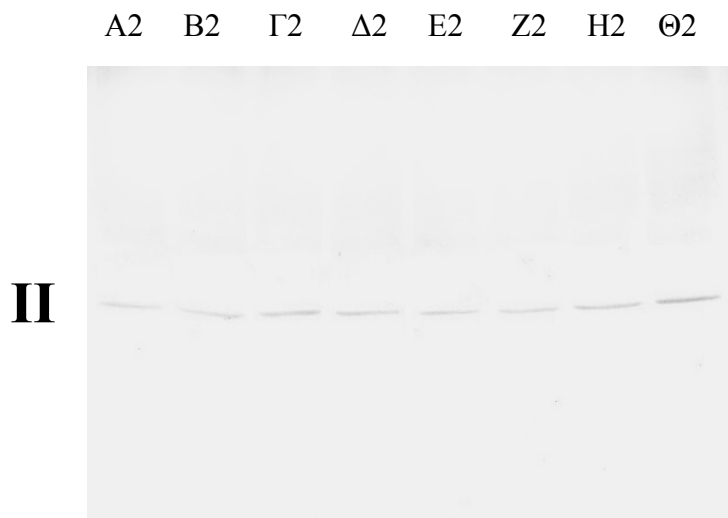
		ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ LOWRY OD/mL	ΟΛΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ mg/mL	ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ GDH OD/min*mL	ΕΙΔΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΔOD/min*mg πρωτ.	μmol NADH/ min*mg	ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ μmolNADH/ min*g φυτικού ιστού
ΣΠΑΝΑΚΙ Ι	A1	0,516	0,58	0,054	0,093	0,015	0,035
	B1	0,523	1,67	0,062	0,037	0,006	0,040
	Γ1	0,519	1,66	0,094	0,057	0,009	0,060
	Δ1	0,613	0,41	0,054	0,132	0,021	0,035
	E1	0,607	1,94	0,020	0,010	0,002	0,013
	Z1	0,636	2,04	0,094	0,046	0,007	0,060
	H1	0,495	0,70	0,048	0,069	0,011	0,031
	Θ1	0,539	0,60	0,028	0,047	0,007	0,018
ΣΠΑΝΑΚΙ ΙΙ	A2	0,556	1,78	0,046	0,026	0,004	0,029
	B2	0,616	1,97	0,054	0,027	0,004	0,035
	Γ2	0,539	1,72	0,050	0,029	0,005	0,032
	Δ2	0,584	1,87	0,050	0,027	0,004	0,032
	E2	0,556	1,78	0,030	0,017	0,003	0,019
	Z2	0,612	1,96	0,036	0,018	0,003	0,023
	H2	0,580	1,86	0,034	0,018	0,003	0,022
	Θ2	0,551	1,76	0,040	0,023	0,004	0,026

Μελετώντας τις τιμές της ειδικής ενεργότητας από τον παραπάνω πίνακα και για τις δυο επαναλήψεις παρατηρούμε ότι οι τιμές των τεσσάρων πρώτων υποστρωμάτων με ιλύ βιολογικού καθαρισμού είναι αυξημένες σε σχέση με τον μάρτυρα. Αντιθέτως η τιμή της πέμπτης επέμβασης, με την μεγαλύτερη συγκέντρωση ιλύος, είναι μικρότερη από το μάρτυρα. Επιπρόσθετα οι τιμές της ειδικής ενεργότητας στις επεμβάσεις με κοπριά ορνίθων και κομπόστας κυμαίνονται στα ίδια επίπεδα με τον μάρτυρα. Στην Εικόνα 5 παρουσιάζονται οι μεσοί όροι των τιμών της ειδικής ενεργότητας των δυο επαναλήψεων.



Εικόνα 5: Μέσος όρος της μεταβολής της ειδικής ενεργότητας ($\Delta\text{OD}/\text{min} \cdot \text{mg}$ πρωτ.) στους ιστούς των φύλλων σπανακιού, υπό την επίδραση διαφορετικών επεμβάσεων σε υποστρώματα.

Για την μελέτη των υπομονάδων της GDH τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των φύλλων αναλύθηκαν με SDS-PAGE (10%) ακρυλαμίδης και οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε φίλτρο νιτροκυτταρίνης (Western Blot). Μετά την ανοσοανίχνευση της GDH με ειδικό αντίσωμα, αναπτύχθηκε μία ζώνη σε κάθε επέμβαση. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν παρουσιάζονται στις παρακάτω εικόνες.



Εικόνα 6: (I, II)
 Πρωτεϊνικές ζώνες της
 GDH από φύλλα
 σπανακιού που
 αναπτύχθηκαν σε
 διαφορετικά οργανικά
 υποστρώματα.

I: Επανάληψη πρώτη

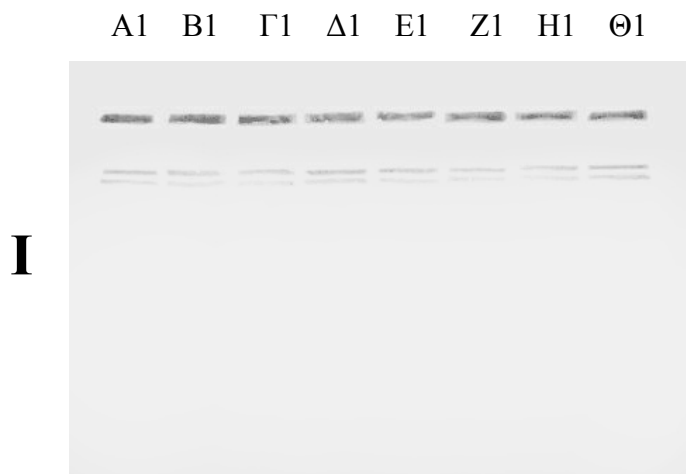
II. Επανάληψη δεύτερη

Ολικές πρωτεΐνες
 αναλύθηκαν με SDS-
 PAGE και
 μεταφέρθηκαν σε
 φίλτρα νιτροκυτταρίνης
 με την μέθοδο Western
 Blot. Στα φίλτρα έγινε
 ανίχνευση των
 υπομονάδων της GDH
 με την χρήση
 κατάλληλου
 αντισώματος.

Μελετώντας τις παραπάνω εικόνες με τα φίλτρα νιτροκυτταρίνης παρατηρούμε αύξηση της ποσότητας της πρωτεΐνης της GDH στις επεμβάσεις με κοπριά ορνίθων και κομπόστα σε σύγκριση με τον μάρτυρα αλλά και με όλες τις υπόλοιπες επεμβάσεις.

4.2 Γλουταμική συνθάση (GOGAT)

Όπως φαίνεται στις διάφορες μεταχειρίσεις η Fd-GOGAT ανιχνεύτηκε ως μια πρωτεϊνική ζώνη σχετικά μεγάλου μοριακού βάρους.



Εικόνα 7: (I, II)

Πρωτεϊνικές ζώνες της GOGAT από φύλλα σπανακιού που αναπτύχθηκαν σε διαφορετικά οργανικά υποστρώματα.

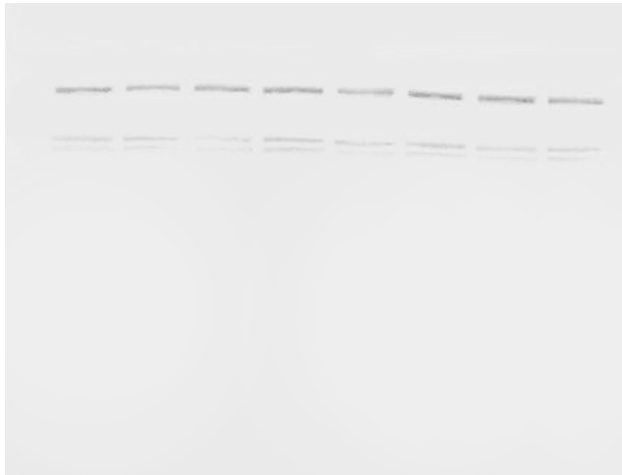
I:Επανάληψη πρώτη

II. Επανάληψη δεύτερη

Ολικές πρωτεΐνες αναλύθηκαν με SDS-PAGE και μεταφέρθηκαν σε φίλτρα νιτροκυτταρίνης με την μέθοδο Western Blot. Στα φίλτρα έγινε ανίχνευση των

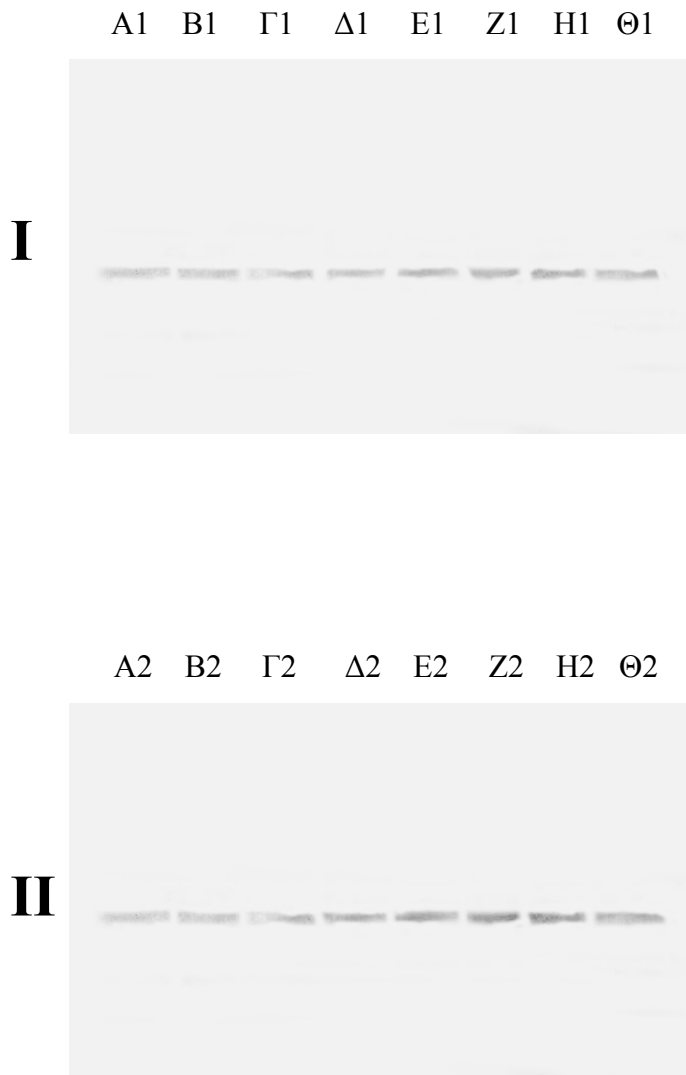
A2 B2 Γ2 Δ2 E2 Z2 Η2 Θ2

II



Από το αποτέλεσμα της ανοσοανίχνευσης για το ένζυμο GOGAT φαίνεται σταδιακή αύξηση της ποσότητας του ένζυμου στις πρώτες τέσσερις επεμβάσεις με ίλη. Αντίθετα υπάρχει μείωση στην πέμπτη επέμβαση με ιλύ σε σχέση με τον μάρτυρα. Παράλληλα τα επίπεδα του ένζυμου στις επεμβάσεις με κοπριά ορνίθων και κομπόστα είναι όμοια με αυτά της τέταρτης επέμβασης με ιλύ.

4.3 Γλουταμινική συνθετάση (GS)



Εικόνα 8: (I, II)

Πρωτεϊνικές ζώνες της GS από φύλλα σπανακιού που αναπτύχθηκαν σε διαφορετικά οργανικά υποστρώματα.

I:Επανάληψη πρώτη

II. Επανάληψη δεύτερη

Ολικές πρωτεΐνες αναλύθηκαν με SDS-

PAGE και

μεταφέρθηκαν σε

φίλτρα νιτροκυτταρίνης

με την μέθοδο Western

Blot. Στα φίλτρα έγινε

ανίχνευση των

υπομονάδων της GS με

την χρήση κατάλληλου

αντισώματος.

Από την μελέτη των παραπάνω εικόνων δεν παρατηρούνται αξιόλογες μεταβολές στις ποσότητες του ένζυμου GS στις επεμβάσεις με ιλύ παρά μόνο σε αυτές με κοπριά ορνίθων και κομπόστα.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην εργασία αυτή εξετάσαμε την επίδραση διαφορετικών ποσοτήτων ιλύος ως υποστρώματα σε καλλιέργεια σπανακιού. Η ιλύς αποτελείται από ιζήματα αστικών λυμάτων και παρουσιάζει το πλεονέκτημα της εύκολης επεξεργασίας. Τα ιζήματα αυτά είναι πλούσια σε θρεπτικά στοιχεία, αλλά και σε οργανική ουσία και γι' αυτό το λόγο αξιοποιούνται ήδη από πολλά χρόνια σε γεωργικές καλλιέργειες. Η ιλύς δεν χρησιμοποιείται ως πηγή θρεπτικών στοιχείων μόνο, αλλά και ως εδαφοβελτιωτικό, διότι επιδρά ευνοϊκά στη δομή των υποβαθμισμένων από φυσική άποψη εδαφών. Ωστόσο ένα σοβαρό πρόβλημα που δημιουργείται με την χρήση της ιλύος είναι η μεγάλη περιεκτικότητα της σε βαρέα μέταλλα.

Στην προσπάθεια να διευρυνθεί η δυνατότητα χρησιμοποίησης της ιλύς μελετήθηκε η επίδραση διαφορετικών υποστρωμάτων τόσο στην ανάπτυξη φυτών σπανακιού, όσο και σε βιοχημικά χαρακτηριστικά των φυτών αυτών. Συγκεκριμένα ερευνήθηκε η επίδραση των υποστρωμάτων στα τρία ένζυμα που συμμετέχουν στην αφομοίωση του ανόργανου αζώτου στα φυτά (GDH, GS, GOGAT).

Η μελέτη των ενζύμων αυτών πραγματοποιήθηκε για να εξετάσουμε την επίδραση των υποστρωμάτων στους φυσιολογικούς μηχανισμούς ανάπτυξης των φυτών. Η επιλογή των ενζύμων αυτών έγινε, διότι από μελέτες είναι αποδεδειγμένο πως σε καταστάσεις καταπόνησης αυτά επάγονται.

Τα αποτελέσματα του πειραματος έδειξαν ότι σε γενικές γραμμές ο τύπος του υποστρώματος επηρεάζει σε μικρό βαθμό τα επίπεδα των ενζύμων στα φύλλα των φυτών σπανακιού. Τα τρία ένζυμα αυτά ανιχνεύθηκαν σε παρόμοια επίπεδα σε όλα τα δείγματα που αναλύθηκαν.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. 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.
2. Gouia H., Suzuki a., Brulfert J., Ghorbal M. H. (2002) Effects of cadmium on the co-ordination of nitrogen and carbon metabolism in bean seedlings. -*J. Blant Physiol.* 160:367-376.
3. Ju G. C., Wilfried E. R., Oaks A. (1997) Influence of cadmium on the production of r-glutamylcysteine peptides and enzymes of nitrogen assimilation in *Zea mays* seedlings. - *Phisiologia Planarium* 101: 793-799.
4. Κονσολάκης Γ., (2004) πτυχιακή εργασία: επίδραση βαρέων μετάλλων στα ένζυμα αφομοίωσης του ανόργανου αζώτου σε ιστοκαλλιέργειες αγγουριάς.
5. Lea, J.P., and R.C. Leegood, 1993. *Plant Biochemistry and Molecular Biology.* John Wiley & Sons Ltd. England.
6. 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.
7. 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.
8. 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.

9. 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.
10. 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.
11. Loulakakis, K.A., and K.A. Roubelakis-Angelakis, 2000. Enzymes of ammonia assimilation in *Vitis vinifera*. *Acta Hort.* 526: 209-223.
12. Λουλακακης, Κ. Α. (1999) σημειώσεις εργαστηρίου βιοτεχνολογίας φυτών, Ηράκλειο.
13. Mahboobi H., Yucel M., Oktem H. A. (2002) Nitrate reductase and glutamate dehydrogenase activities of resistant and sensitive cultivars of wheat and barley under Boron toxicity. - *JOURNAL OF PLANT NUTRITION.* 25(8):1829-1837.
14. Ρουμπελάκη – Αγγελάκη Κ.Α, 2003. Φυσιολογία φυτών. Πρώτη έκδοση. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο. 260-290.
15. Τροχαλάκη Σ., Μαρινίτση Ι., (2004) πτυχιακή εργασία: Επίδραση της εφαρμογής οργανικών υλικών στη συγκέντρωση βαρέων μετάλλων στα διάφορα μέρη του σπανακιού.