



ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ, ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΑΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΚΑΙ
ΑΝΘΟΚΟΜΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΚΑΔΜΙΟΥ (Cd) ΣΕ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ
ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΦΥΤΩΝ NICOTIANA TABACUM ΚΑΙ NICOTIANA
GLAUCA.

ΣΟΦΙΑ ΓΕΡΑΣΙΜΟΠΟΥΛΟΥ

ΕΙΣΗΓΗΤΗΣ: Δρ. ΚΩΝ/ΝΤΙΝΟΣ ΛΟΥΛΑΚΑΚΗΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ

2009

”Στους γονείς μου...”

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας και Φυσιολογίας Φυτών της Σχολής Τεχνολογίας Γεωπονίας του Τ.Ε.Ι. Κρήτης υπό την επίβλεψη του Δρ. Κωνσταντίνου Λουλακάκη. Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους εκείνους που με βοήθησαν κατά τη διάρκεια της προσπάθειάς μου για την πολύτιμη συμπαράστασή τους. Τις μεγαλύτερες ευχαριστίες μου θα ήθελα να εκφράσω στον επιβλέποντα καθηγητή μου Δρ. Κ. Λουλακάκη, στην καθηγήτρια Δρ. Μ. Δραγασάκη καθώς και στην υποψήφια διδάκτωρ Μαρία Χριστοφάκη για τη συνεχή καθοδήγησή τους, τις ανεκτίμητες επιστημονικές συμβουλές τους και το ενδιαφέρον που έδειξαν για τη διεκπεραίωση της εργασίας μου. Τέλος, ευχαριστώ θερμά όλους τους συναδέλφους μου για τη βοήθεια που μου προσέφεραν κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων και τη συγγραφή της εργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	3
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
1.1. Γενικά Ρυπαντές-Απορύπανση.....	8
1.2. Γενικά Χαρακτηριστικά των Βαρέων Μετάλλων.....	10
1.2.1. Κάδμιο (Cd).....	13
1.3. Φυτοεξυγίανση (Phytoremediation).....	14
1.3.1. Τεχνικές της φυτοεξυγίανσης.....	16
1.3.2. Σχεδιασμός συστημάτων φυτοεξυγίανσης.....	21
1.3.3. Συμπεράσματα – Βελτίωση της Αποτελεσματικότητας της μεθόδου.....	23
1.3.4. Φυτοεκχύλιση.....	24
1.3.5. Φυτά Υπερσυσσωρευτές (Hyperaccumulators plants).....	26
1.3.6. Πρόσληψη μετάλλων από τα φυτά.....	28
1.3.7. Μηχανισμοί ανθεκτικότητας των φυτών στα βαρέα μέταλλα.....	29
1. Ελεγχος στην πλασματική μεμβράνη.....	29
2. Χήλωση.....	30
<i>Φυτοχηλατίνες</i>	30
<i>Μεταλλοθειονίνες</i>	32
3. Διαμερισματοποίηση στο χυμοτόπιο.....	35
1.4. Αντίδραση των φυτών στα Βαρέα Μέταλλα.....	36
1.4.1. Βαρέα μέταλλα και ένζυμα αφομοίωσης του αζώτου.....	37
1.4.2. Αφομοίωση αμμωνίας.....	38
<i>Γλουταμινική συνθετάση (GS)</i>	40
<i>Γλουταμική συνθάση (GOGAT)</i>	41
<i>Γλουταμική Αφυδρογονάση (GDH)</i>	43
1.5. Φωτοσύνθεση.....	46
1.6. Επαγωγικός φθορισμός χλωροφύλλης.....	48
1.7. Βοτανικά χαρακτηριστικά των φυτών <i>Nicotiana glauca</i> και <i>Nicotiana tabacum</i>	50
1.7.1. <i>Nicotiana glauca</i>	50

1.7.2. <i>Nicotiana tabacum</i>	52
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	53
2.1. Μέτρηση ολικών χλωροφυλλών.....	54
2.2. Μέτρηση του ρυθμού φωτοσύνθεσης.....	55
2.3. Επαγωγικός φθορισμός της χλωροφύλλης (fluorescence induction) χλωροφύλλης.....	56
2.4. Εκχύλιση πρωτεϊνών από φυτικούς ιστούς.....	57
2.5. Ποσοτικός προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης (Modified Lowry).....	57
2.6. Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών (Polyacrylamide Gel Electrophoresis).....	58
2.6. Χρώση πρωτεϊνών με Coomassie Brilliant Blue R-250.....	60
2.7. Μεταφορά κατά Western Blot – Ανοσοανίχνευση.....	61
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	63
3.1. Επίδραση του καδμίου (Cd) στα μορφολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά των φυτών <i>Nicotiana tabacum</i> και <i>Nicotiana glauca</i>	63
3.1.1. Ύψος φυτών.....	67
3.1.2. Μεσογονάτια διαστήματα.....	67
3.1.3. Αριθμός φύλλων.....	68
3.1.4. Φρέσκο βάρος.....	69
3.1.5. Ενδογενείς συγκεντρώσεις καδμίου.....	70
3.1.6. Φωτοσύνθεση.....	76
3.1.7. Μέτρηση ολικών χλωροφυλλών.....	78
3.1.8. Επαγωγικός φθορισμός.....	80
3.2. Επίδραση του καδμίου (Cd) σε βιοχημικά χαρακτηριστικά του φυτικού είδους <i>Nicotiana tabacum</i>	82
3.2.1. Έκφραση των ενζύμων αφομοίωσης των αμμωνιακών ιόντων σε φυτά <i>N.</i> <i>Tabacum</i> και <i>N. glauca</i>	83
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	85
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	87

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η σύγχρονη κοινωνία παράγει και χρησιμοποιεί ένα εντυπωσιακό αριθμό οργανικών χημικών ουσιών και οι ποσότητες αυτές συνεχώς αυξάνουν. Οι ουσίες αυτές αναφέρονται ως *ξενοβιοτικές* (Xenobiotics), δηλώνοντας με το όρο αυτό ότι δεν υπάρχουν και δεν συντίθενται στο φυσικό περιβάλλον. Παρά το γεγονός ότι πολλές από τις ουσίες αυτές καταναλώνονται ή καταστρέφονται, ένα ορισμένο ποσοστό τους ελευθερώνεται στο έδαφος και το υπόγειο νερό. Αρκετές από τις ουσίες αυτές είναι τοξικές για τον άνθρωπο ακόμα και σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις και ορισμένες από αυτές είναι δυνατόν να διατηρηθούν στο έδαφος και το υπόγειο νερό για πολλά χρόνια αποτελώντας σημαντικό περιβαλλοντικό κίνδυνο. Η παρουσία αυτών των ουσιών και η τοξικότητά τους αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την εφαρμογή τεχνολογιών εξυγίανσης (Remediation Technologies). Στόχος των τεχνολογιών αυτών είναι είτε η εξολοκλήρου απομάκρυνση είτε η μείωση σε αποδεκτά επίπεδα των τοξικών ουσιών.

Η εξυγίανση εδαφών και υπόγειων υδάτων, που έχουν ρυπανθεί με οργανικές χημικές ουσίες (Η ρύπανση προέρχεται από ανθρώπινες δραστηριότητες όπως η εξόρυξη και η διαδικασία καθαρισμού μεταλλοφόρων ορυκτών, η χρήση φυσικών καυσίμων, η διαχείριση των αστικών και βιομηχανικών αποβλήτων και η χρήση λιπασμάτων και παρασιτοκτόνων στη γεωργία. Επίσης στις χωματερές, συσσωρεύονται βαρέα μέταλλα στα εκρέοντα διασταλάζοντα υγρά τα οποία ρυπαίνουν τα εδάφη της κοίτης απορροής) είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί με διάφορους μηχανισμούς και τεχνικές. Μεταξύ των χρησιμοποιούμενων τεχνικών περιλαμβάνονται, η εκσκαφή των ρυπασμένων εδαφών και η περαιτέρω επεξεργασία τους (soil excavation), η άντληση των υπογείων υδάτων και επεξεργασία (pump and treat), υγειονομική ταφή (landfilling), φυσικοχημικές μέθοδοι διαχωρισμού των ρυπαντών, ηλεκτροχημικές διεργασίες, αποτέφρωση (incineration). Οι παραπάνω τεχνικές παρουσιάζουν σημαντικούς περιορισμούς, όπως το υψηλό κόστος λειτουργίας και η περιορισμένη αποτελεσματικότητα στην επεξεργασία μίγματος ρυπαντών, όπως συνήθως απατώνται στη φύση. Επιπλέον στις περισσότερες περιπτώσεις εφαρμογής τους, γίνονται απρόθυμα αποδεκτές από τις τοπικές κοινωνίες, εξαιτίας των 'αφύσικου' μηχανολογικού εξοπλισμού που απαιτούν.

Οι περιορισμοί που παρουσιάζουν οι παραπάνω συμβατικές τεχνολογίες μπορούν να αρθούν με την εφαρμογή των τεχνικών της Βιοτεχνολογίας. Η χρησιμοποίηση βιολογικών διαδικασιών για την επεξεργασία υδατικών αποβλήτων αποτελεί συνηθισμένη πρακτική τα τελευταία 50 χρόνια. Η πρακτική αυτή παρείχε σημαντικές πληροφορίες για τη βιολογική διάσπαση συγκεκριμένων ενώσεων και έδωσε το έναυσμα για τη δημιουργία καινοτόμων τεχνολογιών εξυγίανσης όπως η φυτοεξυγίανση (Phytoremediation).

Η τεχνολογία της φυτοεξυγίανσης, παρουσιάζει έντονο ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια, ως εναλλακτική μέθοδος εξυγίανσης ρυπασμένων εδαφών και υπόγειων υδάτων. Η φυτοεξυγίανση βασίζεται στη διαπίστωση ότι τα φυτά έχουν τη δυνατότητα να προσλαμβάνουν και να διασπούν τοξικές οργανικές ουσίες, τόσο από το έδαφος όσο και από την ατμόσφαιρα και επομένως μπορούν, υπό προϋποθέσεις να χρησιμοποιηθούν για την οικονομική αντιμετώπιση του προβλήματος της ρύπανσης.

Μελέτες έχουν δείξει επίσης τις επιδράσεις των βαρέων μετάλλων στην αύξηση και ανάπτυξη διάφορων φυτών υπερσυσσωρευτών και μη. Οι αλλαγές στις θεμελιώδεις φυσιολογικές διαδικασίες του μεταβολισμού των φυτών έχουν αποδοθεί στα βαρέα μέταλλα, συμπεριλαμβανομένων, της φωτοσύνθεσης, της αναπνοής και του μεταβολισμού του αζώτου.

Εντούτοις, ο μεταβολισμός του αζώτου και η σχέση του με τα σχετικά ένζυμα δεν έχουν μελετηθεί ευρέως, αν και το άζωτο παίζει το σημαντικότερο ρόλο όλων των θρεπτικών ουσιών στην αύξηση των φυτών, μιας και αυτό συσχετίζεται με την παραγωγή βιομάζας και ο μεταβολισμός του συνδέεται άμεσα με το μεταβολισμό άνθρακα.

Οι πληροφορίες σχετικά με τα ένζυμα αφομοίωσης της αμμωνίας, δηλαδή γλουταμινική συνθετάση (GS), γλουταμική συνθάση (GOGAT) και γλουταμική αφυδρογονάση (GDH) υπό την επίδραση βαρέων μετάλλων είναι περιορισμένη.

Σε μια προσπάθεια να δοθούν απαντήσεις σχετικά με τα φυτά υπερσυσσωρευτές και ιδιαίτερα το ρόλο των ενζύμων αφομοίωσης της αμμωνίας κάτω από την επίδραση βαρέων μετάλλων μια συγκριτική μελέτη προτείνεται μεταξύ δύο συγγενικών ειδών, του *Nicotiana tabacum*, και του *Nicotiana glauca*. Καλλιέργειες, οικονομικά σημαντικές για την Κρήτη. Η σύγκριση της συσσώρευσης των φυτών αναμένεται να δώσει σημαντικές πληροφορίες στη χρήση μηχανισμών των φυτών για

την ανοχή στα βαριά μέταλλα και να αποκαλύψει τη συμμετοχή του μεταβολισμού του αζώτου στο φαινόμενο.

1.1 Γενικά ρυπαντές - Απορρύπανση

Ο πιο συνηθισμένος τρόπος εισροής ρύπων στο έδαφος είναι από τις υπόγειες δεξαμενές αποθήκευσης υγρών καυσίμων, διασταλάγματα από ΧΥΤΑ, τεχνητές λίμνες διάθεσης αποβλήτων, ατυχήματα κ.α.

Πάνω από 1600 οργανικές ενώσεις (φυσικές ή ανθρωπογενείς) έχουν διαπιστωθεί ότι βρίσκονται σε φυσικές ή ρυπασμένες περιοχές. Η χημική δομή ενός ρυπαντή είναι πολύ σημαντική διότι καθορίζει τη «βιο-αποδομησιμότητα» του.

Η βιοαποικοδομητικότητα και ο βαθμός ευκολίας έχουν προσδιοριστεί για μια μεγάλη σειρά οργανικών ενώσεων. Στις οργανικές ενώσεις που ακολουθούν ο βαθμός ευκολίας βιοαποικοδομής ελαττώνονται από τα πάνω προς τα κάτω:

- Απλοί υδρογονάνθρακες με 1 – 15 άτομα άνθρακα C1-C15
- Αλκοόλες, φαινόλες, αμίνες
- Οξέα, εστέρες, αμίδια
- Υδρογονάνθρακες με 12 – 20 άτομα άνθρακα C12-C20
- Αιθέρες, μονοχλωριωμένοι υδρογονάνθρακες
- Πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες
- Πολυχλωριωμένα διφαινύλια
- Φυτοφάρμακα

Κατά την εξέταση και χαρακτηρισμό των ρύπων στο υπέδαφος συνηθίζεται να χρησιμοποιούνται οι συγκεντρωτικοί δείκτες όπως οι κάτωθι:

- Ολικοί Πετρελαϊκοί Υδρογονάνθρακες (Total Petroleum Hydrocarbons)
- Ολικός Οργανικός Άνθρακας (Total Organic Carbon)
- Ολικά Διαλυτά Στερεά (Total Dissolved Solids)
- Βιολογικά Απαιτούμενο Οξυγόνο (BOD₅)
- Χημικά Απαιτούμενο Οξυγόνο (COD)
- Βαριά Μέταλλα (Cu, Cd, Cr, Ni, Pb, Zn, Hg, As, Ag)

Οι βασικές μέθοδοι-τεχνικές βιοαποκατάστασης είναι:

1. Εξαγωγή πτητικών ενώσεων από το έδαφος (Soil Vapour Extraction, SVE) :

Η μεθοδολογία αυτή χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση πτητικών οργανικών ενώσεων (VOCs) από την ακόρεστη ζώνη με κύριο μηχανισμό μεταφοράς μάζας την εξάτμιση και εν συνεχεία μεταφορά (συμεταφορά) των ατμών (αέρια φάση).

2. Βιοαερισμός (Bioventing): Βιοαερισμός είναι η βιολογική απομάκρυνση ρύπων από το υπέδαφος λόγω του αερισμού του εδάφους. Ο βιοαερισμός μπορεί να χρησιμοποιηθεί:

i Για τη μείωση του κόστους επεξεργασίας των πτητικών οργανικών ενώσεων (VOCs) που συλλέγονται με την τεχνική SVE.

ii Για την βιοαποικοδόμηση και ημιπτητικών οργανικών ενώσεων (Semi VOCs) που δεν μπορούν να απομακρυνθούν με την τεχνική του SVE.

3. Τεχνική της άντλησης και επεξεργασίας (Pump and Treat Systems): Το σύστημα αυτό είναι μια τεχνική αποκατάστασης (remediation technology) ρυπασμένων υδροφόρων φορέων ή χωμάτων στην κεκορεσμένη ζώνη από οργανικές ενώσεις. Τα συστήματα άντλησης & επεξεργασίας έχουν χρησιμοποιηθεί κατά κόρον κυρίως στη δεκαετία του 80. Ένα τέτοιο σύστημα σχεδιάζεται με δύο στόχους:

i Ακινητοποίηση της ρυπασμένης ζώνης του υδροφόρου φορέα ώστε να μην υπάρξει περαιτέρω εξάπλωση των ρύπων

ii Απορρύπανση με απομάκρυνση του ρυπασμένου ύδατος από το υπέδαφος και στη συνέχεια επεξεργασία σε κατάλληλες μονάδες στην επιφάνεια.

Και οι δύο παραπάνω στόχοι επιτυγχάνονται με τη χρήση πηγαδιών άντλησης. Η μόνη διαφορά είναι ότι αν έχουμε σα μοναδικό στόχο την ακινητοποίηση (και αύξηση) της ζώνης ρύπανσης, τότε το κόστος είναι πολύ λιγότερο διότι ο αριθμός των απαιτούμενων πηγαδιών άντλησης είναι μικρότερος.

4. Τεχνική του in situ αερισμού: (In Situ Air Sparging): In situ αερισμός είναι μια

τεχνική αποκατάστασης ρυπασμένων υδροφόρων φορέων ή χωμάτων στην κεκορεσμένη ζώνη από πτητικές οργανικές ενώσεις (VOCs) που άρχισε να χρησιμοποιείται από τα μέσα της δεκαετίας του 1980. Οι μηχανισμοί μεταφοράς μάζας κατά τη διάρκεια εφαρμογής του in situ αερισμού εξαρτώνται από την αλληλεπίδραση σύνθετων φυσικών, χημικών και βιολογικών φαινομένων.

Η τεχνική του αερισμού είναι πρακτικά εφαρμόσιμη όταν πτητικές ή βιοαποικοδομήσιμες οργανικές ενώσεις ρυπαίνουν κορεσμένες ζώνες σε σχετικά διαπερατά εδάφη. Ένα κλασικό σύστημα αερισμού έχει ένα ή περισσότερα σημεία έκχυσης αέρα στον υδροφόρο φορέα. Στις πρώτες εφαρμογές της τεχνολογίας αυτής συχνά εθεωρείτο ότι ο αέρας μεταφέρεται εντός της κεκορεσμένης ζώνης υπο μορφή φυσαλίδων (air bubbles). Το πλέον ορθό είναι η μεταφορά αέρα διαμέσου συνεχών καναλιών (continues air channels).

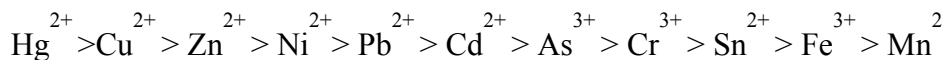
5. **Φυτοεξυγίανση (Phytoremediation):** Είναι ένα είδος τεχνολογίας που χρησιμοποιεί τα φυτά για την εξυγίανση του εδάφους, της επιφάνειας του νερού και των υπόγειων υδάτων που περιέχουν τοξικά μέταλλα και άλλα οργανικά στοιχεία. Αναλυτικότερα παρουσιάζεται παρακάτω.

1.2. Γενικά Χαρακτηριστικά βαρέων μετάλλων

Με τον όρο Βαρέα αναφερόμαστε γενικά στα μέταλλα με ατομικό βάρος μεγαλύτερο από εκείνο του Fe ($AB_{Fe} = 56$) και πυκνότητα μεγαλύτερη από 5 g/cm^3 . Υπάρχουν περίπου 40 στοιχεία (ψευδάργυρος Zn, χαλκός Cu, κάδμιο Cd, υδράργυρος Hg, νικέλιο Ni, μόλυβδος Pb) που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία. Ορισμένα από τα βαρέα μέταλλα, είναι απαραίτητα σε μικρές συγκεντρώσεις για τη δράση των βιταμινών, τις διάφορες ζωτικές λειτουργίες καθώς και για την κανονική αύξηση και ανάπτυξη των φυτών εφόσον αυτά αποτελούν συστατικά πολλών ενζύμων και πρωτεϊνών (για παράδειγμα ο Zn^{2+} χρησιμεύει σαν συνένζυμο για αρκετά ένζυμα). Ωστόσο οι υψηλές συγκεντρώσεις των βαρέων μετάλλων στο έδαφος μπορεί να οδηγήσουν σε τοξικά συμπτώματα και στην αναστολή της αύξησης των περισσότερων φυτών (Hall, 2002).

Τα βαρέα μέταλλα απελευθερώνονται στην ατμόσφαιρα κατά τη διάρκεια της καύσης ορυκτών καυσίμων και ξύλου καθώς και από βιομηχανικές δραστηριότητες και μέσω της αποτέφρωσης απορριμμάτων. Η εκπομπή βαρέων μετάλλων στην ατμόσφαιρα μπορεί να είναι αποτέλεσμα φυσικών εκπομπών, από μεταλλεύματα του γήινου φλοιού, καθώς και από ηφαίστεια, από διάβρωση και από πυρκαγιές δασών. (Allen et al. 2001)

Η σειρά τοξικότητας τους είναι η εξής :



Η τοξικότητα των βαρέων μετάλλων εξαρτάται:

- από τη συγκέντρωση τους
- το είδος του μετάλλου
- την ύπαρξη και συνεργιστική δράση άλλων μετάλλων και
- το είδος του οργανισμού.

Οι κυριότεροι από τους μηχανισμούς τοξικής δράσης των βαρέων μετάλλων είναι:

- Δηλητηρίαση ενζυμικών συστημάτων.

Μέταλλο + ενεργή ομάδα ενζύμου. Σύμπλοκο μετάλλου πρωτεΐνης.

- Ομάδα: αμινο (-NH₂), ιμινο (-NH-), σουλφυδρύλο (-SH).
- Δημιουργία ανιόντων (π.χ. αρσενικά, αντιμονικά, σεληνιακά κ.τ.λ.) που δρουν ως “αντιμεταβλητές” παίρνοντας τη θέση των PO₄⁻³ ή NO₃¹.
- Σχηματισμός ιζημάτων αντιδρώντας με φωσφορικά βιομόρια.
- Ένας μεγάλος αριθμός βαρέων μετάλλων επηρεάζει αρνητικά το φωτοσυνθετικό σύστημα των φυτών αναστέλλοντας τη μεταφορά των ηλεκτρονίων στους χλωροπλάστες.
- Αντιδρούν με τις μεμβράνες των κυττάρων, περιορίζοντας την δραστηριότητα τους (π.χ. τα μέταλλα Cd, Hg, Cu, Pb) έτσι ώστε να παρεμποδίζετε ή να διακόπτετε τελείως η μεταφορά Na, K Cl ᾽ῆ οργανικών μορίων δια μέσω της μεμβράνης.

Τα βαρέα μέταλλα αποτελούν ένα παγκόσμιο περιβαλλοντικό κίνδυνο γιατί σε αντίθεση με ορισμένους οργανικούς ρύπους δεν αποικοδομούνται αλλά καθιζάνουν ως δυσδιάλυτα άλατα ή σύμπλοκα, με αποτέλεσμα να παραμένουν στο περιβάλλον για μεγάλο χρονικό διάστημα και να είναι τοξικά για τον βιόκοσμο. Οι κυριότερες πηγές ρύπανσης από βαρέα μέταλλα είναι φυσικές: (ηφαίστεια, πετρώματα) και ανθρωπογενείς (χημικές ουσίες που χρησιμοποιούνται στη γεωργία π.χ. μερικά γεωργικά φάρμακα και τα φωσφορικά λιπάσματα, καυσαέρια αυτοκινήτων, βιομηχανικά απόβλητα και ιδίως των μεταλλουργείων, χυτηρίων, εργοστασίων κ.τ.λ).

Συνήθως μεταφέρονται μέσω των αστικών λυμάτων και βιομηχανικών καταλοίπων με τα νερά της βροχής ή των ποταμών, ακόμα και σε καλλιεργήσιμα εδάφη όπου παραμένουν για εκατονταετίες μιας και δεν υπάρχει κανένας φυσικός ή βιολογικός τρόπος για την καταστροφή τους. Υψηλή συγκέντρωση βαρέων μετάλλων στην επιφάνεια του εδάφους μπορεί να προκαλέσει διάφορα προβλήματα στα καλλιεργούμενα φυτά, όπως τοξικότητα, αλλά και στον ίδιο τον άνθρωπο που στη συνέχεια θα τραφεί με αυτά. Συγκεκριμένα, ορισμένα όπως ο σίδηρος (Fe) και το τρισθενές χρώμιο (Cr(III)) αποτελούν απαραίτητα ιχνοστοιχεία για τον ανθρώπινο οργανισμό, ενώ άλλα όπως ο υδράργυρος (Hg), το κάδμιο (Cd), ο μόλυβδος (Pb), το νικέλιο (Ni) και το αρσενικό (As) παρουσιάζουν πολύ υψηλή τοξικότητα ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις (Στασινάκης, 2003).

Πίνακας 1. Πυκνότητα και ατομικό βάρος βαρέων μετάλλων (Παπαδάκη Αναστασία, 2003)

Βαρέα μέταλλα		Σύμβολο	Πυκνότητα (d) (g/cm³)	Ατομικό βάρος
Antimony	Αντιμόνιο	Sb	6,6	121,76
Bismuth	Βισμούθιο	Bi	9,8	208,98
Cadmium	Κάδμιο	Cd	8,6	112,41
Chromium	Χρώμιο	Cr	7,2	51,99
Cobalt	Κοβάλτιο	Co	8,9	58,93
Copper	Χαλκός	Cu	9,0	63,54
Gold	Χρυσός	Au	19,3	196,97
Iron	Σίδηρος	Fe	7,9	55,85
Lead	Μόλυβδος	Pb	11,3	207,2
Manganese	Μαγγάνιο	Mn	7,4	54,94
Mercury	Υδράργυρος	Hg	13,6	200,59
Molybdenum	Μολυβδαίνιο	Mo	10,2	95,94
Nickel	Νικέλιο	Ni	8,9	58,69
Osmium	Όσμιο	Os	22,5	190,23
Platinum	Λευκόχρυσος	Pt	21,5	195,09
Selenium	Σελήνιο	Se	7,3	78,96
Silver	Άργυρος	Ag	10,5	107,86
Tin	Κασσίτερος	Sn	7,3	118,71
Tungsten	Βολφραμίμο	W	19,3	183,84
Uranium	Ουράνιο	U	18,7	238,07
Vanadium	Βανάδιο	V	6,1	50,95
Zinc	Ψευδάργυρος	Zn	7,2	65,39
Zirconium	Ζιρκόνιο	Zr	6,5	91,22

1.2.1. Κάδμιο (Cd)

Το κάδμιο (Cd) εκτός από τα ορυκτά του εμφανίζεται ως πρόσμιξη στα ορυκτά του ψευδαργύρου (κοινώς τσίγκος). Χρησιμοποιείται κυρίως στην ηλεκτροαπόθεση, ως σταθεροποιητής στα πλαστικά και στις μπαταρίες νικελίου-καδμίου. Το μέταλλο αυτό ανήκει στις καρκινογόνες ενώσεις και είναι γνωστό ότι έχει αρνητικές επιπτώσεις στα υδατικά οικοσυστήματα και εδάφη. Ρυπαίνει το περιβάλλον κατά την χρήση και καθαρισμό των μεταλλευμάτων του και κατά την τήξη και καθαρισμό του χαλκού και νικελίου. Επίσης υπάρχει στα καυσαέρια των καυσίμων. Η περιβαλλοντική διάχυση και απόθεση του καδμίου εξαρτάται από τις συνθήκες και την χημική σύνθεση του μετάλλου, αλλά συνήθως μεγάλο ποσοστό παραμένει στο έδαφος και στο υδρόβιο περιβάλλον συσσωρεύεται στα ιζήματα αντί στο σώμα των οργανισμών. Η αύξηση των επιπέδων του καδμίου στα εδάφη είναι κυρίως το αποτέλεσμα της εκτεταμένης χρήσης λιπασμάτων που περιέχουν κάδμιο σαν ακαθαρσία, όπως τα φωσφορικά λιπάσματα, οι λάσπες βιολογικών καθαρισμών, τα κομποστοποιημένα αστικά απόβλητα και οι στάχτες από την καύση του άνθρακα.

Το κάδμιο είναι ένα βαρύ τοξικό μέταλλο που απορροφάται εύκολα από τα φυτά και διοχετεύεται εύκολα μέσω της τροφικής αλυσίδας στα νεφρά και το συκώτι του ανθρώπου με αποτέλεσμα να προξενεί σοβαρές βλάβες στην υγεία.

Το μέταλλο έχει την ικανότητα να βιοσυσσωρεύεται σε μικροοργανισμούς και σε ιστούς φυτών και ζώων. Στα υδρόβια μακρόφυτα, παρουσιάζει συντελεστές βιοσυγκέντρωσης, περίπου 50 φορές και στα ψάρια 100 φορές σε σχέση με τις συγκεντρώσεις στα νερά. Παρά το ότι το κάδμιο συσσωρεύεται στους οργανισμούς του γλυκού νερού δεν βιομεγενθύνεται στην τροφική αλυσίδα.

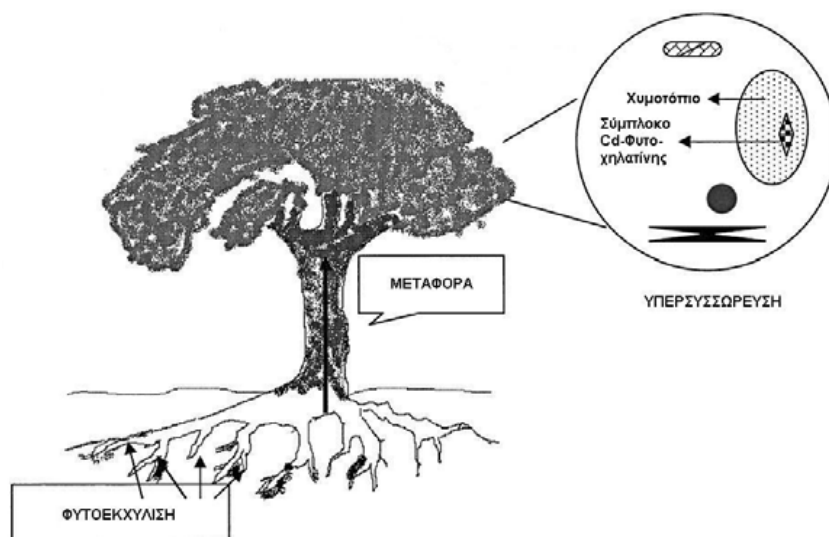
Είναι ένα μη απαραίτητο στοιχείο για τα φυτά, που προκαλεί επίσχεση της ανάπτυξης, αλληλεπιδρά με την απορρόφηση και τη διακίνηση των θρεπτικών στοιχείων, παρεμποδίζει ένζυμα, μειώνει τη φωτοσύνθεση και παράγει ελεύθερες ρίζες (Hernandez et al., 1997 και Gouia et al., 2000).

Το κάδμιο δρα στο φωτοσύστημα II (PSII) τόσο στο οξειδωτικό όσο και στο αναγωγικό μέρος. Επίσης, τα ενεργά κέντρα του PSII καθώς και η μεταφορά των ηλεκτρονίων επηρεάζονται από την αλληλεπίδραση με το Cd που προκαλεί ζημιές στην ενεργότητα των ενζύμων και/ή την δομή των πρωτεϊνών. Μια άλλη έμμεση

επίδραση του προέρχεται από την παρεμπόδιση της βιοσύνθεσης των χλωροφυλλών (Haag-Kerwer et al., 1999).

Μια γενική απόκριση των φυτών στα βαρέα μέταλλα είναι η επαγωγή της σύνθεσης μικρό ή μακρομοριακών ενώσεων που τα δεσμεύουν, συμβάλλοντας στην αποτοξίνωση. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν αμινοξικής φύσης ενώσεις όπως η προλίνη, η ιστιδίνη και οι πολυαμίνες. Στη δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνονται ενώσεις πεπτιδικής φύσης, πλούσιες σε κυστεΐνη (αμινοξύ που περιέχει θείο, S) και γλουταμικό, όπως η γλουταθειόνη, οι φυτοχηλατίνες και οι μεταλλοθειονίνες (Sharma and Dietz, 2006) οι οποίες συμπλοκοποιούν το μέταλλο και με τον τρόπο αυτό παρεμποδίζουν τη δράση του στις ενδοκυττάριας θέσεις αποδέκτες. Η συσσώρευση του καδμίου σε μακρόφυτα (υδρόβια φυτά, ορατά με γυμνό μάτι) ποικίλει ανάλογα με το είδος και τους ιστούς που εξετάζονται. Το κάδμιο συσσωρεύεται κυρίως στις ρίζες των υδρόβιων μακρόφυτων αντί στα φύλλα και τον κορμό.

1.3. Φυτοεξυγίανση (Phytoremediation)



Εικόνα 1. Τα στάδια που εμπλέκονται στην Φυτοεξυγίανση από βαρέα μέταλλα (από Suresh and Ravishankar, 2004)

Τα τελευταία χρόνια έχουν αυξηθεί οι ανθρώπινες δραστηριότητες που επιβαρύνουν το περιβάλλον με βαρέα μέταλλα. Για αυτό το λόγο είναι απαραίτητη η χρήση τεχνολογιών και μεθόδων για την εξυγίανση περιοχών, οι οποίες είναι

μολυσμένες με τοξικά μέταλλα. Οι στρατηγικές της βιοεξυγίανσης έχουν προταθεί σαν ελκυστικές και εναλλακτικές, λόγω του χαμηλού κόστους τους και της υψηλής αποδοτικότητας τους.

Η Φυτοεξυγίανση είναι μία τεχνολογία που βασίζεται στη χρήση φυτών για την εξυγίανση μολυσμένων εδαφών, επιφανειακών και υπόγειων υδάτων η οποία εκμεταλλεύεται τη φυσική ιδιότητα πολλών φυτικών ειδών να απορροφούν, να συσσωρεύουν και σε μερικές περιπτώσεις να μεταβολίζουν συστατικά του εδάφους και του νερού. Μερικά φυτά έχουν την ικανότητα να συσσωρεύουν σε μεγάλες συγκεντρώσεις ακόμη και μέταλλα που δεν τους είναι χρήσιμα για την ανάπτυξη τους.

Είναι γνωστό ήδη από τις αρχές του 20ου αιώνα ότι περί τα 200 είδη που ανήκουν σε 45 οικογένειες όχι μόνο αντέχουν, αλλά συσσωρεύουν και τεράστιες ποσότητες βαρέων μετάλλων στα υπέργεια μέρη τους, τα λεγόμενα φυτά υπερσυσσωρευτές. Κλασικό παράδειγμα είναι το *Thlaspi caerulescens* (*Brassicaceae*), που συσσωρεύει Cd και Zn στους βλαστούς του (έως 40 mg Zn όταν 500 μg θεωρούνται τοξικά).

Η ιδέα της φυτοεξυγίανσης, με τη χρήση φυτών υπερσυσσωρευτών μετάλλων, για τον καθαρισμό χερσαίων και υδάτινων οικοσυστημάτων που έχουν ρυπανθεί, αναπτύχθηκε μόλις την τελευταία 25ετία. Επειδή όμως οι περισσότεροι υπερσυσσωρευτές είναι μικρά φυτά και βραδείας ανάπτυξης, η δυνατότητα ευρείας χρήσης τους δυσχεραίνεται. Γι' αυτό έχει ενταθεί η μελέτη των βιοχημικών, φυσιολογικών και μοριακών μηχανισμών αντοχής, με απώτερο σκοπό τη μεταφορά γονιδίων αντοχής σε φυτά που παράγουν μεγαλύτερη βιομάζα.

Η χρήση της μεθόδου ενδείκνυται ιδιαίτερα σε περιπτώσεις ρύπανσης του εδάφους και του νερού με βαρέα μέταλλα και ραδιενεργά στοιχεία αλλά και με οργανικές ενώσεις, όπως χλωριωμένους διαλύτες, πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες, πολυχλωριωμένα διφαινύλια, εκρηκτικές ουσίες, απορρυπαντικά, θρεπτικά συστατικά (π.χ. φωσφορικά, νιτρικά), που προκαλούν ευτροφισμό επιφανειακών υδάτων.

Αυτή η τεχνολογία χρησιμοποιεί την καλλιέργεια φυτών για την εξυγίανση μολυσμένων εδαφών, επιφανειακών και υπογείων υδάτων. Εφαρμόζεται κυρίως σε περιπτώσεις, όπου η ρύπανση είναι:

- ευρείας έκτασης (σε επιφάνεια)
- βρίσκεται στα ανώτερα στρώματα του εδάφους (μέχρι 1 m βάθος) ή του υδροφόρου ορίζοντα (μέχρι 3 m βάθος) και
- έχει σχετικά χαμηλή περιεκτικότητα ρυπαντών, έτσι ώστε η εκσκαφή του μολυσμένου εδάφους ή η άντληση του μολυσμένου νερού και η ακόλουθη επεξεργασία τους να καθίσταται αντιοικονομική.

Η επιτυχία της εξαρτάται κυρίως από τους παρακάτω παράγοντες :

- Επιλογή του κατάλληλου φυτικού είδους. Τα φυτά αυτά πρέπει να είναι ανθεκτικά στις τοξικές συγκεντρώσεις των βαρέων μετάλλων, να παράγουν μεγάλη βιομάζα και να έχουν την ικανότητα να απορροφούν και να μεταφέρουν τα μέταλλα από το ριζικό σύστημα στην υπέργεια βιομάζα.
- Η διαθεσιμότητα των μετάλλων. Τα μέταλλα είναι απαραίτητα να βρίσκονται σε μη υπολειμματική μορφή, έτσι ώστε να είναι δυνατή η απορρόφηση τους από τη ρίζα και η μεταφορά τους στο βλαστό. Για να αυξηθεί η διαθεσιμότητα των μετάλλων και κατά συνέπεια η πρόσληψη τους από τα φυτά, έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως σε μελέτες χημικοί παράγοντες (EDTA, κιτρικό οξύ, μαλικό οξύ και νιτρώδες αμμώνιο).

1.3.2. Τεχνικές της φυτοεξυγίανσης

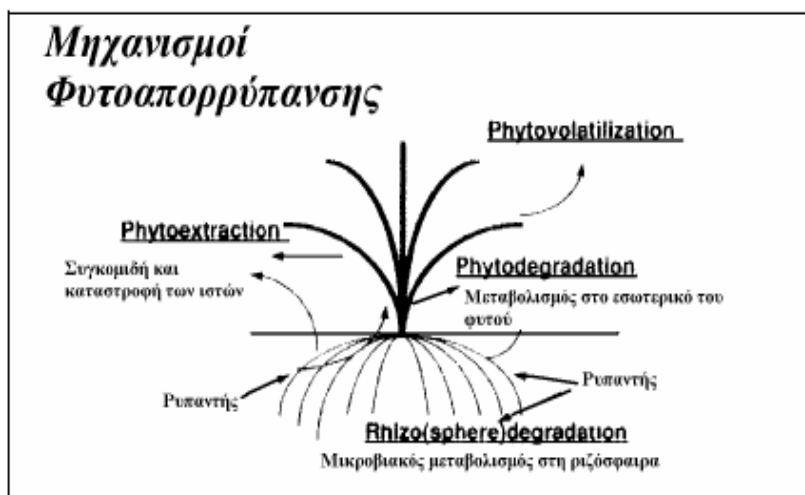
Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται στην τεχνολογία της Φυτοεξυγίανσης γενικά μπορούν να διακριθούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες:

1. Φυτοαπορρύπανση (Phytodecontamination)
2. Φυτοσταθεροποίηση (Phytostabilization)

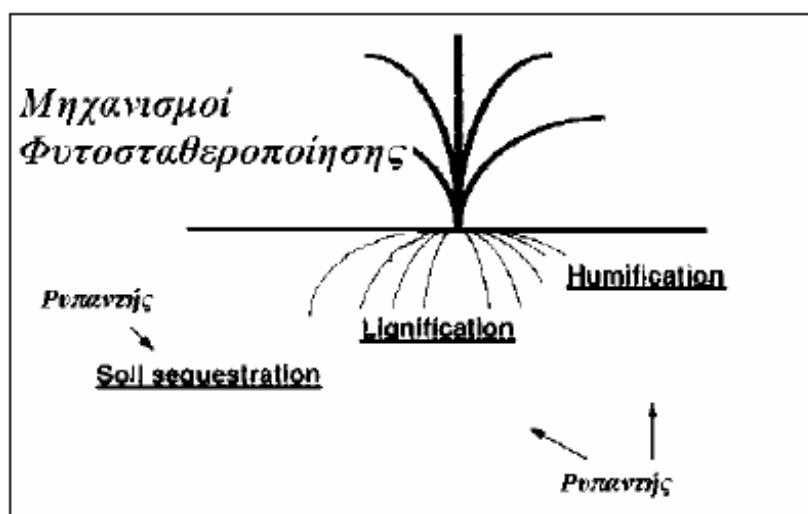
Η φυτοαπορρύπανση, περιλαμβάνει μηχανισμούς, με τη βοήθεια των οποίων, η συγκέντρωση του ρυπαντή στο έδαφος, το νερό και την ατμόσφαιρα μειώνεται σε αποδεκτά επίπεδα. Στο Σχήμα 1 παρουσιάζονται οι μηχανισμοί που είναι δυνατόν να εφαρμοστούν κατά τη διαδικασία της φυτοαπορρύπανσης.

Η φυτοσταθεροποίηση, (Βλέπε Σχήμα 2), περιλαμβάνει μηχανισμούς οι οποίοι έχουν ως στόχο την αδρανοποίηση και απομόνωση του ρυπαντή ώστε να παρεμποδιστεί η μετανάστευση του (migration) από το έδαφος στο υπόγειο νερό ή στην ατμόσφαιρα. Η φυτοσταθεροποίηση βασίζεται στην ικανότητα των φυτών να εκκρίνουν ουσίες , μέσο των ριζών τους, οι οποίες ευνοούν μηχανισμούς όπως η

χουμοποίηση (humification) - δέσμευση του ρυπαντή στα χουμικά συστατικά του εδάφους, η λιγνιτοποίηση (lignification) -δέσμευση στα κυτταρικά τοιχώματα των ριζών και δέσμευση στα εδαφικά σωματίδια (soil sequestration)).



Σχήμα 1. Μηχανισμοί που εμπλέκονται στην διαδικασία της φυτοαπορρύπανσης. (Raskin et al., 1998)

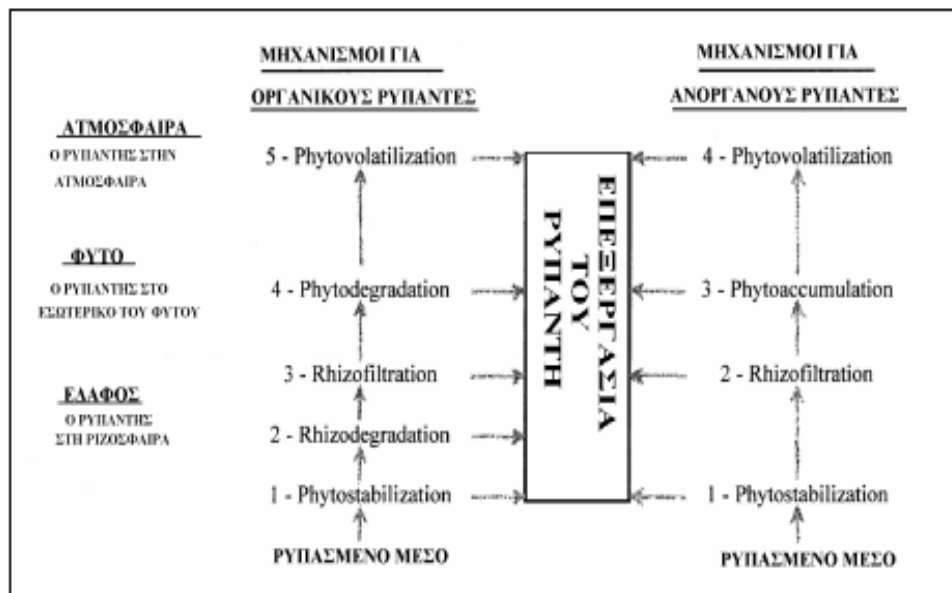


Σχήμα 2. Μηχανισμοί που εμπλέκονται στην διαδικασία της φυτοσταθεροποίησης. (Raskin et al., 1998).

Μια άλλη κατάταξη της τεχνολογίας της φυτοεξυγίανσης πραγματοποιείται ανάλογα με τους ρυπαντές στόχους:

- Φυτοεξυγίανση Οργανικών ρυπαντών
- Φυτοεξυγίανση Ανόργανων ρυπαντών

Στο Σχήμα 3, παρουσιάζονται οι μηχανισμοί εξυγίανσης για οργανικούς και ανόργανους ρυπαντές στο σύστημα έδαφος-φυτό-ατμόσφαιρα.



Σχήμα 3. Μηχανισμοί εξυγίανσης στο σύστημα έδαφος- φυτό- ατμόσφαιρα (Raskin et al., 1998).

Σύμφωνα με την υπηρεσία προστασίας του περιβάλλοντος των Η.Π.Α, αλλά και των (Suresh and Ravishankar, 2004) οι ορισμοί για τους διάφορους μηχανισμούς της Φυτοεξυγίανσης έχουν ως εξής :

Φυτοεξαγωγή-Phytoextraction

Η φυτοεξαγωγή (ή φυτοεκχύλιση ή φυτοσυσσώρευση-phytoaccumulation), αναφέρεται στη πρόσληψη μετάλλων και τη μεταφορά τους στα υπέργεια τμήματα του φυτού. Η τεχνική αυτή εφαρμόζεται σε περιπτώσεις ρυπασμένων εδαφών με βαρέα μέταλλα. Στηρίζεται στη χρησιμοποίηση φυτών τα οποία έχουν την ικανότητα να συσσωρεύουν υψηλές συγκεντρώσεις μετάλλων στη βιομάζα τους, ως και 100 φορές περισσότερο σε σχέση με άλλα φυτά (18).

Φυτοδιάσπαση -Phytodegradation

Η φυτοδιάσπαση (ή φυτομετατροπή ή φυτομετασχηματισμός-phytotransformation), περιλαμβάνει διαδικασίες οι οποίες οδηγούν στη

διάσπαση/αποδόμηση του ρυπαντή. Η διάσπαση του ρυπαντή είναι δυνατόν να πραγματοποιείται είτε εντός του φυτού, μέσο μεταβολικών διεργασιών είτε εξωτερικά στην περιοχή της ρίζας μέσο της παραγωγής ενζύμων. Μετά την διάσπαση του ρυπαντή, πραγματοποιείται η ενσωμάτωση του στους φυτικούς ιστούς. Σε μερικές περιπτώσεις τα τελικά προϊόντα της διάσπασης, ελευθερώνονται στο περιβάλλον, γεγονός που εξαρτάται από το είδος του φυτού και τον ρυπαντή (βλπ. Φυτοεξαέρωση) Ο μηχανισμός της φυτοδιάσπασης χρησιμοποιείται σε ρυπασμένα εδάφη, επιφανειακά και υπόγεια ύδατα. Στην περίπτωση των υπόγειων υδάτων, θα πρέπει το ριζικό σύστημα του φυτού να βρίσκεται σε επαφή με τον υδροφόρο, διαφορετικά είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί άντληση και τοποθέτηση του νερού σε δεξαμενές στις οποίες υπάρχουν κατάλληλα φυτικά είδη.

Φυτοεξαέρωση –Phytovolatilization

Κατά τη φυτοεξαέρωση, μέταλλα και οργανικές ουσίες, οι οποίες προσλαμβάνονται από τα φυτά, μετατρέπονται σε πτητικές μορφές και ελευθερώνονται στην ατμόσφαιρα. Μέσο αυτού του μηχανισμού επιτυγχάνεται η εξυγίανση ρυπασμένων εδαφών και υπόγειων υδάτων χωρίς να είναι απαραίτητη η συγκομιδή του φυτικού υλικού.

Ριζοδιάσπαση-Rhizodegradation

Η ριζοδιάσπαση (ή φυτοδιέγερση-phytostimulation, ή βιοεξυγίανση μέσο της ριζόσφαιρας-rhizosphere biodegradation), αναφέρεται στην διάσπαση οργανικών ρυπαντών στο έδαφος, μέσω μικροβιακών πληθυσμών που αναπτύσσονται στην περιοχή του ριζικού συστήματος (ριζόσφαιρα). Οι μικροοργανισμοί (μύκητες, βακτήρια), διασπών ή μετασχηματίζουν οργανικές ουσίες και τις χρησιμοποιούν ως θρεπτικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη τους. Η παρουσία των φυτών ευνοεί τη διαδικασία της εξυγίανσης δεδομένου ότι μέσω των ριζών εκκρίνονται ουσίες και μεταφέρεται οξυγόνο και νερό, στοιχεία απαραίτητα για τη μικροβιακή ανάπτυξη.

Ριζοδιήθηση-Rhizofiltration

Η ριζοδιήθηση (ή ριζοδιλυση-rhyzoextraction) περιλαμβάνει τη ρόφηση στις φυτικές ρίζες ρυπαντών οι οποίοι βρίσκονται σε υδατικά διαλύματα. Τα φυτά

αναπτύσσονται σε θερμοκήπια με τη μέθοδο της υδροπονίας, δηλαδή οι ρίζες τους βρίσκονται εντός υδατικού διαλύματος αντί του εδάφους.

Φυτοσταθεροποίηση-phytostabilization

Περιλαμβάνει τη συσσώρευση και την κατακρήμνιση των μετάλλων και χρησιμοποιείται για να μειώσει την κινητικότητα των μετάλλων στο έδαφος έτσι ώστε να αποφευχθεί η μόλυνση του υδροφόρου ορίζοντα ή η είσοδος τους στην τροφική αλυσίδα.

Συγκομιδή, επεξεργασία και διάθεση των φυτών

Μετά τη φυτοεξυγίανση των μολυσμένων περιοχών τα φυτά πρέπει να κοπούν και το φυτικό τους σύστημα να ξεριζωθεί. Η επεξεργασία, που θα ακολουθεί στη συνέχεια εξαρτάται από την τοξικότητα των βιοσυσσωρευμένων ουσιών. Η πιο συνηθισμένη επεξεργασία είναι η θερμική αποδόμηση ή η ελεγχόμενη αποτέφρωση, ιδιαίτερα στην περίπτωση των βαρέων μετάλλων. Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται η συγκέντρωση των βαρέων μετάλλων στην παραγόμενη στάχτη, η οποία καταλαμβάνει πολύ μικρό όγκο. Στην περίπτωση της συσσώρευσης ραδιενεργών στοιχείων από τα φυτά είναι απαραίτητη η διάθεσή τους μαζί με άλλα ραδιενεργά απόβλητα σε ειδικά σχεδιασμένους χώρους υγειονομικής ταφής.

Οι τεχνολογίες φυτοεξυγίανσης έχουν αρχίσει να αναγνωρίζονται ως οικονομικώς αποδοτικές μέθοδοι για την εξυγίανση περιοχών μολυσμένων με τοξικά μέταλλα, με μικρότερο κόστος των συμβατικών τεχνολογιών, όπως οι στρατηγικές εδαφολογικής αντικατάστασης και σταθεροποίησης.

Λόγοι που ευνοούν την εφαρμογή της Φυτοεξυγίανσης είναι μεταξύ άλλων (Shannon and Uterman, 1993):

- Η επέκταση της επιστημονικής γνώσης σχετικά με το μεταβολισμό επικίνδυνων ρυπαντών και ιδιαίτερα των οργανικών ενώσεων.
- Η εύρεση νέων φυτικών ειδών που έχουν τη δυνατότητα να παρουσιάζουν ανθεκτικότητα σε διάφορους ρυπαντές.
- Η χρησιμοποίηση της γενετικής μηχανικής στη δημιουργία νέων μεταβολικών δυνατοτήτων για τα είδη χρησιμοποιούμενα φυτά.

Τα **πλεονεκτήματα** που προσφέρει η φυτοεξυγίανση είναι τα εξής:

- Καθαρίζει τα επιβαρημένα από τα βαρέα μέταλλα εδάφη.
- Η βιομάζα ανακυκλώνεται εύκολα και τα βαρέα μέταλλα εκχειλίζονται εύκολα.
- Μειώνεται το κόστος όσον αφορά την απομάκρυνση των μολυσμένων εδαφών.
- Μείωση της υδάτινης μόλυνσης από τα απορριπτόμενα μολυσμένα εδάφη.
- Μειώνει τις συγκεντρώσεις των βαρέων μετάλλων στον αέρα.

Η φυτοεξυγίανση έχει και ορισμένα **μειονεκτήματα** (Salt, 1998)

- Στα μειονεκτήματα συγκαταλέγονται οι ιδιαίτερα αργοί ρυθμοί φυτοεξυγίανσης, οι οποίοι συμπεριλαμβάνουν μερικές συνεχόμενες περιόδους καλλιέργειας των φυτών μέχρι να εξυγιανθεί τελείως το περιβάλλον από τους ρυπαντές.
- Η φυτοεξυγίανση φέρνει μόνο αποτελέσματα, όταν το βάθος της μόλυνσης δε ξεπερνά το 1m στο έδαφος και τα 3m στον υδροφόρο ορίζοντα.
- Μειονεκτήματα αποτελεί η δυνατότητα να μεταδοθούν οι τοξικές ουσίες στην τροφική αλυσίδα μετά από πιθανή βρώση των φυτών από ζώα.
- Οι κλιματικές ή οι υδρολογικές συνθήκες στην μολυσμένη περιοχή μπορεί να μην επιτρέπουν την καλλιέργεια και ανάπτυξη των κατάλληλων για την φυτοεξυγίανση φυτών.

1.3.2. Σχεδιασμός συστημάτων φυτοεξυγίανσης

Ο σχεδιασμός των συστημάτων της Φυτοεξυγίανσης ποικίλει ανάλογα με το είδος του ρυπαντή και το επιθυμητό επίπεδο μείωσης της συγκέντρωσης του, τις επικρατούσες περιβαλλοντικές συνθήκες και από τα φυτά που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν. Για την εφαρμογή της τεχνολογίας της Φυτοεξυγίανσης αποτελεί κοινή πρακτική η πραγματοποίηση προκαταρκτικών εργαστηριακών ερευνών. Στόχος των ερευνών αυτών είναι να αποφασιστεί ή όχι η χρήση των βιολογικών διαδικασιών της Φυτοεξυγίανσης απατώντας σε ερωτήσεις σχετικά με την βιοαποικοδόμηση των ρυπαντών, το ποσοστό βιοδιαθεσιμότητας τους στο έδαφος και το υπόγειο νερό και τέλος τον καθορισμό των βέλτιστων συνθηκών για την ανάπτυξη των φυτών. Γενικά,

οι παράμετροι σχεδιασμού διαφέρουν ανάλογα με την τεχνική που χρησιμοποιείται. Παρ' όλα αυτά είναι δυνατόν να προσδιοριστούν ορισμένοι παράμετροι σχεδιασμού, οι οποίοι είναι κοινοί σε όλες τις περιπτώσεις εφαρμογής της τεχνολογίας της Φυτοεξυγίανσης.

Οι παράμετροι αυτοί περιλαμβάνουν:

1.Προσδιορισμό του επιπέδου της ρύπανσης

Κατά το σχεδιασμό του συστήματος Φυτοεξυγίανσης, πρέπει να προσδιοριστεί το είδος και η συγκέντρωση των ρυπαντών καθώς και το βάθος στο οποίο εκτείνεται η ρύπανση. Στην περίπτωση οργανικών ρυπαντών θα πρέπει να υπάρχουν στοιχεία για τη δομή τους, τη λιποφιλικότητα τους ($\log K_{ow}$) καθώς και για τις ιδιότητες προσρόφησης τους.

2.Επιλογή του φυτικού υλικού

Τα φυτά τα οποία πρόκειται να χρησιμοποιηθούν επιλέγονται με βάση τον επιθυμητό μηχανισμό Φυτοεξυγίανσης και το είδος του ρυπαντή. Στην περίπτωση του φυτομετασχηματισμού οργανικών ρυπαντών και της φυτοεξαγωγής βαρέων μετάλλων τα φυτά πρέπει να παρουσιάζουν γρήγορο ρυθμό ανάπτυξης, υψηλούς ρυθμούς εξατμισοδιαπνοής αρκετά βαθύ ριζικό σύστημα για την περίπτωση υπογείων υδάτων και να μετατρέπουν το ρυπαντή σε μη τοξικά παράγωγα.

3.Έλεγχος της δυνατότητας χρησιμοποίησης των επιλεγμένων φυτών (Treatability tests)

Στο στάδιο αυτό πραγματοποιείται έλεγχος της τοξικότητας των ρυπαντών καθώς και προϊόντων που προκύπτουν από την εφαρμογή της Φυτοεξυγίανσης. Σε εργαστηριακά πειράματα εφαρμόζονται διαφορετικές συγκεντρώσεις του ρυπαντή στα προτεινόμενα φυτικά είδη και μελετώνται τα παραγόμενα προϊόντα του μεταβολισμού.

4.Συντήρηση του συστήματος της Φυτοεξυγίανσης

Η συντήρηση του συστήματος της Φυτοεξυγίανσης περιλαμβάνει την άρδευση των φυτών, προσθήκη κατάλληλων λιπασμάτων για τη γρήγορη ανάπτυξη τους και σε ορισμένες περιπτώσεις την αντιμετώπιση βιολογικών εχθρών των φυτών.

5. Συγκομιδή του φυτικού υλικού

Όταν τα φυτά συσσωρεύσουν τον ρυπαντή πρέπει να πραγματοποιηθεί η συγκομιδή και η απομάκρυνση τους από την περιοχή. Η περαιτέρω επεξεργασία του φυτικού υλικού εξαρτάται από τη φύση των παραγόμενων προϊόντων μεταβολισμού καθώς και από την συγκέντρωσή τους στα φυτικά κύτταρα. Στην περίπτωση οργανικών ρυπαντών που διασπώνται σε μη τοξικές ουσίες δεν είναι απαραίτητη η περαιτέρω επεξεργασία του φυτικού υλικού. Στην περίπτωση που πραγματοποιείται σημαντική συσσώρευση στην περιοχή της ρίζας, τότε είναι απαραίτητη η περαιτέρω επεξεργασία των φυτικών ιστών. Η πιο συνηθισμένη διαδικασία επεξεργασίας του φυτικού υλικού είναι η ελεγχόμενη καύση (controlled incineration). Άλλες μέθοδοι που εφαρμόζονται είναι η κομποστοποίηση (composting) καθώς και διάθεση σε χωματερές (landfilling).

1.3.3. Συμπεράσματα – Βελτίωση της Αποτελεσματικότητας της Μεθόδου

Από τα παραπάνω γίνεται φανερό ότι τα φυτά διαθέτουν το γενετικό δυναμικό για την απομάκρυνση βαρέων μετάλλων από ρυπασμένες περιοχές με την τεχνική της φυτοεξυγίανσης. Βέβαια, η σχετικά μικρή βιομάζα και η αργή ανάπτυξη των περισσότερων υπερσυσσωρευτών αποτελούν τους κύριους αρνητικούς παράγοντες για την αποτελεσματική φυτοεξυγίανση εδαφών από βαρέα μέταλλα και περιορίζουν την χρησιμοποίηση αγρονομικών πρακτικών, όπως τη μηχανική συλλογή των φυτών.

Για την αντιμετώπιση αυτών των προβλημάτων έχουν γίνει προσπάθειες μεταφοράς της ικανότητας υπερσυσσώρευσης μετάλλων από φυτά υπερσυσσωρευτές σε ταχέως αναπτυσσόμενα, υψηλής βιομάζας φυτικά είδη, με τη χρήση της κλασσικής βελτίωσης φυτών. Δυστυχώς όμως, η κλασσική βελτίωση δεν έχει δώσει σημαντικά αποτελέσματα λόγω της φυλετικής ασυμβατότητας που οφείλεται σε ανατομικές διαφορές μεταξύ των ειδών.

Εναλλακτικά, η βιοτεχνολογία με τη γενετική τροποποίηση φυτών παρέχει τη δυνατότητα για άμεση μεταφορά των υπεύθυνων γονιδίων, ξεπερνώντας έτσι το πρόβλημα της ασυμβατότητας μεταξύ των ειδών. Τα ερευνητικά αποτελέσματα στον τομέα αυτό φανερώνουν ότι είναι δυνατή η δημιουργία γενετικά τροποποιημένων φυτών με αυξημένη ικανότητα βιοσυσσώρευσης.

Σε πλήθος πειραμάτων έχουν μελετηθεί οι μηχανισμοί πρόσληψης και συσσώρευσης των βαρέων μετάλλων από τα φυτά και επίσης έχουν απομονωθεί γονίδια υπεύθυνα για τη βιοσυσσώρευση. Η περαιτέρω κατανόηση των φυσιολογικών και μοριακών μηχανισμών πρόσληψης και συσσώρευσης αποτελούν σήμερα θέματα αιχμής στην έρευνα της βιολογίας φυτών διεθνώς και αποσκοπούν τελικά στη δημιουργία αποτελεσματικών υπερσυσσωρευτών.

1.3.4. Φυτοεκχύλιση

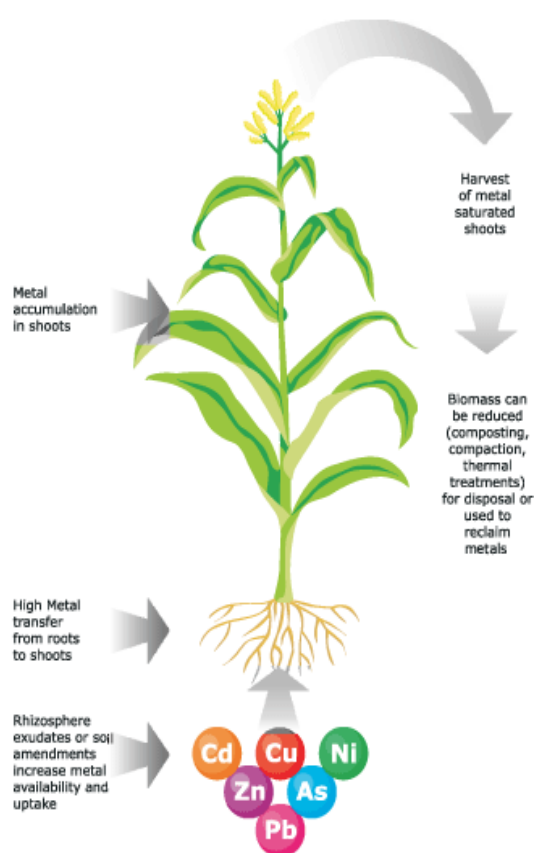


Figure 1 - Schematic representation of the processes involved in phytoextraction of metals from soils.

Φυτοεκχύλιση όπως προαναφέραμε είναι η πρόσληψη ρυπαντών από τις φυτικές ρίζες και η μετακίνησή τους στο υπέργειο μέρος των φυτών. Η απομάκρυνση των ρυπαντών από τη θέση της μόλυνσης γίνεται με τη συγκομιδή των φυτών. Η συγκομιζόμενη βιομάζα μπορεί να μειωθεί κατά όγκο ή κατά βάρος, με θερμικά, μικροβιολογικά, φυσικά ή χημικά μέσα. Η ανάκτηση μερικών μετάλλων όπως των Ni, Zn και Cu μπορεί να δώσει και ένα επιπλέον έσοδο. Η τεχνική αυτή εφαρμόζεται κυρίως σε περιπτώσεις εδαφών και αποβλήτων που έχουν μολυνθεί από βαρέα μέταλλα και ραδιενεργά υλικά. Μετά από ένα πρόγραμμα φυτοεκχύλισης, το έδαφος παραμένει

γόνιμο και κατάλληλο για περαιτέρω καλλιέργεια.

Η φυτοεκχύλιση βαρέων μετάλλων μπορεί να επιτευχθεί με δύο προσεγγίσεις:

Εικόνα 2. Μέθοδος της φυτοεκχύλισης

Φυσική φυτοεκχύλιση: Χρησιμοποιούνται φυτά τα οποία έχουν την ικανότητα να συσσωρεύουν μεγάλες ποσότητες βαρέων μετάλλων στους βλαστούς και τα φύλλα

τους. Τυπικά, τα φυτά αυτά είναι μικρά, με μικρό ριζικό σύστημα και σχετικά αργή ανάπτυξη. Τα επιλεγμένα φυτά φυτεύονται ή μεταφυτεύονται στο ρυπασμένο έδαφος και αναπτύσσονται υπό κανονικές καλλιεργητικές συνθήκες. Μετά την πλήρη ανάπτυξη, τα υπέργεια μέρη των φυτών συλλέγονται και απομακρύνονται.

Επαγόμενη φυτοεκχύλιση: Περιλαμβάνει την επιλογή και καλλιέργεια φυτών με γρήγορη ανάπτυξη στις μολυσμένες περιοχές. Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των φυτών προστίθενται στο έδαφος χηλικές ενώσεις (π.χ. EDTA) προκειμένου να αυξήσουν τη διαθεσιμότητα των μετάλλων στα φυτά. Όταν τα φυτά ωριμάσουν, χρησιμοποιούνται χημικοί παράγοντες επαγωγής για να κατευθύνουν τη συσσώρευση των μετάλλων στο υπέργειο μέρος των φυτών. Τα φυτά τότε συλλέγονται και απομακρύνονται.

Περιοριστικοί παράγοντες της φυτοεκχύλισης

Όπως προαναφέρθηκε, πολλά φυτικά είδη συσσωρεύουν σημαντικές ποσότητες τοξικών μετάλλων στους ιστούς τους και μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε προγράμματα βιοεξυγίανσης ρυπασμένων περιοχών. Παρόλα αυτά, υπάρχουν παράγοντες που περιορίζουν την επιτυχία και την εφαρμοσιμότητα της τεχνολογίας αυτής.

Τέτοιοι περιοριστικοί παράγοντες είναι:

1. Η μικρή βιομάζα και η αργή ανάπτυξη των υπερσυσσωρευτών.
2. Η περιορισμένη ανθεκτικότητα πολλών φυτών στους ρύπους.
3. Η ανάγκη καλλιέργειας πολλών διαφορετικών ειδών για την αντιμετώπιση των ρύπων.
4. Η μειωμένη μετακίνηση σε αρκετά φυτικά είδη των μετάλλων από τη ρίζα στο βλαστό.
5. Το πρόβλημα της εναπόθεσης των ρυπασμένων φυτών μετά τη συγκομιδή τους.
6. Ο κίνδυνος μεταφοράς των τοξικών μετάλλων στην τροφική αλυσίδα μετά από βρώση των φυτών.

1.3.5. Φυτά Υπερσυσσωρευτές (Hyperaccumulators plants)

Τα φυτά που επιλέγονται να χρησιμοποιηθούν στην τεχνική της φυτοεξυγίανσης ονομάζονται υπερσυσσωρευτές και μπορούν να χαρακτηρισθούν έτσι εάν έχουν την ικανότητα να παράγουν μεγάλη βιομάζα και η συσσώρευση του μετάλλου να κυμαίνεται μεταξύ 1-3% περιεκτικότητα σε μέταλλο / ξηρό βάρος (Cunningham et al., 1996).

Από διάφορες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί έχουν αναγνωριστεί ήδη κάποια φυτά υπερσυσσωρευτές, που όχι μόνο παρουσιάζουν μεγάλη ανθεκτικότητα σε τοξικές συγκεντρώσεις συγκεκριμένων βαρέων μετάλλων, αλλά έχουν και την ικανότητα να προσλαμβάνουν και να δεσμεύουν στα διάφορα φυτικά τους μέρη (και ειδικά στο ριζικό τους σύστημα) αυτά τα στοιχεία.

Πολλά λοιπόν από αυτά τα φυτικά είδη έχουν την ικανότητα να συσσωρεύουν σημαντικές ποσότητες μετάλλων, σε επίπεδα 100 φορές μεγαλύτερες από εκείνες που ανιχνεύονται στους ιστούς των κοινών φυτών. Όπως είναι φυσικό τα φυτικά αυτά είδη παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τη χρησιμοποίησή τους σε προγράμματα φυτοεξυγίανσης. Μέχρι σήμερα έχουν προσδιοριστεί περισσότερα από 400 φυτικά είδη, που ανήκουν σε τουλάχιστον 45 οικογένειες φυτών, εκ των οποίων κάποια χρησιμοποιούνται ήδη σε προγράμματα φυτοεξυγίανσης.

Τα φυτά υπερσυσσωρευτές έχουν αναπτύξει διάφορους φυσιολογικούς μηχανισμούς ώστε να μπορέσουν να επιβιώσουν σε εδάφη πλούσια σε τέτοια τοξικά στοιχεία. Τέτοιοι μηχανισμοί είναι η επιλεκτική πρόσληψη μετάλλων, η απέκκριση, η συγκράτηση μόνο των ωφέλιμων για τον μεταβολισμό ιόντων και η απομόνωση των βλαβερών σε κενά διαστήματα μέσα στα κύτταρα (Kneer and Zenk, 1992).

Ένας υπερσυσσωρευτής μπορεί να συγκεντρώνει περισσότερα από 10 ppm υδραργύρου (Hg), 100 ppm καδμίου (Cd), 1000 ppm κοβαλτίου (Co), χρωμίου (Cr), χαλκού (Cu) και μόλυβδου (Pb), 10.000 ppm ψευδαργύρου (Zn) και νικελίου (Ni).

Τα περισσότερα από τα γνωστά φυτά υπερσυσσωρευτές συσσωρεύουν Ni, Co, Cu και Zn, και λιγότερα έχουν βρεθεί να συσσωρεύουν τα υπόλοιπα βαρέα μέταλλα. Επίσης πρόσφατα βρέθηκε ότι η φτέρη *Pteris vitatta* συσσωρεύει στους υπέργειους ιστούς της έως και 14.500 ppm αρσενικού (As), χωρίς να εμφανίζει συμπτώματα τοξικότητας.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα φυτικά είδη που εκδηλώνουν ικανότητα πρόσληψης και αφομοίωσης συγκεκριμένων στοιχείων κατά την ανάπτυξη τους σε επιβαρημένα εδάφη.

Πίνακας 2. Χρησιμοποιούμενοι υπερσυσσωρευτές διαφόρων βαρέων μετάλλων.

ΜΕΤΑΛΛΟ	ΦΥΤΙΚΟ ΕΙΔΟΣ
Cd	<i>Thlaspi caerulescens</i>
Cu	<i>Ipomoea alpina</i>
Co	<i>Haumaniastrum robertii</i>
Pb	<i>Thlaspi rotundifolium</i> , <i>Brassica juncea</i>
Zn	<i>Thlaspi caerulescens</i>
Ni	<i>Psychotria douarrei</i> , <i>Sebertia acuminata</i>
Mn	<i>Macademia neurophylla</i>

Ο πιο γνωστός υπερσυσσωρευτής είναι το *Thlaspi caerulescens*. Ενώ τα περισσότερα φυτά εμφανίζουν συμπτώματα τοξικότητας σε συγκεντρώσεις Zn περίπου 100 ppm, το *Thlaspi caerulescens* μπορεί να συσσωρεύει έως και 26.000 ppm χωρίς κανένα σύμπτωμα. Εκτός από Zn, έχει την ικανότητα να συσσωρεύει και μεγάλες ποσότητες Cd.



Εικόνα 3. Φυτά υπερσυσσωρευτές *Thlaspi caerulescens*, *Brassica juncea*

Επίσης, το *Brassica juncea* (ινδική μουστάρδα) συσσωρεύει σημαντικές ποσότητες μόλυβδου και χρησιμοποιείται ευρέως σε προγράμματα φυτοεξυγίανσης. Άλλα φυτικά είδη που έχουν χρησιμοποιηθεί είναι η λεύκα, το τριφύλλι, ο ηλίανθος, το καλάμι, το άλυσσο και η τσουκνίδα. Οι λεύκες έχουν αποδειχθεί πολύ αποτελεσματικές στην προσρόφηση και συσσώρευση αρσενικού και καδμίου. Οι ηλίανθοι έχουν χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν για την εξυγίανση επιφανειακών υδάτων κοντά στο Τσερνόμπιλ κυρίως από ραδιενεργό στρόντιο και καίσιο.

1.3.6. Πρόσληψη μετάλλων από τα φυτά

Τα φυτά για να αναπτυχθούν χρειάζονται τα απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία (μακρό-μικροστοιχεία) και διαθέτουν ειδικούς μηχανισμούς πρόσληψης, μεταφοράς και αποθήκευσης καθενός από τα στοιχεία αυτά.

Τα βαρέα μέταλλα Zn, Mn, Ni και Cu είναι απαραίτητα μικροστοιχεία για τα φυτά. Τα κοινά φυτά προσλαμβάνουν και συσσωρεύουν μικρές ποσότητες αυτών των μικροστοιχείων (< 10 ppm), που δεν ξεπερνούν τις μεταβολικές τους ανάγκες. Αντίθετα, ένας υπερσυσσωρευτής μπορεί να προσλάβει πολύ μεγαλύτερες ποσότητες (χιλιάδες ppm). Είναι γεγονός ότι η διαδικασία αυτή είναι ενεργοβόρα και επομένως εύλογα τίθεται το ερώτημα πιο είναι το εξελικτικό πλεονέκτημα των φυτών αυτών. Πρόσφατες μελέτες έχουν συσχετίσει την συσσώρευση βαρέων μετάλλων στα φύλλα των φυτών με την ανθεκτικότητά τους σε εχθρούς και ασθένειες (έντομα, μύκητες και βακτήρια).

Επίσης, οι υπερσυσσωρευτές προσλαμβάνουν όχι μόνο τα απαραίτητα μικροστοιχεία, αλλά και άλλα μη απαραίτητα μέταλλα, όπως το Cd. Στις περιπτώσεις αυτές, φαίνεται ότι τα μη απαραίτητα μέταλλα προσλαμβάνονται και μεταφέρονται στο φυτό με τους μηχανισμούς πρόσληψης και μεταφοράς άλλων απαραίτητων μικροστοιχείων (π.χ. το Cd με το μηχανισμό του Zn).

Η πρόσληψη των μετάλλων από τα φυτά υπερσυσσωρευτές εξαρτάται από τους παρακάτω παράγοντες:

- Τύπος και συγκέντρωση του μετάλλου.
- Τύπος και είδος του φυτού.
- Ηλικία του φυτού.

- Ρυθμός και συνθήκες ανάπτυξης.
- Τύπος του εδάφους, καθώς φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά του, όπως περιεκτικότητα σε οργανική ουσία και pH.

1.3.7. Μηχανισμοί ανθεκτικότητας των φυτών στα βαρέα μέταλλα

Οι μηχανισμοί ανθεκτικότητας των φυτών στα βαρέα μέταλλα, που έχουν προσδιοριστεί μέχρι σήμερα, είναι:

- Ο έλεγχος στο επίπεδο της πλασματικής μεμβράνης
- Η διαδικασία της χήλωσης και
- Η διαμερισματοποίηση στο χυμοτόπιο

1. Έλεγχος στην πλασματική μεμβράνη

Η πλασματική μεμβράνη των φυτών μπορεί να θεωρηθεί σαν την πρώτη ενεργή δομή η οποία είναι στόχος της τοξικότητας των βαρέων μετάλλων. Η λειτουργία της πλασματικής μεμβράνης ίσως επηρεάζεται ταχύτατα από τα βαρέα μέταλλα, όπως δείχνει η αυξημένη διαρροή από τα κύτταρα παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων βαρέων μετάλλων, ιδιαιτέρως του Cu. Για παράδειγμα, αποδείχθηκε ότι ο Cu αλλά όχι ο Zn προκαλούσε αύξηση της εκροής του K από αποκομμένες ρίζες του *Agrostis capillaris*. Ομοίως άλλοι συμπέραναν ότι η ζημιά στην κυτταρική μεμβράνη, που αντιλαμβανόμαστε από εκροή ιόντων, ήταν η άμεση αιτία τοξικότητας Cu σε ρίζες του *Silene vulgaris*, *Mimulus guttatus* και σιταριού. Τέτοια ζημιά μπορεί να προκληθεί με διάφορους μηχανισμούς στη μεμβράνη, όπως με την οξείδωση των σουλφυδρυλομάδων των κυστεϊνών των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, την παρεμπόδιση ενζύμων κλειδιών της μεμβράνης (ATPάσες, αντλίες ιόντων) ή την αλλαγή στη σύσταση και ρευστότητα των λιπιδίων της, που επιδρούν άμεσα στη διαπερατότητά της (Hall, 2002).

Έτσι, η ανθεκτικότητα μπορεί να περιλαμβάνει την προστασία της ακεραιότητας της πλασματικής μεμβράνης από την ζημιά των βαρέων μετάλλων. Ένας άλλος παράγοντας που μπορεί να περιληφθεί στη διατήρηση της ακεραιότητας της πλασματικής μεμβράνης παρουσία βαρέων μετάλλων, είναι η αυξημένη επιδιόρθωση των μεμβρανών μετά τη ζημιά με την εμπλοκή των πρωτεϊνών που

επάγονται από θερμική καταπόνηση ή των μεταλλοθειονίνων (πρωτεϊνών που δεσμεύουν μέταλλα και αναλύονται εκτενώς παρακάτω).

Εκτός της ανθεκτικότητας η μεμβράνη ίσως παίζει σημαντικό ρόλο στην ομοιόσταση των μετάλλων, είτε εμποδίζοντας ή μειώνοντας την είσοδό τους στο κύτταρο ή μέσω μηχανισμών εκροής. Αρκετά από αυτά τα κατιόντα είναι απαραίτητα και έτσι ο πλήρης αποκλεισμός τους δεν είναι δυνατός. Η επιλεκτική εκροή θεωρείται περισσότερο ρεαλιστική. Στα βακτήρια τα περισσότερα συστήματα ανθεκτικότητας βασίζονται στην εξαρτώμενη από ενέργεια εκροή των τοξικών ιόντων. Φαίνεται πως η μεταβολική ποινή του να έχει περισσότερο εξειδικευμένους μηχανισμούς πρόσληψης, και έτσι να περιορίζει την είσοδο των τοξικών ιόντων, είναι μεγαλύτερη από το να έχει συστήματα εκροής.

2. Χήλωση

Χήλωση είναι η αντίδραση δημιουργίας συμπλόκου ενός μετάλλου με οργανική ουσία (χηλική ένωση). Η χημική ενεργότητα και η περιορισμένη διαλυτότητα των περισσότερων μεταλλικών ιόντων, απαιτεί σταθερή χήλωση από τη στιγμή που θα βρεθούν μέσα στο κύτταρο. Χηλικές ενώσεις δεσμεύουν τα μεταλλικά ιόντα ενδοκυτταρικά, συνεισφέροντας στη αποτοξίνωση του κυττάρου και ρυθμίζοντας τη συγκέντρωση των μετάλλων στο κυτταρόπλασμα. Στα φυτά οι κυριότερες κατηγορίες των χηλικών ενώσεων των μετάλλων περιλαμβάνουν οργανικά οξέα και αμινοξέα, καθώς και πρωτεϊνικής φύσης μόρια (τις φυτοχηλατίνες και τις μεταλλοθειονίνες) (Clemens, 2001).

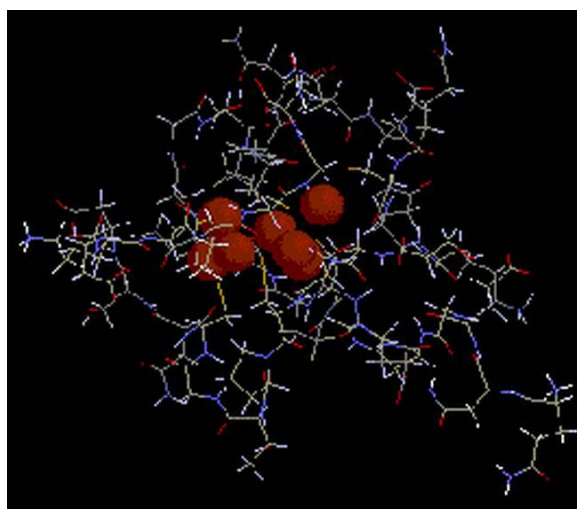
Φυτοχηλατίνες (Phytochelatins)

Οι φυτοχηλατίνες είναι μια ομάδα πρωτεϊνών οι οποίες επάγονται στα φυτά όταν αυτά έλθουν αντιμέτωπα με καταπόνηση από βαρέα μέταλλα. Δρουν δεσμεύοντας τα ελεύθερα μεταλλικά ιόντα στο μόριό τους και τα μεταφέρουν στο χυμοτόπιο όπου δεν είναι πλέον τοξικά και απ' όπου τελικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν από το φυτό για την ανάπτυξη του, αν το μέταλλο αυτό είναι απαραίτητο στοιχείο. Για να γίνει κατανοητός ο ρόλος των φυτοχηλατίνων στην αποτοξίνωση των βαρέων μετάλλων, πρέπει να κατανοηθούν τα χαρακτηριστικά τους

όπως η δομή, η βιοσύνθεση, η λειτουργία, καθώς και η δομή του συμπλόκου φυτοχηλατίνης-μετάλλου.

Στη δομή των φυτοχηλατινών συμμετέχουν τρία αμινοξέα: γλουταμικό, κυστεΐνη και γλυκίνη. Η γενική δομή τους είναι η εξής $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ ($n=2-11$). Τα μεταλλικά ιόντα δεσμεύονται από τις σουλφυδρυλικές ομάδες των κυστεϊνών. Οι φυτοχηλατίνες έχουν αναγνωριστεί σε αρκετές ομάδες φυτών και φωτοσυνθετικών οργανισμών, από τα γυμνόσπερμα και τα μονοκοτυλήδωνα έως τα δικοτυλήδωνα. Η βιοσύνθεση των φυτοχηλατινών καταλύεται από το ένζυμο συνθάση της φυτοχηλατίνης που χρησιμοποιεί σαν υπόστρωμα γλουταθειόνη (GSH). Τα βαρέα μέταλλα όχι μόνο επάγουν την έκφραση της συνθάσης της φυτοχηλατίνης αλλά και ενεργοποιούν το ένζυμο (Clemens, 2001).

Αρκετές φυσιολογικές, βιοχημικές και γενετικές μελέτες έχουν επιβεβαιώσει ότι η GSH είναι το υπόστρωμα για τη βιοσύνθεση της φυτοχηλατίνης. Μερικές μελέτες έχουν χρησιμοποιήσει ποικιλία φυτικών ειδών, μερικές φορές σαν άθικτα φυτά αλλά συχνά σε μορφή *in vitro* καλλιέργειας κυττάρων. Προηγούμενες μελέτες με καλλιέργεια κυττάρων έχουν αποδείξει ότι η επαγωγή της φυτοχηλατίνης παρουσία καδμίου συμπίπτει με μία παροδική μείωση των επιπέδων της GSH (Cobbett, 2002).



Εικόνα 4. Τρισδιάστατη δομή του συμπλόκου φυτοχηλατίνης-μετάλλου.

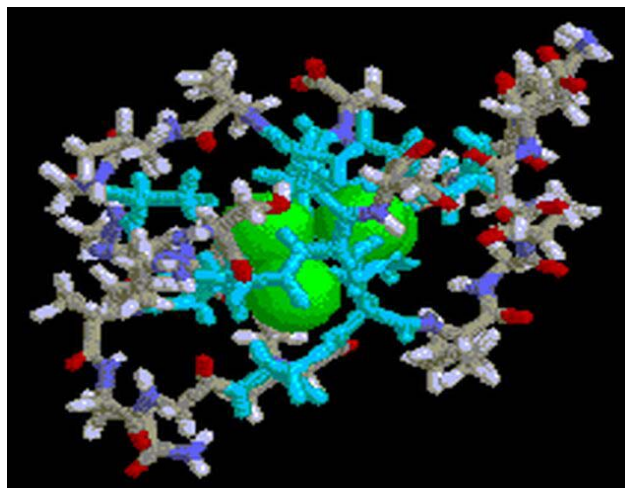
Εκτός της αποτοξίνωσης οι φυτοχηλατίνες παίζουν σημαντικό ρόλο και στην ομοιόσταση των βαρέων μετάλλων στα φυτά, ρυθμίζοντας τη διαθεσιμότητα τους. Τα μεταλλικά ιόντα όπως ο Cu και ο Zn πρέπει να εισέλθουν στα κύτταρα για να γίνουν μέρος των καταλυτικών πρωτεϊνών. Οι φυτοχηλατίνες επομένως έχουν διπλό ρόλο. Από τη μία μεριά, πρέπει να συγκρατήσουν τα μεταλλικά ιόντα πολύ σφικτά να τα αδρανοποιήσουν και να τα αποθηκεύσουν στο χυμοτόπιο. Από την άλλη μεριά, πρέπει να μεταφέρουν τα απαραίτητα μέταλλα σε καινούργια συντιθέμενα αποένζυμα που απαιτούν Cu ή Zn (Zenk, 1996).

Τα βαρέα μέταλλα μεταφέρονται με πρόσδεση σε μικρού βάρους ουσίες, όπως τις φυτοχηλατίνες, οι οποίες είναι μικρά πλούσια σε θείο πολυπεπτίδια. Οι φυτοχηλατίνες είναι ασυνήθιστα πεπτίδια με γενικό τύπο (γ-γλουταμικό οξύ- κυστίνη)_n – γλυκίνη, όπου n=2-8. Η ασυνήθιστη δομή τους οφείλεται στο γεγονός, ότι το πεπτίδιο συνδέεται μεταξύ γλουταμίνης και κυστίνης χρησιμοποιώντας γ καρβοξυλομάδα της γλουταμίνης (την καρβοξυλομάδα της πλευρικής αλυσίδας), και όχι το α-καρβοξύλιο, χαρακτηριστικό των πρωτεϊνών. Ο δεσμός αυτός υποδεικνύει, ότι οι φυτοχηλατίνες δεν συνθέτονται στα ριβοσώματα αλλά είναι προϊόν κάποιων βιοσυνθετικών μονοπατιών. Η αδυναμία σύνθεσης φυτοχηλατίνης, που επιτελείται με μια μη ενζυμική οδό και με πρόδρομη ένωση γλουταθειόνη, οδηγεί σε νέκρωση του φυτού. Οι φυτοχηλατίνες συμπλέκονται στο κυτταρόπλασμα με τα μέταλλα και πιθανόν τα μεταφέρουν για αποθήκευση στο χυμοτόπιο, όπου τα παραδίνουν για πρόσδεση σε οργανικά οξέα, ενώ το αποπεπτιδικό τμήμα τους ελευθερώνεται και πάλι στον συμπλάστη, για να προσδέσει και να μεταφέρει πρόσθετα μέταλλα. Σημαντικές ποσότητες φυτοχηλατινών βρέθηκαν όταν οι συγκεντρώσεις των βαρέων μετάλλων ήταν σε τοξικά επίπεδα (Cobbett, 2000 και Sharma and Dietz, 2006).

Μεταλλοθειονίνες (Metallothioneins)

Οι μεταλλοθειονίνες είναι πρωτεΐνες παρόμοιες με τις φυτοχηλατίνες σε αρκετά σημεία, συμπεριλαμβανομένου του υψηλού αριθμού υπολειμμάτων κυστεΐνης στο μόριό τους και του γεγονότος ότι και οι δύο είναι απαραίτητες για την αποτοξίνωση των βαρέων μετάλλων. Όλες οι μεταλλοθειονίνες έχουν τρία κοινά χαρακτηριστικά: α) χαμηλό μοριακό βάρος (6-7 kDa), β) ένα μεγάλο ποσοστό υπολειμμάτων

κυστεΐνης και γ) υψηλή περιεκτικότητα σε μέταλλα που βρίσκονται δεσμευμένα από τις σουλφυδρυλικές ομάδες των κυστεϊνών (Εικ. 3). Οι μεταλλοθειονίνες κατατάσσονται σε δύο κλάσεις, η πρώτη περιλαμβάνει τις μεταλλοθειονίνες των θηλαστικών και η δεύτερη όλες τις άλλες μεταλλοθειονίνες (Mejare and Bulow, 2001).



Εικόνα 5. Τρισδιάστατη δομή του συμπλόκου μεταλλοθειονίνης-μετάλλων.

Οι μεταλλοθειονίνες της δεύτερης κλάσης, που έχουν ταυτοποιηθεί στα φυτά, μπορούν να ταξινομηθούν περαιτέρω βάσει της ακολουθίας των αμινοξέων. Ο Robinson ήταν ο πρώτος που αναγνώρισε δυο τύπους φυτικών μεταλλοθειονίνων βασισμένες στη θέση των υπολειμμάτων κυστεΐνης σε προβλέψιμες πρωτεΐνες. Από τότε, ο αριθμός των χαρακτηρισμένων φυτικών μεταλλοθειονίνων έχει αυξηθεί δραματικά και αρκετές δεν συμπίπτουν με τους δύο τύπους. Ο Robinson κατασκεύασε ένα σύστημα το οποίο διαχωρίζει όλες τις γνωστές φυτικές μεταλλοθειονίνες σε τέσσερις κατηγορίες ανάλογα με την αλληλουχία των αμινοξέων (Cobbett, 2002).

Οι μεταλλοθειονίνες του τύπου 1 περιέχουν ένα ολοκληρωμένο μοτίβο από έξι Cys-Xaa-Cys (όπου το Xaa εκπροσωπεί ένα άλλο αμινοξύ) τα οποία είναι καταναμημένα εξίσου, μεταξύ δύο περιοχών. Στην πλειονότητα των μεταλλοθειονίνων του τύπου 1, οι δύο περιοχές χωρίζονται από περίπου σαράντα αμινοξέα, συμπεριλαμβανομένου αρωματικών οξέων. Αυτό το μεγάλο διάστημα είναι ένα κοινό χαρακτηριστικό των μεταλλοθειονίνων των φυτών και αντιτίθενται με τις περισσότερες από τις μεταλλοθειονίνες, στις οποίες οι πλούσιες περιοχές σε κυστεΐνη

χωρίζονται από ένα διάστημα από λιγότερο από δέκα αμινοξέα, όπου δεν συμπεριλαμβάνονται αρωματικά υπολείμματα. Εν' τω μεταξύ οι μεταλλοθειονίνες του τύπου 1, αυτές από ποικίλα είδη της οικογένειας *Brassicaceae* (είδη των *Arabidopsis* και *Brassica*) έχουν ένα μεγάλο αριθμό διακριτών χαρακτηριστικών, συμπεριλαμβανομένου ενός πολύ μικρότερου διαστήματος μεταξύ των περιοχών που είναι πλούσιες σε κυστεΐνη και ένα επιπροσθέτως υπόλειμμα Cys (Cobbett, 2002)

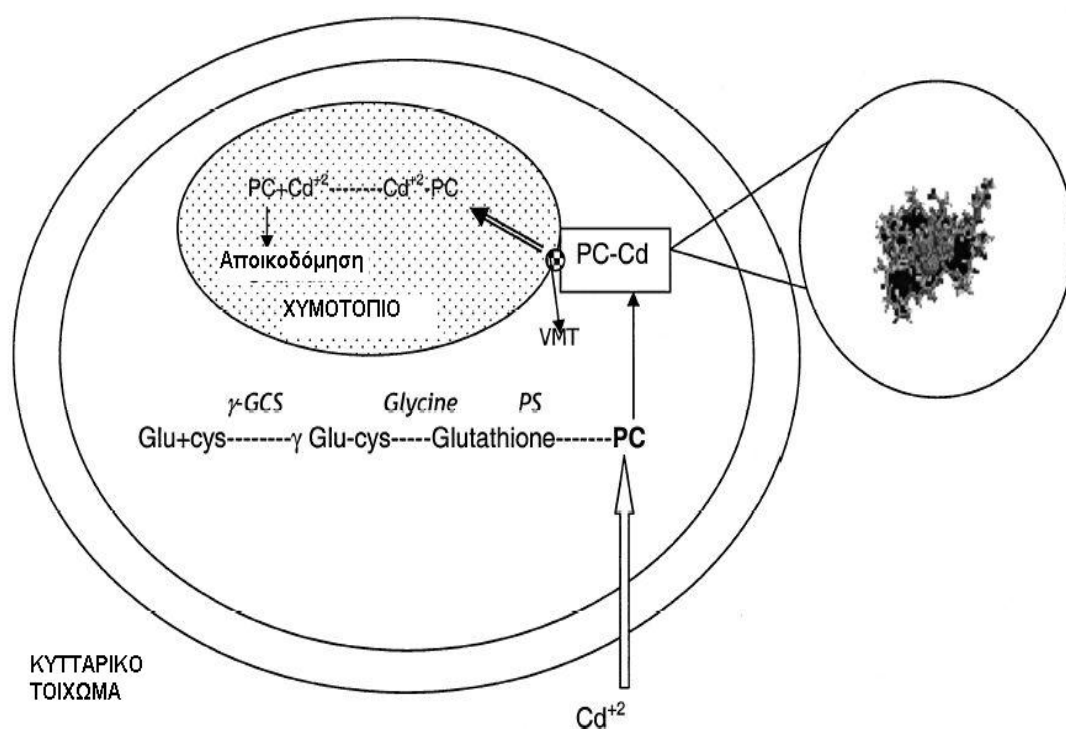
Οι μεταλλοθειονίνες του τύπου 2 περιέχουν επίσης δύο περιοχές πλούσιες σε κυστεΐνη που χωρίζονται από ένα διάστημα από περίπου σαράντα υπολείμματα αμινοξέων. Ωστόσο, το πρώτο ζεύγος κυστεϊνών παρουσιάζεται σαν ένα μοτίβο Cys-Cys αμινοξέος στις θέσεις 3 και 4 αυτών των πρωτεϊνών. Ένα μοτίβο Cys-Gly-Gly-Cys παρουσιάζεται στο τέλος του αμινοτελικού άκρου στην πλούσια σε κυστεΐνη περιοχή. Γενικά η ακολουθία της περιοχής του αμινοτελικού άκρου των μεταλλοθειονίνων του τύπου 2 είναι υψηλά συντηρημένη. Η περιοχή του C-τελικού περιέχει τρία μοτίβα Cys-Xaa-Cys. Το διάστημα που χωρίζει αυτές τις περιοχές στις μεταλλοθειονίνες του τύπου 2 είναι μεταβλητό μεταξύ των ειδών (Cobbett, 2002).

Οι μεταλλοθειονίνες του τύπου 3 περιέχουν μόνο τέσσερα υπολείμματα κυστεΐνης στην περιοχή του αμινοτελικού άκρου. Η συναινετική αλληλουχία για τα πρώτα τρία είναι Cys-Gly-Asn-Cys-Asp-Cys. Η τέταρτη κυστεΐνη δεν είναι μέρος ενός ζεύγους κυστεϊνών αλλά περιέχεται με ένα υψηλά συντηρημένο μοτίβο, Gln-Cys-Xaa-Lys-Lys-Gly. Τα έξι υπολείμματα κυστεΐνης στο C-τελικό άκρο της πλούσιας σε κυστεΐνη περιοχής arranged στο μοτίβο Cys-Xaa-Cys. Εξίσου καλά, στην πλειονότητα των τύπου 1 και 2 των μεταλλοθειονίνων των φυτών, οι δύο περιοχές χωρίζονται η μία από την άλλη από περίπου σαράντα υπολείμματα αμινοξέων (Cobbett, 2002)

Ο τύπος 4 διαφέρει από τις άλλες μεταλλοθειονίνες των φυτών γιατί έχει τρεις περιοχές πλούσιες σε κυστεΐνη, κάθε περιοχή περιέχει 5 με 6 συντηρημένα υπολείμματα κυστεΐνης, τα οποία χωρίζονται από 10 έως 15 υπολείμματα. Οι περισσότερες κυστεΐνες παρουσιάζονται σαν το μοτίβο Cys-Xaa-Cys. Επίσης ένας μεγάλος αριθμός των μεταλλοθειονίνων του τύπου 4 δεν έχει αναγνωριστεί, συγκριτικά με αυτές των μονοκοτυλήδων οι τύπου 4 μεταλλοθειονίνες από τα δικοτυλήδωνα περιέχουν επιπροσθέτως 8 με 10 αμινοξέα στην αμινοτελική περιοχή πριν από το πρώτο υπόλειμμα κυστεΐνης (Cobbett, 2002).

3. Διαμερισματοποίηση στο χυμοτόπιο

Η εκροή των μεταλλικών ιόντων στην πλασματική μεμβράνη ή η μεταφορά τους στο χυμοτόπιο είναι δύο τρόποι για να μειώσουν τα ενδογενή επίπεδα των τοξικών μετάλλων στο κυτταρόπλασμα και έτσι είναι σημαντικοί μηχανισμοί για την ανθεκτικότητα στα βαρέα μέταλλα. Ένα καλά τεκμηριωμένο παράδειγμα είναι η συσσώρευση Cd και φυτοχηλατινών στο χυμοτόπιο που πραγματοποιείται από ειδικές πρωτεΐνες μεταφορείς με την κατανάλωση ενέργειας (Hall, 2002).



Εικόνα 6. Το κάδμιο ενεργοποιεί την Συνθάση της φυτοχηλατίνης η οποία μετατρέπει τη γλουταθειόνη σε φυτοχηλατίνη. Στη συνέχεια τα μόρια των φυτοχηλατινών σχηματίζουν σύμπλοκα με τα ιόντα του καδμίου δεσμεύοντάς τα και τα οδηγούν στο χυμοτόπιο (από Suresh and Ravishankar, 2004).

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι το χυμοτόπιο είναι η θέση για τη συσσώρευση και άλλων βαρέων μετάλλων, συμπεριλαμβανομένου του Zn και του Ni. Άλλες μελέτες σε φύλλα κριθαριού έδειξαν ότι αν και το Cd, ο Zn και το Mo βρέθηκαν κυρίως μέσα στο χυμοτόπιο, το Ni βρέθηκε κυρίως στο κυτταρόπλασμα. Η ανάλυση των συστημάτων μεταφοράς του τονοπλάστη υποδεικνύει την ύπαρξη μηχανισμού ανθεκτικότητας σε επίπεδο χυμοτοπίου.

1.4. Αντίδραση των φυτών στα Βαρέα Μέταλλα

Η υψηλή συγκέντρωση βαρέων μετάλλων και γενικότερα οι περιβαλλοντικές καταπονήσεις προκαλούν μοριακές, βιοχημικές, φυσιολογικές και μορφολογικές αντιδράσεις των φυτών. Οι μεταβολές τις οποίες προκαλούν οι καταπονήσεις στη γονιδιακή έκφραση προξενούν αλλαγές στη συμπεριφορά πολλών ενζύμων, στην αύξηση ή τη μείωση των αντίστοιχων μεταβολικών προϊόντων και μεταβολές στη σύνθεση νέων πρωτεϊνών και πολυπεπτιδίων. Έχει αποδειχθεί η επαγωγή σύνθεσης πρωτεϊνών (πρωτεϊνών καταπόνησης, stress ή shock proteins) από αλατότητα, οσμωτική καταπόνηση, θερμοπληξία, παγετό, ανοξία (αναεροβίωση), μηχανική καταπόνηση, ατμοσφαιρική ρύπανση, υπεριώδη ακτινοβολία, οξειδωτική καταπόνηση και βαρέα μέταλλα.

Μερικές από τις πρωτεΐνες είναι χαρακτηριστικές για ένα συγκεκριμένο είδος καταπόνησης, π.χ. οι φυτοχηλατίνες για καταπόνηση από βαρέα μέταλλα, ή είναι κοινές για περισσότερες τις μιας καταπονήσεις, π.χ. η ωσμωτίνη και οι LEA (Late Embryogenesis Abundant) πρωτεΐνες για καταπόνηση από ψύχος, ξηρασία, αλατότητα, ενώ επιπλέον απαντούν και σε φυσιολογικά κύτταρα μετά από επίδραση αμπισσικού οξέος (ABA). Αρκετές από τις πρωτεΐνες αυτές έχουν ταυτοποιηθεί, όπως π.χ. τα πολυπεπτίδια που επάγονται από αναεροβίωση και έχουν εξειδικευμένες λειτουργίες (ένζυμα γλυκόλυσης, ζυμώσεων), οι θερμοπληξιακές πρωτεΐνες (μοριακοί συνοδοί) ή συντιθέμενες *de novo* από αλατότητα πρωτεΐνες LEA (δραστηριοποιούνται ως κυτταροπλασματικοί ωσμωλύτες). Οι περισσότερες, όμως, αν και ενδεχομένως προστατεύουν από τις αρνητικές συνέπειες μιας καταπόνησης, αποδομούνται αμέσως μετά. Ο ακριβής φυσιολογικός ρόλος τους, ο οποίος προσδίδει ανθεκτικότητα, δεν έχει διευκρινιστεί για τις περισσότερες από αυτές.

Μερικές από τις μεταβολές είναι αναμενόμενες και η ερμηνεία τους προφανής, όπως συμβαίνει για παράδειγμα σε βλαστούς φυτών που υπόκεινται σε καταπονήσεις αλατότητας και ξηρασίας, όπου η συγκέντρωση των ολικών πρωτεϊνών ελαττώνεται εξαιτίας μειωμένης σύνθεσης, αλλά και αυξημένης πρωτεόλυσής τους. Αντιθέτως, κατά την εκβλάστηση σπόρων στις ίδιες καταπονήσεις, η ποσότητα των πρωτεϊνών αυξάνεται, όχι λόγω αυξημένης σύνθεσης, αλλά λόγω μειωμένης πρωτεόλυσής τους. Η γενική αντίληψη είναι, πάντως, ότι οι αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες και η παρουσία βαρέων μετάλλων έχουν αρνητική επίδραση σε όλο τον πρωτεϊνικό

μεταβολισμό, στα μορφολογικά χαρακτηριστικά και τα φυσιολογικά χαρακτηριστικά όπως ο μηχανισμός της φωτοσύνθεσης, ο επαγωγικός φθορισμός κ.α.

Έχουν αναφερθεί παραπάνω τα φυτά υπερσυσσωρευτές, που έχουν την ικανότητα να συγκεντρώνουν μεγάλες ποσότητες βαρέων μετάλλων στους βλαστούς και τα φύλλα τους, με αποτέλεσμα να τροποποιείται η γονιδιακή τους έκφραση από το ίδιο το μέταλλο.

Μέχρι σήμερα έχει μελετηθεί σε σχετικά λίγες περιπτώσεις η επίδραση της συγκέντρωσης των βαρέων μετάλλων στα επίπεδα πρωτεϊνών, όπως η γλουταμική αφυδρογονάση (GDH), ένζυμο που φαίνεται να επηρεάζεται από διάφορες συνθήκες καταπόνησης, της γλουταμινικής συνθετάσης (GS) και της Fd- ή NADH-γλουταμικής συνθάσης (GOGAT), αλλά και η επίδραση τους στον μηχανισμό της φωτοσύνθεσης.

Παρακάτω παρουσιάζονται συνοπτικά τα χαρακτηριστικά αυτών των πρωτεϊνών καθώς και οι επιδράσεις των βαρέων μετάλλων στο μηχανισμό της φωτοσύνθεσης.

1.4.1 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 mM. 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).

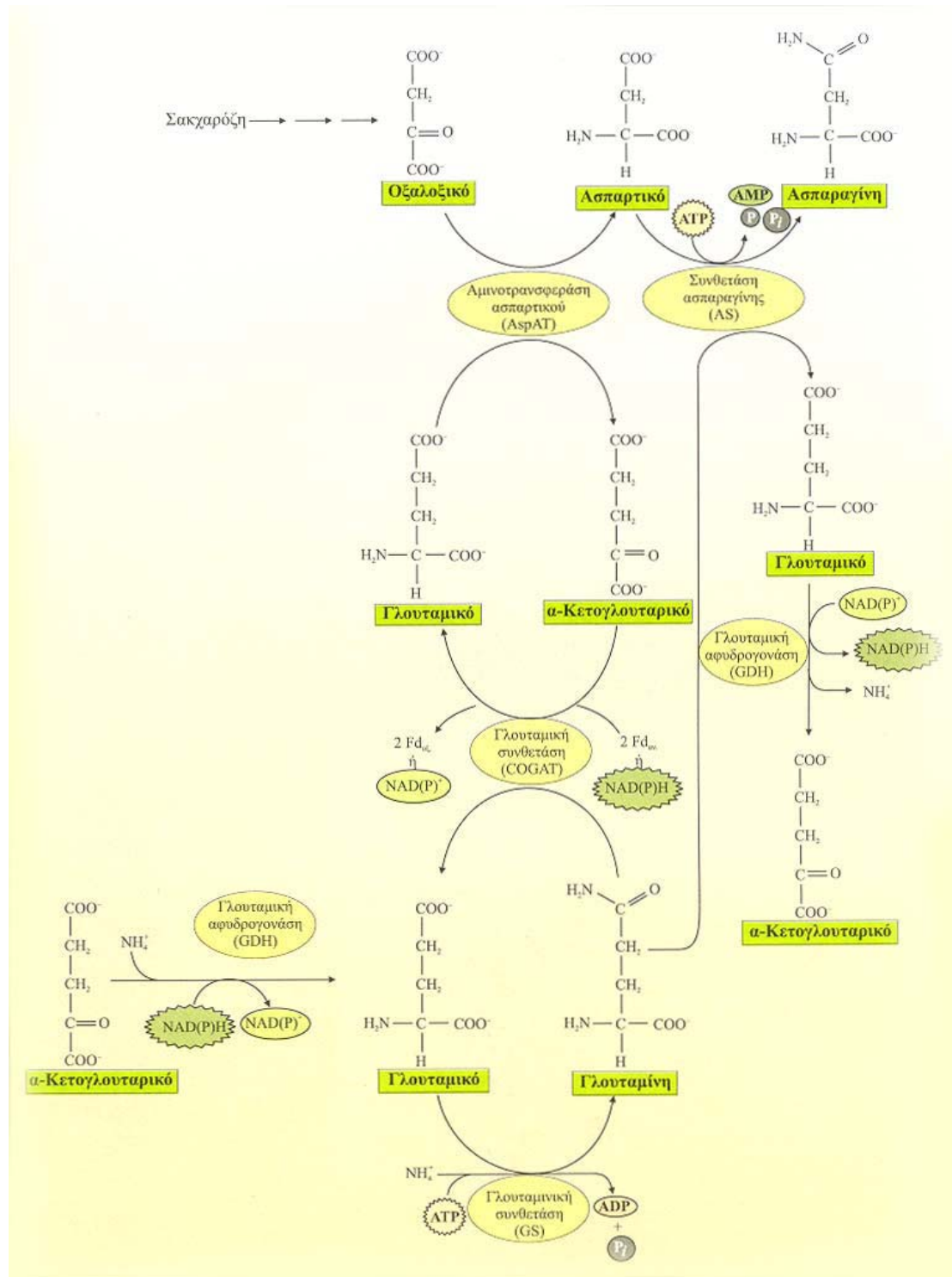
Σπορόφυτα καλαμποκιού (*Zea mays*) αναπτύχθηκαν σε θρεπτικά υποστρώματα με αυξανόμενες συγκεντρώσεις σε Κάδμιο (Cd), για 12 ημέρες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι παρεμποδίστηκε σημαντικά η δράση των ενζύμων GS και GOGAT, ενώ αντίθετα η δράση της GDH αυξήθηκε (Boussama et al., 1999).

1.4.2. Αφομοίωση Αμμωνίας

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 ακετογλουταρικό, 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 7).



Εικόνα 7: 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.

Γλουταμινική συνθετάση (GS)

Η γλουταμινική συνθετάση, GS, καταλύει την αντίδραση της ένωσης αμμωνιακού ιόντος σε γλουταμικό οξύ παρουσία ATP για τη σύνθεση γλουταμίνης και ADP (Εικ. 8). 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.

Γλουταμική συνθάση (GOGAT)

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. 8).

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 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 glul 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 .

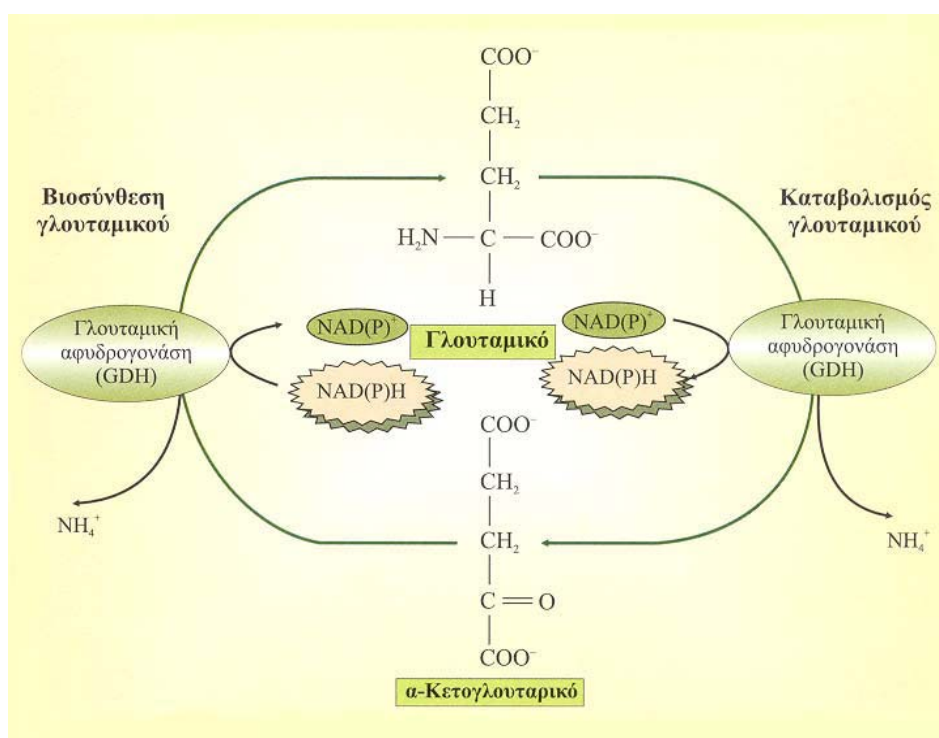
Γλουταμική Αφυδρογονάση (GDH)

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



Ο ρόλος της GDH σήμερα στο μεταβολισμό των ανώτερων 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 δυο τρόπους. Στην αφομοίωση ή την επαναφομοίωση του αμμωνίου, δρώντας έτσι συμπληρωματικά με το δίδυμο GS/GOGAT στη σύνθεση του γλουταμικού οξέος, ιδιαίτερα κάτω από συνθήκες καταπόνησης (υψηλή θερμοκρασία, έλλειψη νερού, αλατότητα, μολύνσεις από παθογόνα) ή σε ειδικά στάδια ανάπτυξης. Εναλλακτικά, το ένζυμο μπορεί να καταλύει την οξειδωση του γλουταμικού οξέος, εξασφαλίζοντας ανθρακικούς σκελετούς για την αποτελεσματική λειτουργία του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων (κύκλος Krebs), κάτω από περιοριστικές συνθήκες άνθρακα.



Εικόνα 9. Αμινωτική και απαμινωτική αντίδραση, που καταλύονται από τη γλουταμική αφυδρογονάση (από Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, 2003).

Στα ανώτερα φυτά έχουν αναφερθεί δύο κύριες μορφές της GDH : μια μορφή εξαρτώμενη από $NADH$ ($NADH$ -GDH) που εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια και μια $NADPH$ ($NADPH$ -GDH) εξαρτώμενη 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 δυο 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 (Loulakakis and Roubelakis-Agelakis, 1991; 1992).

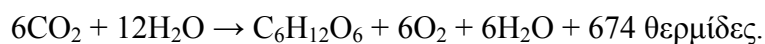
Τα χαρακτηριστικά της GDH έχουν μελετηθεί σε αρκετά φυτικά είδη, εκτενέστερα δε στο αμπέλι. Το ένζυμο παρουσιάζει πρότυπο επτά συνενζύμων σε όλους τους ιστούς, σε διαφορετικές ποσότητες. Το ένζυμο είναι εξαμερές αποτελούμενο από 2 είδη υπομονάδων, την α και τη β, που διαφέρουν μεταξύ τους στο μοριακό βάρος και στο φορτίο τους. Βρέθηκε ότι όλα τα ισοένζυμα της GDH περιέχουν και τους δυο 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 δυο 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 δυο ακραία είναι ομοεξαμερή ενώ τα ισοένζυμα δυο έως έξι περιέχουν της 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 τη μελέτη της GDH του αβοκάντο *Persea spp.* 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 μια 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 παράγωγος 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 δυο 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 (Syntichaki et al., 1996).

1.5. Φωτοσύνθεση

Η φωτοσύνθεση είναι μια σημαντική βιολογική διεργασία, με την οποία οι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί προμηθεύονται τον άνθρακα και το οξυγόνο, που είναι απαραίτητα για τη θρέψη τους. Τα χλωροφυλλούχα φυτά έχουν την ικανότητα να μετατρέπουν το διοξείδιο του άνθρακα και το νερό σε οργανικές ουσίες, όπως γλυκόζη, απαραίτητες για την ανάπτυξη και τη συντήρησή τους. Η φωτοσυνθετική αυτή διεργασία γίνεται με την ενέργεια του ηλιακού φωτός. Η χημική αντίδραση της φωτοσύνθεσης, λεγόμενη και αντίδραση φωτοσύνθεσης είναι:



Στην πραγματικότητα όμως η φωτοσύνθεση γίνεται σε στάδια και με μια σειρά από πολύπλοκες χημικές αντιδράσεις.

Η διαδικασία της φωτοσύνθεσης γίνεται σε δυο στάδια.

1. Κατά το πρώτο στάδιο τα μόρια της χλωροφύλλης απορροφούν φωτεινή ενέργεια, ενεργοποιούνται και αποβάλλουν ηλεκτρόνια, ιονίζονται. Ένα μέρος της ενέργειας των ενεργοποιημένων μορίων της χλωροφύλλης χρησιμοποιείται για να διασπαστούν μόρια του νερού σε O₂ και H₂ (οξυγόνο και υδρογόνο). Η διαδικασία αυτή λέγεται φωτόλυση. Το O₂ Ελευθερώνεται στην ατμόσφαιρα και το H₂ δεσμεύεται στους χλωροπλάστες.
2. Κατά το δεύτερο στάδιο με μια σειρά χημικών ενώσεων παράγεται γλυκόζη, η οποία μεταφέρεται σε όλα τα μέρη του φυτού. Γενικά η φωτοσύνθεση είναι μια ενδόθερμη λειτουργία των αυτότροφων οργανισμών κατά την οποία η Ηλιακή Ενέργεια μετατρέπεται σε χημική. Λαμβάνει χώρα στους χλωροπλάστες και παράγονται θρεπτικά υλικά.

Πολλές από τις αντιδράσεις που συμβαίνουν κατά την διάρκεια της φωτοσύνθεσης μπορούν να συμβούν από την ύπαρξη ή μη φωτός και ονομάζονται «σκοτεινές» αντιδράσεις, επηρεάζονται όμως από την θερμοκρασία. Οι ονομαζόμενες

«φωτεινές» αντιδράσεις για να πραγματοποιηθούν, προϋποθέτουν τη ύπαρξη φωτός, αλλά είναι ανεξάρτητες από την θερμοκρασία. Στο πρώτο στάδιο της φωτοσύνθεσης, τις φωτεινές αντιδράσεις, το φυτό δεσμεύει την ηλιακή ενέργεια και μέσω της φωτόλυσης του νερού τη μεταφέρει στο ενεργειακό νόμισμα των κυττάρων, το ADP το οποίο ανάγει σε ATP, και στο NADP το οποίο ανάγει σε NADPH+H⁺

Με το δεύτερο στάδιο της φωτοσύνθεσης, τις σκοτεινές αντιδράσεις, το φυτό χρησιμοποιεί την ενέργεια του ATP και του NADPH+H⁺, τα οποία προέρχονται από τις φωτεινές αντιδράσεις, για την αναγωγή του άνθρακα και τελικά τη σύνθεση σακχάρων. Οι σκοτεινές αντιδράσεις πραγματοποιούνται στο στρώμα, ενώ οι φωτεινές στα θυλακοειδή των χλωροπλαστών. Οι πρώτες ύλες για τη φωτοσύνθεση και το διοξείδιο του άνθρακα, εισέρχονται στα κύτταρα των φύλλων, το πρώτο από το έδαφος μέσω των ριζών ενώ το δεύτερο μέσω των στομάτων των φύλλων. Από τα στόματα ελευθερώνετε στην ατμόσφαιρα το οξυγόνο που παράγεται από τη φωτοσύνθεση καθώς και νερό μέσω του φαινομένου της εξατμισοδιαπνοής.

Χρωστικές

Χρωστική ονομάζεται κάθε ουσία που απορροφά το φως. Το ορατό σε εμάς χρώμα είναι το σύνολο των μηκών κύματος τα οποία η χρωστική δεν απορροφά. Τα φύλλα των φυτών φαίνονται πράσινα γιατί η χλωροφύλλη που περιέχουν απορροφά το ορατό φως εκτός των μηκών κύματος που αντιστοιχούν στο πράσινο. Οι χλωροφύλλες είναι πολύπλοκα μόρια και υπάρχουν αρκετά είδη τα οποία όμως διαφέρουν μόνο σε λεπτομέρειες τις δομής τους. Η χλωροφύλλη a υπάρχει σε όλους τους φωτοσυνθετικούς ευκαριωτικούς οργανισμούς και στα προκαριωτικά κυανοβακτήρια. Απορροφά κυρίως τα μήκη κύματος που αντιστοιχούν στα ιώδες, μπλε, πορτοκαλί και ερυθρό και πολύ λιγότερο στο πράσινο και στο κίτρινο. Εκτός από τη χλωροφύλλη a, τα φυτά περιέχουν χλωροφύλλη b, καθώς και άλλες δευτερεύουσες χρωστικές, τα καροτενωειδή και τις φυκοβιλίνες. Η χλωροφύλλη b των πράσινων φυτών αποτελεί το 1/4 περίπου τις συνολικής περιεκτικότητας σε χλωροφύλλη και βοηθά στη διεύρυνση του φάσματος απορρόφησης μεταβιβάζοντας

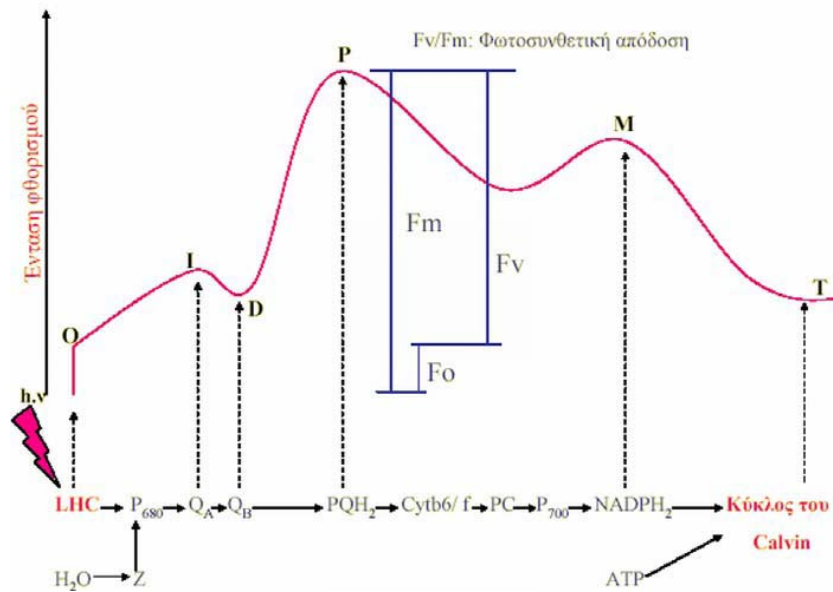
την ενέργεια που απορροφά σε ένα μόριο της χλωροφύλλης a το οποίο τη μετατρέπει σε χημική. Όλες οι συμπληρωματικές χρωστικές μεταφέρουν την ενέργεια που απορροφούν στη χλωροφύλλη a την οποία δεν μπορούν να αντικαταστήσουν στη φωτοσύνθεση.

Όταν ένα μόριο μιας χρωστικής απορροφά φωτεινή ενέργεια, ένα από τα ηλεκτρόνια του μετακινείται σε τροχιά πιο απομακρυσμένη της αρχικής. Το μόριο της χρωστικής βρίσκεται τότε σε κατάσταση διέγερσης και το ηλεκτρόνιο τείνει να επιστρέψει στην αρχική θέση αποδίδοντας την ενέργεια που απορρόφησε. Η ενέργεια αυτή μπορεί να αποδοθεί ως θερμότητα, ως φως (φθορισμός), ή ως χημική ενέργεια, να δεσμευθεί δηλαδή τελικά σε έναν χημικό δεσμό, όπως συμβαίνει στη φωτοσύνθεση. Η δράση της χλωροφύλλης είναι στενά συνδεδεμένη με τη δομή των χλωροπλαστών. Απομονωμένα μόρια χλωροφύλλης απορροφούν μεν το φως, αλλά τα ηλεκτρόνια, επιστρέφοντας, αποδίδουν την ενέργεια υπό μορφή φωτός. Η επίδραση των βαρέων μετάλλων αφορά την παρεμπόδιση της λειτουργίας της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων κατά τη φωτοσύνθεση επηρεάζοντας έτσι το ρυθμό της φωτοσύνθεσης και κατ' επέκταση τον επαγωγικό φθορισμό.

1.6. Επαγωγικός φθορισμός χλωροφύλλης

Μόνο ένα μέρος της ενέργειας που απορροφάται από τις χρωστικές του φωτοσυνθετικού μηχανισμού χρησιμοποιείται για τη φωτοχημεία της φωτοσύνθεσης. Η επιπλέον ενέργεια από αυτήν που χρησιμοποιείται για τη φωτοχημεία της φωτοσύνθεσης πρέπει να απελευθερωθεί αποτελεσματικά με μη-φωτοχημικές διαδικασίες. Οι διαδικασίες αυτές περιλαμβάνουν την εκπομπή θερμότητας και την επανεκπομπή μικρών αλλά ανιχνεύσιμων ποσών της απορροφημένης ακτινοβολίας ως μεγαλύτερου μήκους κύματος φωτεινή ενέργεια. Αυτή η επανεκπομπή του φωτός καλείται φθορισμός χλωροφύλλης. Η επαγωγή του φθορισμού από φωτοσυνθετικούς οργανισμούς παρατηρήθηκε για πρώτη φορά από τους Kautsky and Hirsch το 1931 (Krause and Weis, 1991). Η επαγωγή του φθορισμού από τα φυτά πραγματοποιείται σε δύο φάσεις, εκ των οποίων η πρώτη είναι ταχεία και η δεύτερη αργή. Σήμερα, η μελέτη της καμπύλης του επαγωγικού φθορισμού –ιδιαίτερα της ταχείας φάσης- έχει εξελιχθεί σε πολύτιμο ερευνητικό μέσο για τη μελέτη της δραστηριότητας, αλλά και

της απόδοσης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Ο φθορισμός αυξάνεται όταν η φωτοχημική απόδοση της φωτοσύνθεσης παρεμποδίζεται για οποιοδήποτε λόγο, για παράδειγμα όταν δεν υπάρχει διαθέσιμος οξειδωμένος δέκτης ηλεκτρονίων σε κάποιο σημείο στην πορεία της ηλεκτρονιακής μεταφοράς. Το μεγαλύτερο μέρος του φθορισμού εκπέμπεται από τις χρωστικές της κεραίας του Φωτοσυστήματος II, κι αυτό γιατί το PSII έχει ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό: όταν τα κέντρα του είναι «κλειστά», τότε αυτά τα ίδια τα κέντρα αποσβένουν αρκετά αποτελεσματικά τον φθορισμό. Όταν ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός, μετά από την προσαρμογή του στο σκοτάδι, δεχτεί την επίδραση συνεχούς φωτισμού, τότε ο φθορισμός του αυξάνεται από το αρχικό του επίπεδο (F0) σε ένα μέγιστο επίπεδο (Fm) και στη συνέχεια μειώνεται βαθμιαία μέχρις ένα σταθερό επίπεδο (Fs)



Εικόνα 10. Τυπική καμπύλη επαγωγικού φθορισμό

1. Ελάχιστος φθορισμός (F0)

Κατά τη διάρκεια της φωτοσύνθεσης, τα κέντρα αντίδρασης στο PSII είναι ανοικτά και υπάρχει μια ελεύθερη ροή ηλεκτρονίων. Κάθε φωτόνιο που απορροφάται από ένα μόριο χλωροφύλλης μετατοπίζει ένα ηλεκτρόνιο από την θεμελιώδη σε μία διεγερμένη κατάσταση. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας τα κέντρα

αντίδρασης στο PSII είναι σε ανοικτή κατάσταση διότι η μεταφορά ηλεκτρονίων είναι αρκετά γρήγορη έτσι ώστε να επιτρέπεται η είσοδος περαιτέρω ηλεκτρονίων. Υπάρχει μια σταθερή ροή ηλεκτρονίων και εμφανίζεται ένας ελάχιστος φθορισμός (F0).

2. Μέγιστος φθορισμός (Fm)

Όταν ένας παλμός κορεσμού φωτός στέλνεται σε ένα φωτοσυνθετικό δείγμα τότε προκαλείται σε αυτό ο μέγιστος φθορισμός. Το οξειδωμένο κέντρο αντίδρασης θα γίνει εντελώς ανοιγμένο με την αύξηση της μεταφοράς των ηλεκτρονίων (περισσότερο φως). Τα κέντρα αντίδρασης είναι τώρα κλειστά και ο αποδέκτης ηλεκτρονίων (QA) ανάγεται εντελώς. Η ροή των ηλεκτρονίων εμποδίζεται επειδή η ποσότητα των QA δεν μπορεί να μεταφέρει τα ηλεκτρόνια αρκετά γρήγορα έτσι ώστε να συμβαδίσει με την εισροή των φωτονίων με αποτέλεσμα να εμφανίζεται η μέγιστη κβαντική απόδοση του PSII (Fm). Σε αυτή την κατάσταση, η εκπομπή φθορισμού είναι μέγιστη.

3. Μεταβλητός φθορισμός (Fv)

Η διαφορά μεταξύ των εντάσεων φθορισμού με τα κλειστά και ανοικτά κέντρα αντίδρασης είναι γνωστή ως μεταβλητός φθορισμός χλωροφύλλης ($F_v = F_m - F_0$). Αυτό αντιστοιχεί στο μέρος της απορροφημένης φωτεινής ενέργειας που θα χρησιμοποιούταν στη φωτοσύνθεση εάν όλα τα κέντρα αντίδρασης ήταν στην ανοικτή κατάσταση.

4. Ο λόγος F_v/F_m

Ο λόγος του φθορισμού F_v/F_m είναι ανάλογος του κβαντικού επιπέδου της φωτοχημείας της φωτοσύνθεσης. Η μείωση του λόγου F_v/F_m είναι ενδεικτική του αποτελέσματος κάποιων περιβαλλοντολογικών εξωτερικών παραγόντων, και αυτή η αλλαγή δείχνει απώλεια της φωτοχημικής απόδοσης. Η ευνοϊκότερη τιμή του λόγου F_v/F_m για τα περισσότερα είδη φυτών είναι $0,83 \pm 0,05$ (Krause and Weis, 1991). Τιμές χαμηλότερες από αυτή δείχνουν ότι το φυτό είναι εκτεθειμένο σε κάποιου είδους καταπόνηση.

1.7. Βοτανικά χαρακτηριστικά των φυτών *Nicotiana glauca* και *Nicotiana tabacum*.

1.7.1. *Nicotiana glauca*



Το φυτό *Nicotiana glauca* ανήκει στην ομάδα των δικοτυλήδων και στην οικογένεια *Solanaceae*. Είναι αυτοφυές στη Βολιβία, στην Αργεντινή, στη Ν. Αμερική και στις Μεσογειακές χώρες. Είναι ένας βραχύβιος θάμνος ή ένα μικρό δέντρο που συχνά φτάνει

Εικόνα 11. Φυτό *Nicotiana glauca* της οικογένειας *Solanaceae*.

τα 7,5 μέτρα στη φύση. Είναι χαρακτηριστική η εμφάνιση του εξαιτίας των μεγάλων ωοειδών γαλαζοπράσινων φύλλων του. Αυτά είναι παχιά, ελαστικά, απλά, λεία, γλαυκά με διακεκριμένες νευρώσεις και εναλλάσσονται γύρω από τον κορμό με μακρύ μίσχο, έχουν μήκος περίπου 17,5 cm και πλάτος 15 cm. Η ταξιανθία είναι φόβους με κίτρινα σωληνοειδή άνθη, με πέντε πέταλα, τα οποία αναπτύσσονται στο τέλος της διακλάδωσης χωρίς φύλλα. Τα άνθη είναι άοσμα και έχουν μήκος 1 ³/₄ ίντσες και πλάτος 1/2 ίντσες. Οι αγωγοί των ανθέων έχουν πέντε λοβούς και κλείνουν κατά τη διάρκεια του απογεύματος. Αυτά ακολουθούνται από μια ωοειδής σποριοόκαφα που περιέχει πολυάριθμους καφέ σπόρους. Το φυτό μπορεί να ανθίζει όλο το χρόνο σε θερμά κλίματα, αλλά συνήθως ανθίζει Αύγουστο έως Οκτώβριο.

Το φυτό είναι καλλιεργούμενο και απαιτεί πλήρη ηλιοφάνεια ή ημισκιά και βαθύ πλούσιο έδαφος. Στην σκιά δεν μεγαλώνει. Επίσης μπορεί να αναπτυχθεί σε αμμώδη ή αργιλώδη, υγρά και καλά στραγγιζόμενα, όξινα, ουδέτερα ή αλκαλικά εδάφη. Γενικά δεν έχει ιδιαίτερες απαιτήσεις. Ένα κατάλληλο compost καλλιέργεια του συνιστάται από δύο μέρη πηλού, δύο μέρη τύρφης peat moss και 1 μέρος άμμου. Λιπαίνεται μηνιαία με ισορροπημένο λίπασμα. Για την βέλτιστη ανάπτυξη του φυτού τοποθετείται σε υγρό μέρος. Είναι φυτό ταχείας ανάπτυξης. Το κλάδεμα προάγει την ανάπτυξη περισσότερων βραχιόνων και περισσότερων ανθέων. Κατά το κλάδεμα δεν πρέπει να απομακρύνουμε τα μαραμμένα άνθη έτσι ώστε το φυτό να μπορεί να παράγει σπόρους. Το φυτό μπορεί να γίνει ζιζάνιο αν το τοποθετήσουμε σε

θερμοκήπιο. Πολλαπλασιάζεται με τμήματα φυτού ή με σπόρους. Οι εχθροί του είναι πουλιά και έντομα κυρίως της τάξης *Lepidoptera*.

Το *Nicotiana glauca* χρησιμοποιείται κυρίως σε δημόσιους χώρους, πάρκα και δρόμους. Το φυτό έχει φαρμακευτική χρήση, αλλά επειδή όλα τα μέρη του είναι εξαιρετικά δηλητηριώδη, πρέπει να χρησιμοποιείται με ιδιαίτερη προσοχή. Το *Nicotiana glauca* ενώ σχετίζεται με το *Nicotiana tabacum* δεν περιέχει νικοτίνη.

Έχει χρησιμοποιηθεί σε πειράματα φυτοεξυγίανσης ως υπερσυσσωρευτής εξαιτίας της γρήγορης ανάπτυξής του, της μεγάλης βιομάζας του και της προσαρμοστικότητάς του στις περιβαλλοντικές συνθήκες. Τα αποτελέσματα ήταν ικανοποιητικά ιδιαίτερα στις περιπτώσεις του Pb, Cd και Zn αφού μπόρεσε να αναπτυχθεί πολύ καλά χωρίς να αλλοιωθούν ιδιαίτερα τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του και να συγκεντρώσει πάνω από 10000 ppm μετάλλου. Τέτοιου είδους πειράματα έχουν γίνει σε Ευρώπη, Αυστραλία και Αμερική, όπου το *Nicotiana glauca* βρέθηκε φυτό κατάλληλο για φυτοεξυγίανση.

1.8.2. *Nicotiana tabacum*



Το φυτό *Nicotiana tabacum* ανήκει στην ομάδα των δικοτυλήδων και στην οικογένεια *Solanaceae*. Είναι ετήσιο φυτό, θάμνος ή μικρό δέντρο από 0.90 έως 1.50 m ύψος ανάλογα με την ποικιλία. Τα φύλλα του είναι ελλειπτικά ή λογχοειδή, η ταξιανθία είναι βότρυς στο τέλος της διακλάδωσης, έχουν κυλινδρικό κάλυκα και είναι πρασινωπά ή κοκκινωπά στο πάνω μέρος. Τα φρούτα έχουν διαφορετικό σχήμα με σφαιρικούς σπόρους.

Εικόνα 12. Φυτό *Nicotiana tabacum* της οικογένειας *Solanaceae*.

Είναι ευαίσθητο στη θερμοκρασία, στον αέρα, στην υψηλή υγρασία και στον τύπο του εδάφους. Η θερμοκρασία των 20 με 30 °C είναι η καλύτερη για την επαρκή ανάπτυξη των φυτών, η ατμοσφαιρική υγρασία 80 – 85 % και έδαφος χωρίς υψηλά επίπεδα αζώτου είναι επίσης απαραίτητο.

Είναι ιθαγενές της τροπικής και υποτροπικής Αμερικής αλλά τώρα καλλιεργείται εμπορικά παγκοσμίως. Άλλες ποικιλίες καλλιεργούνται σαν διακοσμητικά φυτά ή αναπτύσσονται σαν αγριόχορτα. Κάθε μέρος του φυτού εκτός από τους σπόρους περιέχει νικοτίνη, αλλά η συγκέντρωση σχετίζεται με τις διαφορετικές λειτουργίες ανάλογα με το είδος, τον τύπο του εδάφους, την καλλιέργεια και τις συνθήκες του καιρού. Η συγκέντρωση της νικοτίνης αυξάνεται με την ηλικία του φυτού. Τα φύλλα του καπνού περιέχουν 2 – 8 % νικοτίνη συνδυασμένη σαν μηλικό ή κιτρικό. Η κατανομή της νικοτίνης σε ένα ώριμο φυτό σε άγρια ποικιλία είναι: 64% στα φύλλα, 18% στο βλαστό, 13% στις ρίζες και 5% στα άνθη. Ο καπνός χρησιμοποιείται σαν τοπικό αναλγητικό. Τα στεγνά φύλλα του χρησιμοποιούνται για μάρσημα ή για κάπνισμα.

Σε πείραμα που πραγματοποιήθηκε για τη μελέτη της επίδρασης του Cd και του Ni (με επεμβάσεις των 20ppm και 25ppm αντίστοιχα) στο *N.tabacum* παρατηρήθηκε αναστολή της ανάπτυξης των ριζικών τριχιδίων του φυτού στην παρουσία των μετάλλων, γεγονός που καθιστά τις συγκεκριμένες συγκεντρώσεις Cd και Ni τοξικές για τα ριζικά τριχίδια του φυτού (Boominathan and Doran, 2003). Από πείραμα έχει διαπιστωθεί πως η ανάπτυξη του φυτού μειώνεται, όταν αυτό καλλιεργείται σε εδάφη με υψηλές συγκεντρώσεις μολύβδου και ψευδαργύρου.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Για τις ανάγκες του πειράματος στο θερμοκήπιο χρησιμοποιήθηκαν καλλιεργούμενα (*Nicotiana tabacum*) και άγρια (*Nicotiana glauca*) φυτά καπνού. Με τα οποία και μελετήσαμε τις επιδράσεις διαλυμάτων διαφόρων συγκεντρώσεων.

Όλα τα φυτά ήταν ήδη ανεπτυγμένα και τοποθετήθηκαν σε γλάστρες ταξινομημένα ανά επέμβαση σε ειδικό πάγκο εργασίας και σε φυσιολογικές συνθήκες θερμοκηπίου.

Οι επεμβάσεις που πραγματοποιήσαμε ήταν συνολικά 4 και στην καθεμία χρησιμοποιήθηκαν 3 φυτά από κάθε είδος με τις επιθυμητές συγκεντρώσεις, με τις οποίες και πραγματοποιούσαμε ριζοπότισμα στα φυτά. Για τις ανάγκες της σύγκρισης χρησιμοποιήθηκαν και φυτά μάρτυρες τα οποία δεν υπέστησαν καμία επέμβαση. Συγκεκριμένα, οι επεμβάσεις ήταν: Μάρτυρας 0,2 Mm Cd, 1Mm Cd και 2Mm.

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε κατά τους μήνες Σεπτέμβριο-Οκτώβριο και σύμφωνα με την εποχή και τις απαιτήσεις των φυτών, κρίθηκε ικανοποιητικό για την φυσιολογική τους ανάπτυξη τα ριζοποτίσματα με τα μέταλλα να γίνονται 3 φορές την εβδομάδα, με ποσότητα 100 mL του ανάλογου διαλύματος ανά φυτό. Επίσης, εβδομαδιαίως γινόταν και λίπανση των φυτών με πλήρες λίπασμα (20-20-20).

Οι παρατηρήσεις που γίνονταν στα φυτά ανά τακτά διαστήματα αφορούσαν το ύψος των φυτών, των αριθμό των φύλλων τους και τα μεσογονάτια διαστήματα. Επίσης την ποσότητα των ολικών χλωροφυλλών (αυθαίρετες μονάδες SPAD) 5 έως 8 φύλλων από τη μέση του βλαστού των φυτών, τον ρυθμό φωτοσύνθεσης, και τον επαγωγικός φθορισμό των χλωροφυλλών για ένα φύλλο από κάθε φυτό από τη μέση του βλαστού και από τα δυο φυτικά είδη.

Λίγο πριν από την απεγκατάσταση των φυτών στο θερμοκήπιο έγινε συγκομιδή ιστών από τα φυτά για περαιτέρω αναλύσεις. Συγκεκριμένα, συγκομίστηκαν φύλλα από την κορυφή και τη βάση των φυτών, τα οποία ξηραθήκαν σε φούρνο στους 85 °C, λειοτριβήθηκαν και στη συνέχεια στη σκόνη που προέκυψε προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις του καδμίου από το εργαστήριο Θρέψης της Σχολής Τεχνολογίας Γεωπονίας του Α.Τ.Ε.Ι. Κρήτης.

2.1 Μέτρηση ολικών χλωροφυλλών

Για τη μέτρηση της πυκνότητας της χλωροφύλλης χρησιμοποιήθηκε ο φορητός μετρητής χλωροφύλλης SPAD-502 (Minolta), που επιτρέπει γρήγορες μετρήσεις, χωρίς καταστροφή του φύλλου και μπορεί να αντικαταστήσει τις παραδοσιακές χρωματομετρικές μεθόδους προσδιορισμού της χλωροφύλλης στα φύλλα.

Η αρχή μέτρησης του οργάνου βασίζεται στην διαφορά της οπτικής πυκνότητας σε δύο μήκη κύματος (650 nm ερυθρό και 640 nm υπέρυθρο). Πηγή φωτισμού είναι 2 LEDs (φωτοεκπομπός δίοδος), μία για το ερυθρό και μία για το υπέρυθρο, που είναι τοποθετημένες στην κεφαλή του οργάνου και εκπέμπουν φως σε σειρά όταν αυτή

κλείνει. Το φως από τα LEDs φεύγει δια μέσου του παραθύρου εκπομπής (επιφάνειας 6 nm²) και αφού περάσει δια μέσου του φύλλου που βρίσκεται στην κεφαλή μέτρησης, εισέρχεται στο παράθυρο υποδοχής. Ο υποδοχέας μετατρέπει το μεταβιβαζόμενο φως σε ανάλογο ηλεκτρικό σήμα, που στη συνέχεια μετατρέπεται σε αριθμητικό. Το τελευταίο χρησιμοποιείται από ένα μικροϋπολογιστή για το υπολογισμό των τιμών SPAD (Minolta 1989), από τις οποίες υπολογίζεται η συγκέντρωση της χλωροφύλλης στα φύλλα.



Εικόνα 13. Ο φορητός μετρητής χλωροφύλλης SPAD-502 (Minolta).

2.2. Μέτρηση του ρυθμού φωτοσύνθεσης

Η μέτρηση της φωτοσύνθεσης έγινε με τον μετρητή φωτοσύνθεσης **LI-6400, Li-cor Inc. Lincoln, NE, U.S.A.** ο οποίος μετρά Φωτοσύνθεση, διαπνοή και στοματική αγωγιμότητα. (Εικ.14)



Εικόνα 14. Μετρητής φωτοσύνθεσης **LI-6400, Li-cor Inc. Lincoln, NE, U.S.A.**

2.3. Επαγωγικός φθορισμός της χλωροφύλλης

Η επαγωγή φθορισμού της χλωροφύλλης είναι μια διαδεδομένη μέθοδος για την αξιολόγηση της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας (Krause and Weis, 1991). Ο φθορισμός της χλωροφύλλης αποτελεί ένα τρόπο αποδιέγερσης του μορίου της μετά από την απορρόφηση φωτονίων. Κάτω από φυσιολογικές θερμοκρασίες, πρακτικά όλος ο εκπεμπόμενος φθορισμός προέρχεται από τα μόρια της χλωροφύλλης α του φωτοσυστήματος II (PSII). Με τη χρήση του φθορισμόμετρου του συγκεκριμένου τύπου, οι μελέτες του φθορισμού πραγματοποιούνται με αιφνίδια ακτινοβολία του φύλλου, το οποίο έχει προηγουμένως παραμένει για ορισμένο χρονικό διάστημα (περίπου δέκα λεπτά) στο σκοτάδι. Με την παραμονή στο σκοτάδι όλοι οι πρωταρχικοί δέκτες του PSII (Q_A , Q_B) οξειδώνονται πλήρως. Έτσι με τον απότομο φωτισμό, ο φθορισμός (P) ανέρχεται σε ένα αρχικό επίπεδο P_0 , που αντιστοιχεί στο βασικό φθορισμό της φωτοσυνθετικής συσκευής πριν το PSII διεγερθεί. Στη συνέχεια και εφ' όσον η ένταση του διεγείροντας φωτός αντιστοιχεί σε επίπεδα κορεσμού, ο αρχικός φθορισμός ανέρχεται σε ένα μέγιστο επίπεδο (F_{max} , F_m) που συμπίπτει με την πλήρη αναγωγή όλων των αποθεμάτων του πρωταρχικού δέκτη Q_A , άρα στο σημείο αυτό η φωτοχημική ικανότητα θεωρείται μηδέν. Η διαφορά μεταξύ F/F_m αποτελεί έναν πολύ χρήσιμο δείκτη της φωτοχημικής ικανότητας των φυτών. Όπως έχει αποδειχθεί (Demmig and Björkman 1987), ο λόγος F/F_m είναι ευθέως ανάλογος με την ανά φωτόνιο απόδοση της φωτοσύνθεσης αποτελώντας έτσι μία καλή ένδειξη φωτοανασταλτικών βλαβών, που μπορούν να προέρχονται από διάφορες μορφές περιβαλλοντικής καταπόνησης (χαμηλές ή υψηλές θερμοκρασίες, τροφοπενίες, ασθένειες κλπ.). Το φθορισμόμετρο που χρησιμοποιήθηκε, παρέχει στο φύλλο φως στα 650 nm, πλήρους έντασης 1500 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ και δίνει αυτομάτως το λόγο F_m/F_v και αρχικού φθορισμού ονομάζεται μεταβλητός φθορισμός ($F_v = F_m - F_0$). Ο

λόγος του μεταβλητού προς το μέγιστο φθορισμό ($F_{vmvm} = F_v/F_m$).

Οι μετρήσεις για τον προσδιορισμό του φθορισμού των φύλλων πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το OS-30p Chlorophyll Fluorometer (OPTI-SCIENCES) στα 660 nm μετά από 10 λεπτά επώασης στο σκοτάδι σε θερμοκρασία

δοματίου. Η μεταφορά των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Opti-Sciences Data Capture V3.0



Εικόνα 15. OS-30p Chlorophyll Fluorometer

2.4. Εκχύλιση πρωτεϊνών από φυτικούς ιστούς

Διαλύματα :

Διάλυμα εκχύλισης (extraction buffer): 100 mM Tris-HCl pH 8, 2 mM EDTA, 3 mM MgCl₂, 10% Glycerol, 0,2% Triton X 100 και 5 mM DTT

Διαδικασία:

Ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιγράφεται από τον Κων/νο Α. Λουλακάκη (1999). Όλα τα στάδια της εκχύλισης πρωτεϊνών εκτελέστηκαν μέσα σε πάγο. Όλα τα διαλύματα και οι μικροσυσκευές που χρησιμοποιήθηκαν διατηρήθηκαν μέσα σε πάγο. Η αναλογία φυτικού ιστού και extraction buffer (διατηρημένου στους 4 °C), που λειοτριβήθηκε στο γουδί ήταν 1:4. Τα μίγματα μετά μεταφέρθηκαν σε σωλήνες φυγοκέντρου και ομογενοποιήθηκαν σε ομογενοποιητή τρεις φορές, διάρκειας 30 sec η κάθε μία. Ακολούθησε επώαση σε πάγο για 10 min, ανάδευση, και αφού ισοζυγίστηκαν φυγοκεντρήθηκαν σε ψυχωμένη φυγόκεντρο στις 10,000 rpm (στροφές ανά λεπτό) και στους 4 °C για 30 min. Τα υπερκείμενα μοιράστηκαν σε μικροσωλήνες erpendorf και φυλάχτηκαν στον καταψύκτη για να χρησιμοποιηθούν σε επόμενους προσδιορισμούς.

2.5. Ποσοτικός προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης (Modified Lowry)

Διαλύματα:

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

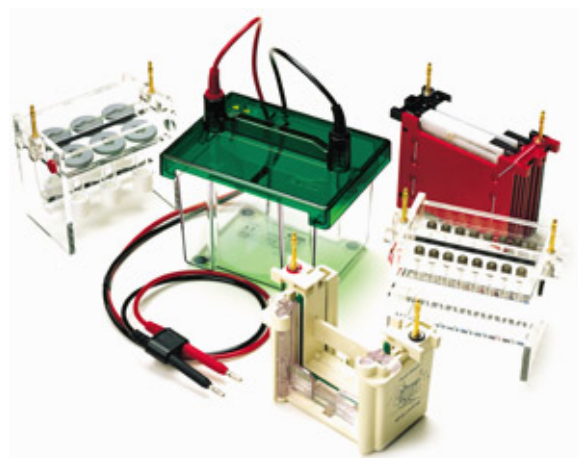
1. Διάλυμα Β: 0,5 g CuSO₄ 5H₂O σε 100 mL H₂O
2. Διάλυμα Γ: Διάλυμα Α & Διάλυμα Β σε αναλογία 100:2 (παρασκευάζεται λίγο πριν την χρήση).
3. Διάλυμα Δ: Folin-Phenol 2× αραιωμένο 1:1 με H₂O (παρασκευάζεται λίγο πριν την χρήση).

Διαδικασία:

Σε μικροσωλήνες erpendorf αναμειγνύονται 25 μL εκχυλίσματος και 25 μL 20% TCA, και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 14,000 rpm (στροφές) για 20 min. Έπειτα γίνεται άντληση του υπερκείμενου με αντλία Bernoulli ή πιπέτα. Επαναδιαλύεται η πελέτα (πρωτεϊνικό ίζημα) σε 100μL 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. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mg πρωτεϊνών ανά mL διαλύματος.

2.7. Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών (PolyAcrylamide Gel Electrophoresis, SDS – PAGE)



Εικόνα 16. Συσκευή ηλεκτροφόρησης.

Διαλύματα:

1. Διάλυμα μετουσίωσης δειγμάτων (3X sample buffer): 150 mM Tris – HCl pH 6,8, 9% SDS, 15% β–μερκαπτοαιθανόλη (b–mercaptoethanol, 0.1% κυανούν της βρωμοφαινόλης, 30% γλυκερόλη.
2. Μητρικό διάλυμα ακρυλαμίδης: 30% ακρυλαμίδη (acrylamide), 0,8% δις–ακρυλαμίδη (bis–acrylamide).
3. Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτώματος διαχωρισμού (resolving gel buffer): 1.5 M Tris–HCl pH 8.9 (Lower Tris 4X).
4. Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτώματος επιστοίβασης (stacking gel buffer): 0.5 M Tris–HCl pH 6.8 (Upper Tris 4X).
5. Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Tank Buffer): 25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS.
6. 10% διάλυμα ammonium per sulfate (APS) 55 μL
7. 20% διάλυμα SDS
8. 50% διάλυμα γλυκερόλης
9. Temed 6 μL

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 ένα (stacking gel) προηγείται του άλλου (resolving gel). Το resolving gel περιείχε 10% πολυακρυλαμίδη και το stacking gel 4% πολυακρυλαμίδη. Η επιμέρους σύσταση κάθε πηκτώματος φαίνεται στον Πίνακα 3. Για την μετουσίωση των δειγμάτων προστέθηκε σε κάθε πρωτεϊνικό δείγμα διάλυμα μετουσίωσης (sample buffer) σε αναλογία 2:1. Το μίγμα επώαστηκε στους 100 °C για 5 min και στην συνέχεια μεταφέρθηκε σε πάγο.

Ηλεκτροφόρηση: Η συσκευή ηλεκτροφόρησης συναρμολογήθηκε προσεκτικά (χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο Mini Protean II της Bio Rad). Το πήκτωμα διαχωρισμού τοποθετήθηκε στη συσκευή και αφέθηκε μέχρι να πολυμεριστεί. Στην συνέχεια παρασκευάστηκε και εφαρμόστηκε στη συσκευή το πήκτωμα επιστοίβασης. Αμέσως εφαρμόστηκε στον υποδοχέα η κτένα 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 (17 – 25 µg ολικής πρωτεΐνης κάθε δείγματος) μεταφέρθηκε με μικροσύριγγα στα πηγάδια (wells) και ηλεκτροφορήθηκαν στα 80 V για περίπου 2 ώρες.

Πίνακας 3: Ποσοτική σύσταση των πηκτωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση.

SDS-PAGE		
	Stacking gel	Resolving gel
	Συγκέντρωση Ακριλαμίδης % 4,00%	Συγκέντρωση Ακριλαμίδης % 10,00%
d H ₂ O	4,59	6,18
Upper Tris (4x) (ml)	1,88	0
Lower Tris (4x) (ml)	0	3,75
Acryl.:Bis (30:0,8) (ml)	1	5
10% APS (µl)	26	64
TEMED (µl)	11	5
TOTAL (ml)	7,5	15

2.6. Χρώση πρωτεϊνών με Coomassie Brilliant Blue R-250.



Εικόνα 17. Χρώση πηκτώματος αгарόζης με Coomassie Brilliant Blue R-250

Η μέθοδος έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται από τον Λουλακάκη Κ. (1999).

Διαλύματα:

1. Διάλυμα χρώσης (stain): 0,5 g Coomassie Brilliant Blue R-250, + fix solution 500ml.
Fix solution: 250ml μεθανόλη, 50ml οξικό οξύ, 200ml H₂O
2. 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.

2.7. Μεταφορά κατάWestern Blot - Ανοσοανίχνευση



Εικόνα 18. Συσκευή μεταφοράς κατάWestern Blot

Διαλύματα:

1. Διάλυμα μεταφοράς: 20mM Tris, 192mM γλυκίνη,
2. PBS (phosphate buffered saline): 0,8% NaCl, 0,02% KCl, 0,115% Na_2HPO_4 , 0,02% KH_2PO_4 .
3. 2% BSA (αλβουμίνη από ορό βοδιού) σε PBS 1X.
4. 20% Tween – 20.
5. Διάλυμα πλύσης: 0,05% Tween – 20 σε PBS
6. 1% BSA σε διάλυμα πλύσης.

Διαδικασία:

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα αφαιρέθηκε από της συσκευής και τοποθετήθηκε προσεχτικά σε δοχείο που περιείχε διάλυμα μεταφοράς για 5 min. Στην 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 τοποθέτηση τους στην κασέτα της συσκευής ηλεκτροφόρησης έγινε με τέτοιο τρόπο ώστε όταν η κασέτα τοποθετηθεί στην συσκευή το πήκτωμα να βρίσκεται προς τον αρνητικό πόλο και η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης προς τον θετικό, για να είναι εφικτή η μεταφορά των πρωτεϊνών.

Η μεταφορά των πρωτεϊνών έγινε στα 80 V (400 mA σταθερά) για 1 ώρα και 15 λεπτά. Κάθε μεμβράνη NC που ετοιμάστηκε με αυτό τον τρόπο χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των ενζύμων GS, GDH και GOGAT με την βοήθεια του κατάλληλου αντισώματος.

Τα κύρια στάδια της ανίχνευσης ήταν:

1. Πλύσιμο NC σε διάλυμα PBS 1× για 10 – 15 min.
2. Η NC τοποθετείται σε διάλυμα 2% BSA σε διάλυμα PBS 1× (0,5 g BSA in 25 mL PBS 1×) ανάδευση για 30 min (blocking).
3. Πλύσιμο 1 × 5 min σε διάλυμα PBS 1× + 0,05% TWEEN 20
4. Προστίθεται το πρώτο αντίσωμα σε αραιώσεις (1:1000 για ωσμωτίνη και 1:2500 για GDH) σε διάλυμα 1% BSA σε PBS 1×+ 0.05% TWEEN 20 και γίνεται επώαση με ανάδευση για τουλάχιστον 1h και 30 min.
5. Πλύσιμο 5 × 5 min σε διάλυμα PBS 1× + 0.05% TWEEN 20

6. Προστίθεται το δεύτερο αντίσωμα (αντι-αντίσωμα Alkaline Phosphatase, Anti Rabbit) σε αραιώση 1:2000 σε διάλυμα 1% BSA σε διάλυμα PBS 1× + 0.05% TWEEN 20 και γίνεται επώαση με ανάδευση για τουλάχιστον 1h και 30 min.
7. Πλύσιμο 2 × 5 min σε διάλυμα PBS 1× + 0.05% TWEEN 20
 - a. Πλύσιμο 2 × 5 min σε διάλυμα 100 mM Tris pH 9,0.
8. Επώαση στο διάλυμα χρώσης (100 mM Tris pH 9,0, 0,1 mg/mL NBT, 5 mg/mL BCiP), έως να εμφανιστούν οι ζώνες.
9. Διακοπή της χρώσης με πλύσιμο με DH₂O.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος γίνονταν μετρήσεις, στα μορφολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά των φυτών. Πριν την απεγκατάσταση των φυτών από το θερμοκήπιο, αφού φωτογραφήθηκαν έγινε δειγματοληψία φύλλων, από τα φυτά όλων των επεμβάσεων αλλά και από τα φυτά μάρτυρες, από τρία μέρη κάθε φυτού (φύλλα βάσης, μεσαία φύλλα και φύλλα κορυφής). Στα φύλλα της βάσης και στα φύλλα της κορυφής προσδιορίστηκαν οι ενδογενείς συγκεντρώσεις του μετάλλου του Cd ενώ τα μεσαία φύλλα συντηρήθηκαν σε κατάψυξη στους -80 °C μέχρι να χρησιμοποιηθούν για την εκχύλιση των ολικών πρωτεϊνών.

3.1. Επίδραση του καδμίου (Cd) στα μορφολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά των φυτών *Nicotiana tabacum* και *Nicotiana glauca*

Κατά τη διάρκεια του πειράματος στα φυτά του είδους *Nicotiana tabacum* και *Nicotiana glauca* γινόταν προσθήκη καδμίου με το νερό άρδευσης για 35 μέρες παρουσία συγκεντρώσεων 0,2 mM 1 mM και 2 mM. Προκειμένου να μελετηθούν οι επιδράσεις που επέφεραν στα φυτά οι επεμβάσεις, χρησιμοποιήθηκαν φυτά μάρτυρες, τα οποία αναπτυσσόταν στις ίδιες ακριβώς συνθήκες, χωρίς όμως να τους γίνεται καμία επέμβαση με τα διαλύματα καδμίου που χρησιμοποιούσαμε στα υπόλοιπα φυτά.



Εικόνα 19. Γενική άποψη των *N. tabacum* και *N. glauca* στο θερμοκήπιο μια εβδομάδα πριν συγκομιστούν

Το μέταλλο προσλήφθηκε από τα φυτά και από τις τρεις συγκεντρώσεις επηρεάζοντας αρνητικά την μορφολογία, την αύξηση και την ανάπτυξη των δυο φυτικών ειδών, ιδιαίτερα στις υψηλές συγκεντρώσεις του στοιχείου, όπου γενικά παρατηρήθηκαν συμπτώματα τοξικότητας.

Τα φυτά του μάρτυρα αναπτύχθηκαν αρκετά και ομοιόμορφα, ενώ μακροσκοπικά δεν παρουσίασαν μορφολογικές ανωμαλίες. Τα κιτρινισμένα φύλλα στη βάση των φυτών είναι αποτέλεσμα φυσιολογικής γήρανσης (Εικ. 22,23).

Η διαβάθμιση των συγκεντρώσεων του μετάλλου, που περιγράφηκε παραπάνω συσχετίζεται καλά με τις χλωρώσεις που παρατηρήθηκαν στα φύλλα των φυτών που έγιναν οι μεταχειρίσεις με το μέταλλο (Εικ. 22,23).

Επίσης και στις τρεις συγκεντρώσεις το κάδμιο, προκάλεσε μεσοενύριες χλωρώσεις και κιτρίνισμα των φύλλων, συμπτώματα που ήταν εντονότερα στα φύλλα της βάσης και εξασθενούσαν προς την κορυφή και τα οποία δεν μπορούν να αποδοθούν αποκλειστικά στη φυσιολογική γήρανση (Εικ. 20,21).



Εικόνα 20. Συμπτώματα φύλλου από φυτά του είδους *N. tabacum* στα οποία έγινε επέμβαση με Cd.



Εικόνα 21. Συμπτώματα φύλλου από φυτά του είδους *N. glauca* στα οποία έγινε επέμβαση με Cd.

Στις μεγάλες συγκεντρώσεις του μετάλλου η χλώρωση των φύλλων επεκτεινόταν υψηλότερα στο βλαστό συγκριτικά με τη μικρή συγκέντρωση και ήταν εντονότερη σε ένταση και έκταση στα ελάσματα των φύλλων (Εικ. 22,23).



Εικόνα 22. Φυτά του είδους *N. tabacum* μετά το πέρας του πειράματος στα οποία έγινε επέμβαση με 0,0, 0,2, 1,0, 2,0 mM Cd

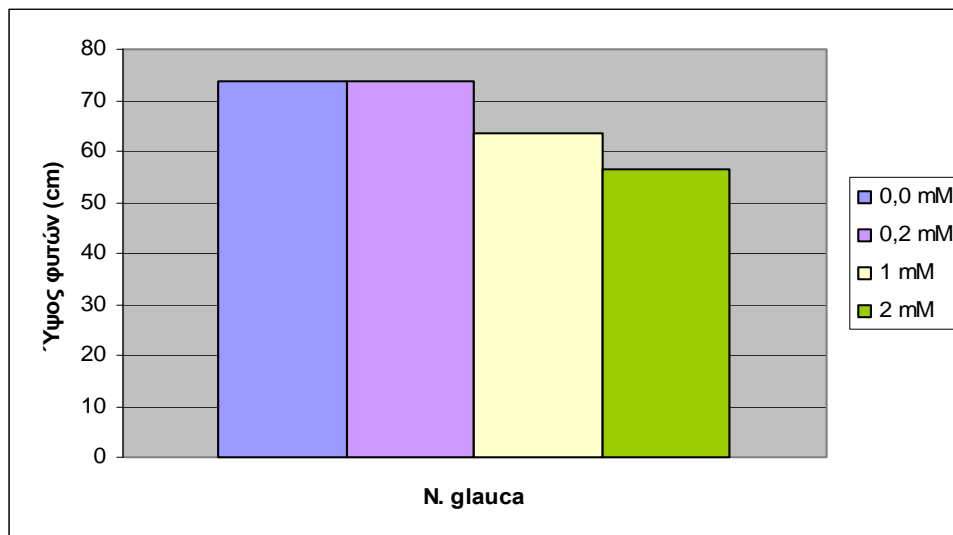


Εικόνα 23. Φυτά του είδους *N. tabacum* μετά το πέρας του πειράματος στα οποία έγινε επέμβαση με 0,0, 0,2, 1,0, 2,0 mM Cd

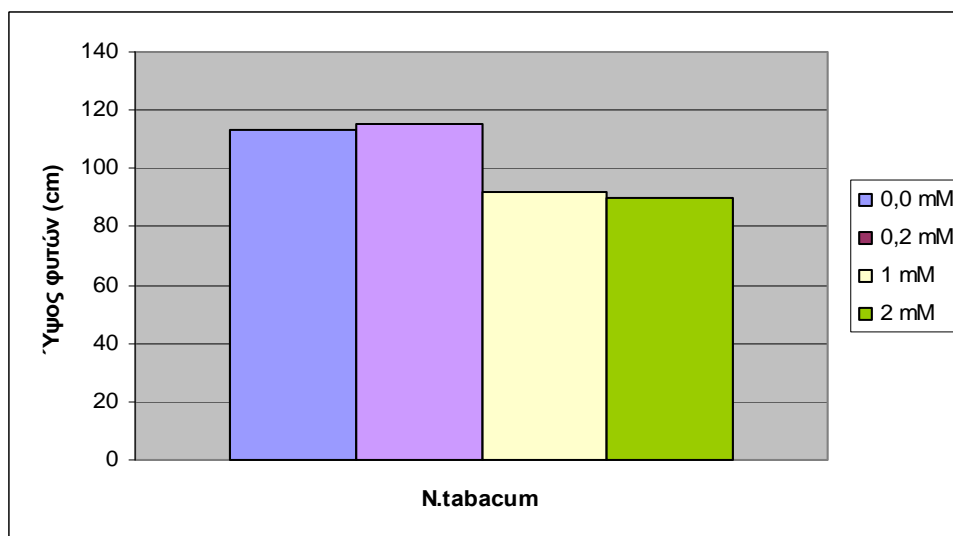
Μεταβολή εντοπίστηκε και σε άλλα μορφολογικά χαρακτηριστικά των φυτών όπως το ύψος, ο αριθμός των φύλλων, τα μεσογονάτια διαστήματα, το φρέσκο βάρος, αλλά και στις ενδογενείς συγκεντρώσεις των φυτών.

3.1.1. Ύψος φυτών

Το ύψος των φυτών επηρεάστηκε αρνητικά και στα δύο φυτικά είδη με τη μεγάλη συγκέντρωση του μετάλλου να παρουσιάζει μείωση του ύψους των φυτών (Εικ. 24,25).



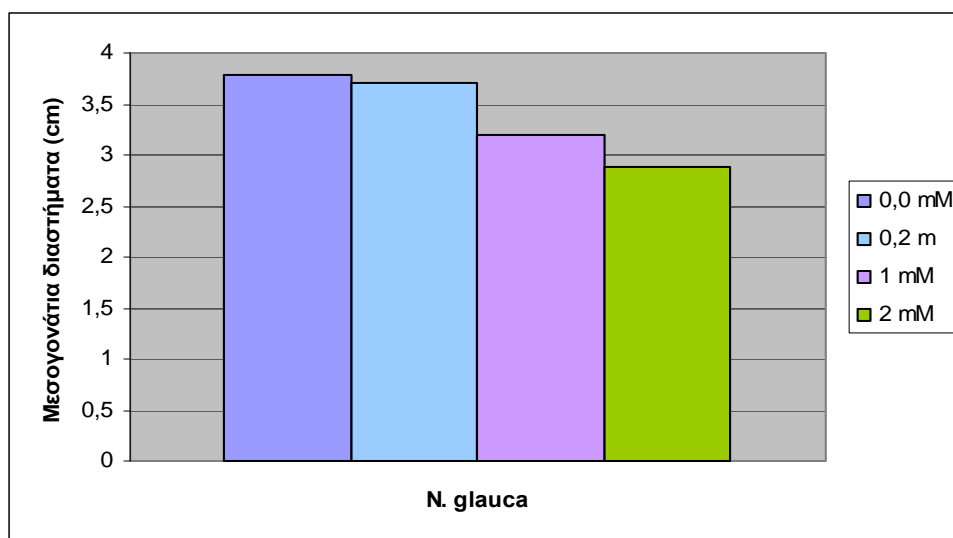
Εικόνα 24: Μεταβολή στο ύψους φυτών *N. glauca* ανά επέμβαση.



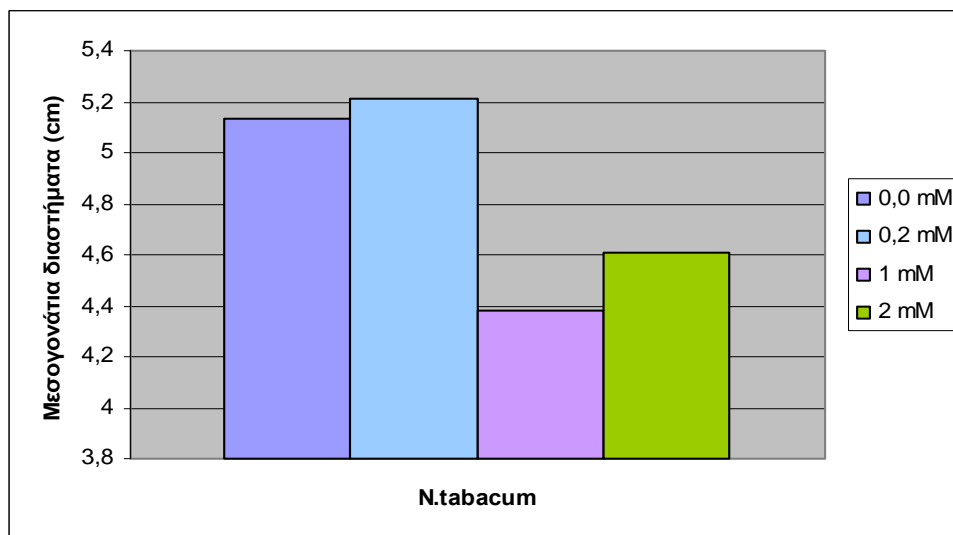
Εικόνα 25: Μεταβολή στο ύψους φυτών *N. tabacum* ανά επέμβαση.

3.1.2. Μεσογονάτια διαστήματα

Με βάση την διαπίστωση ότι οι επεμβάσεις επηρέασαν το ύψος των φυτών αποδεικνύεται ότι επηρέασε αρνητικά και τα μεσογονάτια διαστήματα των φυτών (Εικ. 26,27). Συμαντική ήταν η επίδραση τις μιας εκ των δύο μεγάλων συγκεντρώσεων στα μεσογονάτια διαστήματα του φυτικού είδους *N. tabacum*.



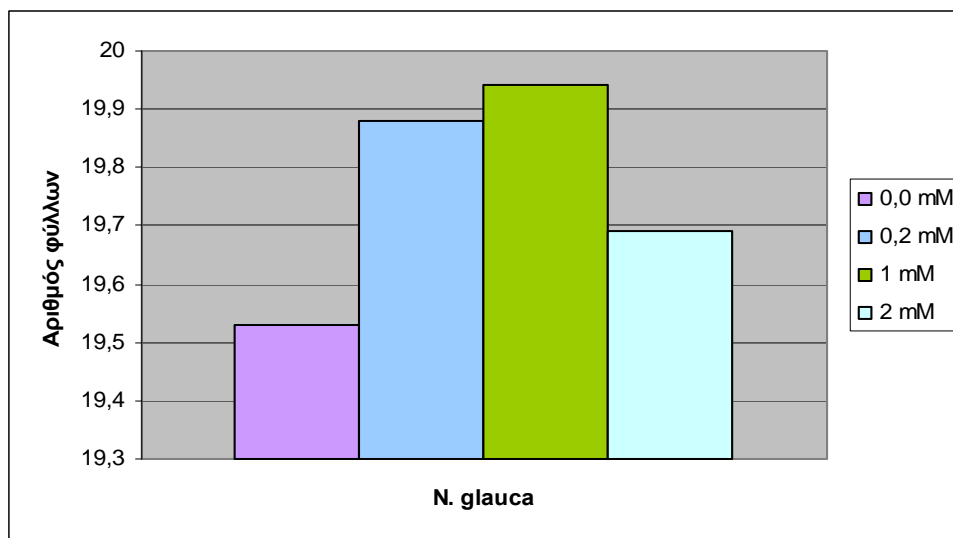
Εικόνα 26: Μεταβολή των μεσογονάτιων διαστημάτων των *N. glauca* ανά επέμβαση.



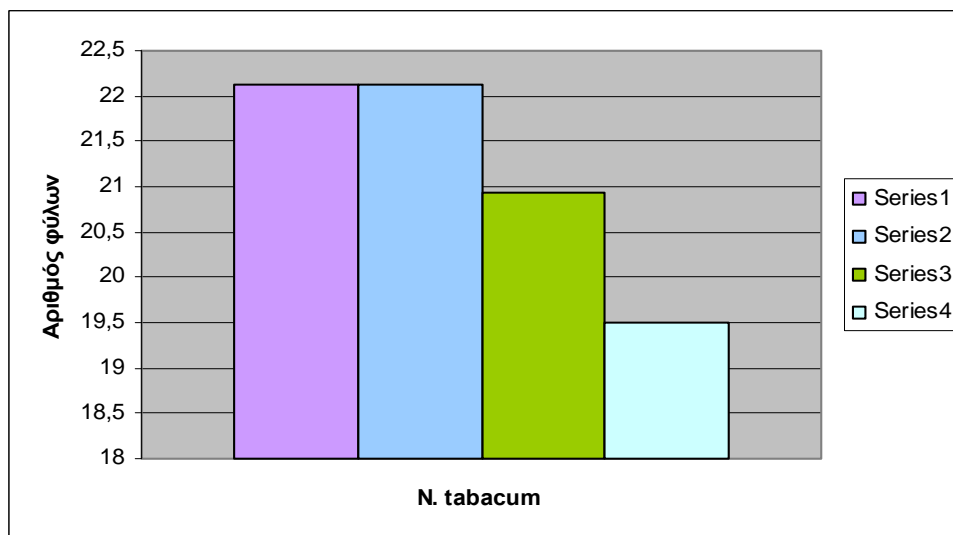
Εικόνα 27: Μεταβολή των μεσογονάτιων διαστημάτων των φυτών *N. tabacum* ανά επέμβαση.

3.1.3. Αριθμός φύλλων

Επιπλέον μεταβολές παρουσιάστηκαν στον αριθμό των φύλλων των φυτών με σημαντικότερη αυτή της μεγάλης συγκέντρωσης να εμφανίζει το μικρότερο αριθμό φύλλων στο φυτικό είδος *N. tabacum* σε σχέση με το μάρτηρα. (Εικ. 29) αλλά όχι σε σχέση με το *N. glauca* που η επίδραση του ματάλλου στον αριθμό των φύλλων του ήταν θετική ειδικά στην μια από τις δύο μεγάλες συγκεντρώσεις (Εικ. 28).



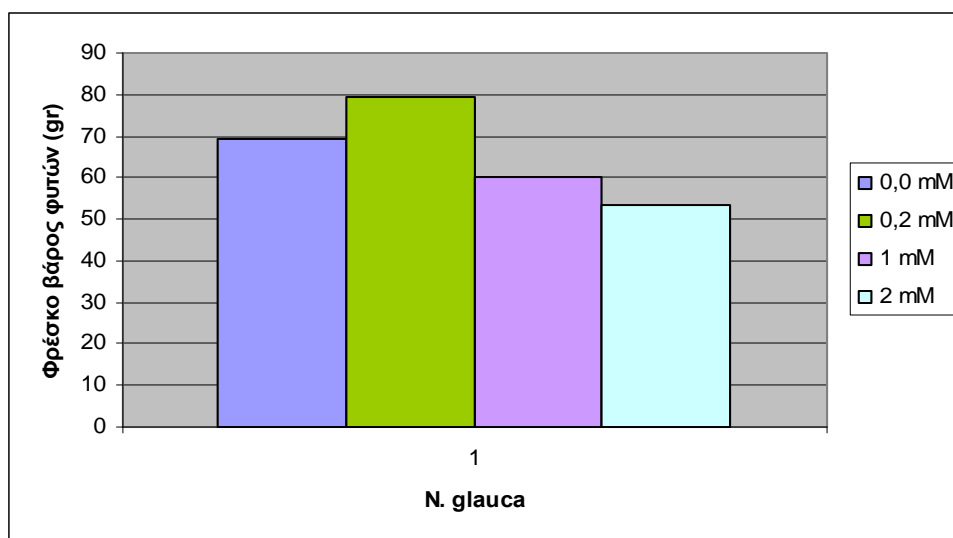
Εικόνα 28: Μεταβολή στον αριθμό των φύλλων φυτών *N. glauca* ανά επέμβαση.



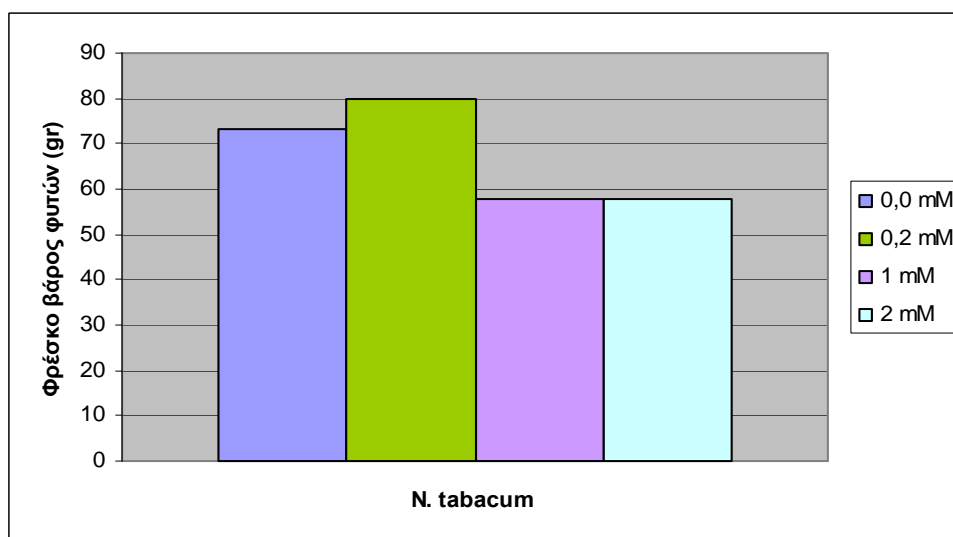
Εικόνα 29: Μεταβολή στον αριθμό των φύλλων φυτών *N. tabacum* ανά επέμβαση.

3.1.4. Φρέσκο βάρος

Ένα ακόμη μορφολογικό χαρακτηριστικό που παρουσίασε μεταβολή ήταν το φρέσκο βάρος των φυτών που επηρεάστηκε και αυτό αρνητικά και από τις δυο υψηλές συγκεντρώσεις και στα δύο φυτικά είδη αλλά όχι από την μικρή που παρουσίασε αύξηση (Εικ. 30,31).



Εικόνα 30: Μεταβολή του φρέσκου βάρους των *N. glauca* ανά επέμβαση.

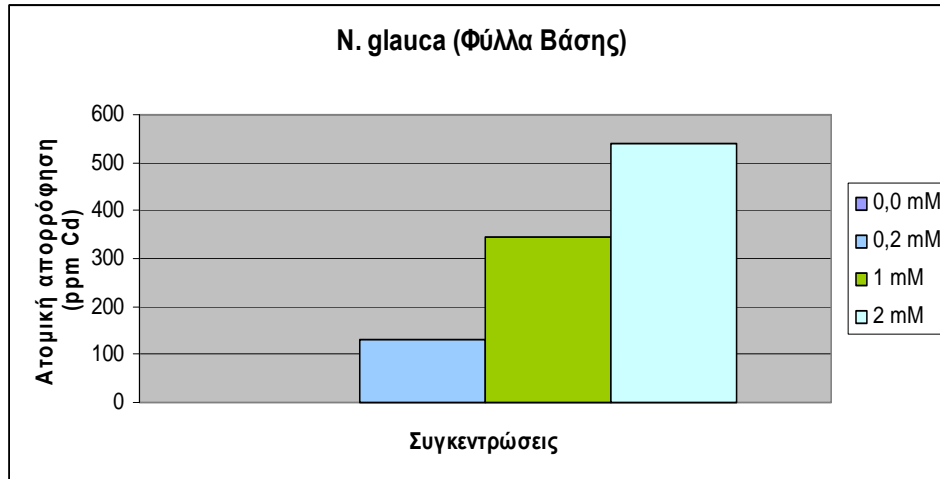


Εικόνα 31: Μεταβολή του φρέσκου βάρους των φυτών *N. tabacum* ανά επέμβαση.

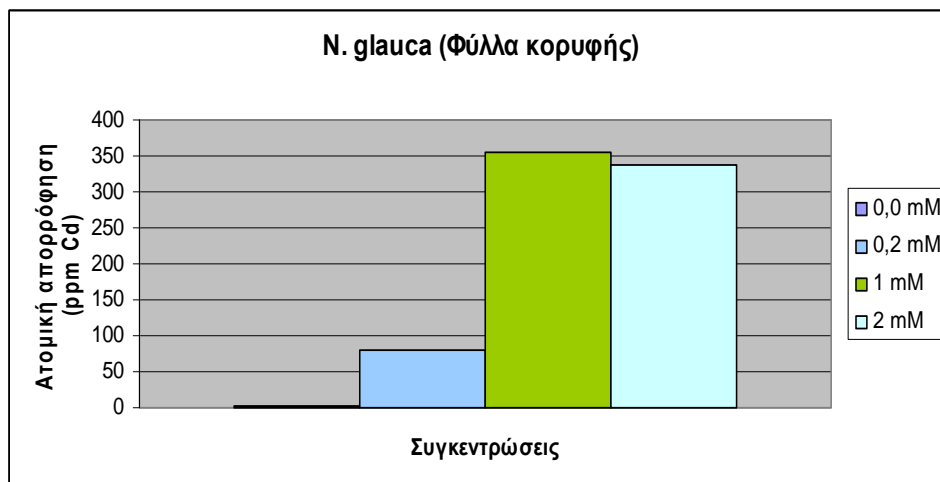
3.1.5. Ενδογενείς συγκεντρώσεις καδμίου

Τα φυτικά είδη παρουσίασαν παρόμοια πρότυπα πρόσληψης και μετακίνησης του καδμίου το οποίο έδειξε κινητικότητα από τις ρίζες στο υπέργειο τμήμα των φυτών. Αυξανόμενη της συγκέντρωσης καδμίου στο υπόστρωμα, παρατηρήθηκε αύξηση της ενδογενούς συγκέντρωσης του στοιχείου σε όλους υπό εξέταση φυτικούς ιστούς, στα δύο φυτικά είδη εντοπίστηκε μεγαλύτερη συγκέντρωση καδμίου στα φύλλα βάσης συγκριτικά με τα φύλλα κορυφής, ιδιαίτερα στο *N. Tabacum* (Εικ.37,38). Στο *N. tabacum* επίσης εντύπωση προκαλεί και το επίπεδο συσώρευσης

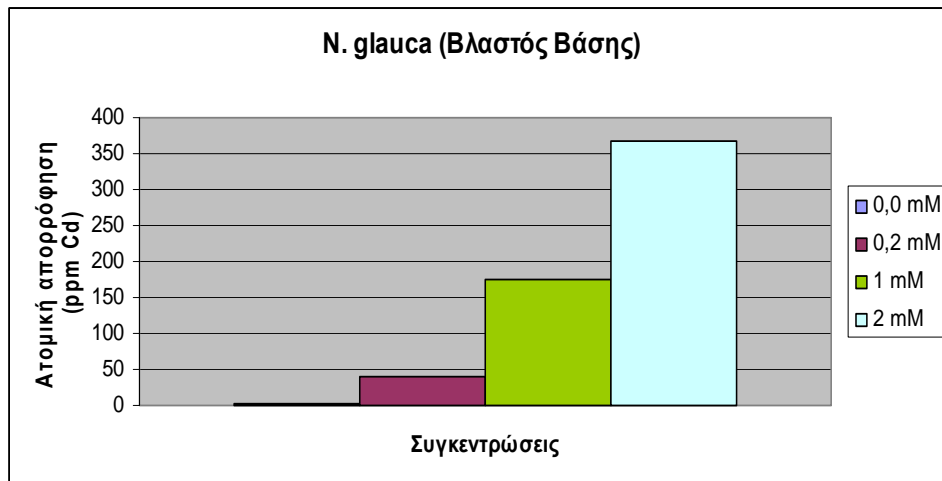
καδμίου στις ρίζες του (Εικ. 41). Στο *N. glauca* ανιχνεύτηκε μεγαλύτερη και σχεδόν ίδια με του *N. tabacum* συσσώρευση στις ρίζες σε σχέση με τα υπόλοιπα μέρη του φυτού (Εικ. 36).



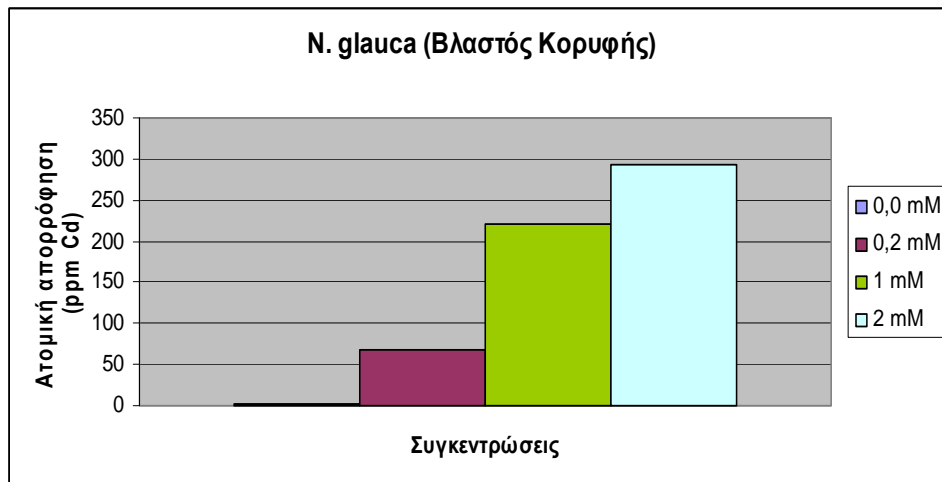
Εικόνα 32: Ενδογενείς συγκεντρώσεις καδμίου στα φύλλα βάσης φυτών *N. glauca*.



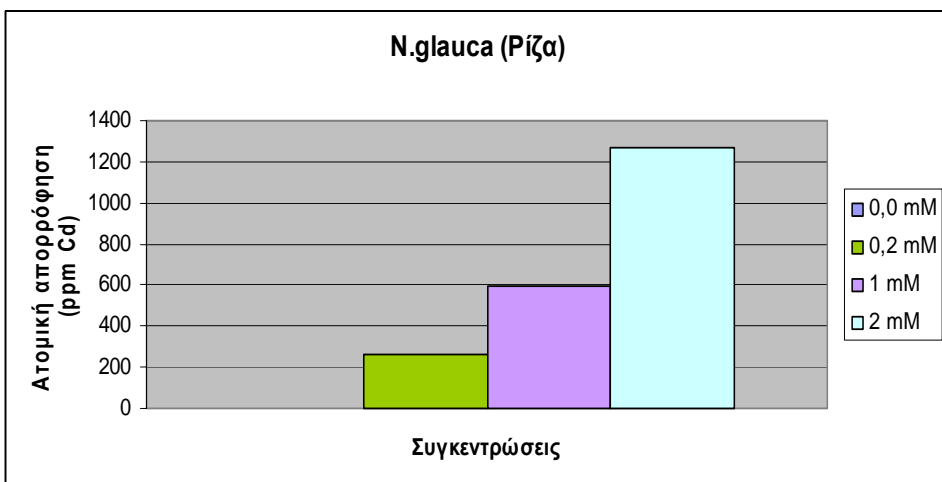
Εικόνα 33: Ενδογενείς συγκεντρώσεις καδμίου στα φύλλα κορυφής φυτών *N. glauca*.



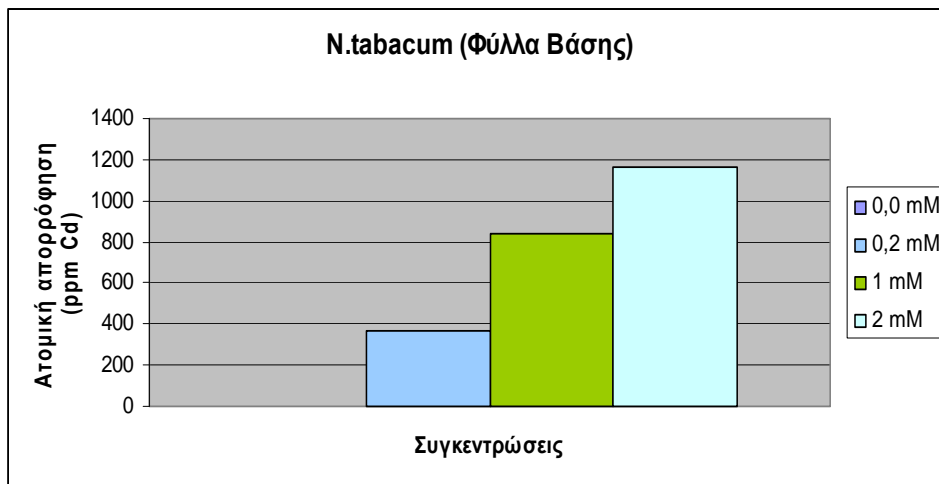
Εικόνα 34: Ενδογενείς συγκεντρώσεις καδμίου στο βλαστό βάσης φυτών *N. glauca*.



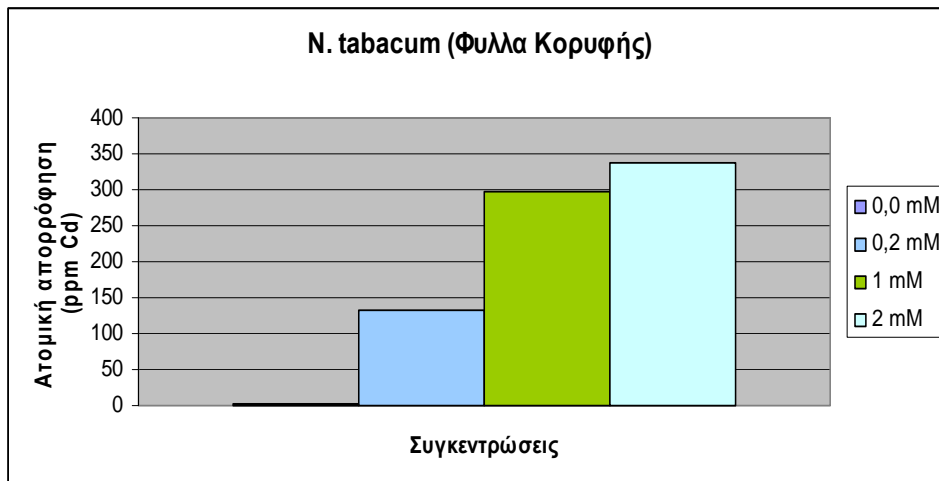
Εικόνα 35: Ενδογενείς συγκεντρώσεις καδμίου στο βλαστού κορυφής φυτών *N. glauca*



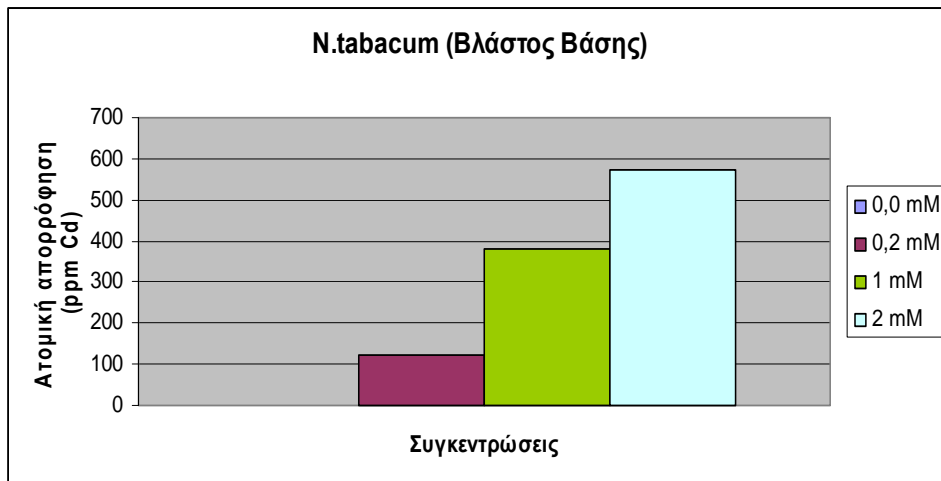
Εικόνα 36: Ενδογενείς συγκεντρώσεις καδμίου ρίζας φυτών *N. glauca*.



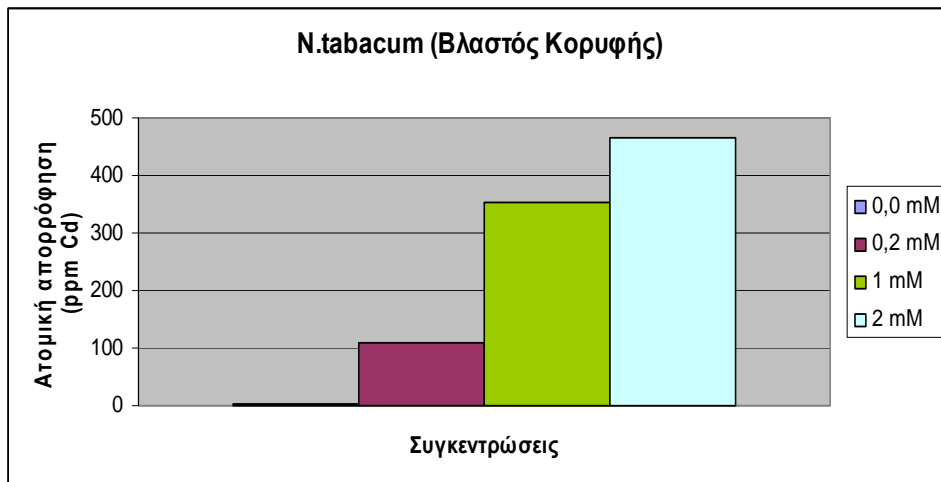
Εικόνα 37: Ενδογενείς συγκεντρώσεις καδμίου στα φύλλα βάσης, των φυτών *N. tabacum*.



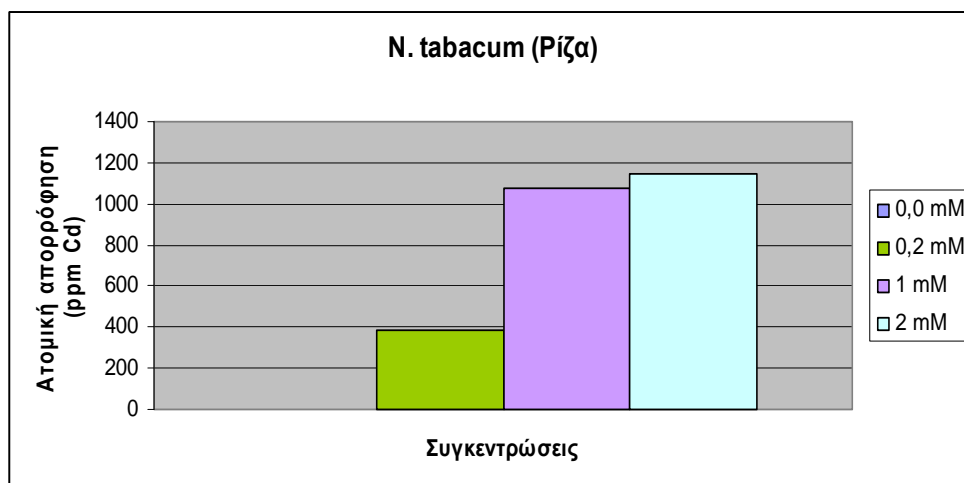
Εικόνα 38: Ενδογενείς συγκεντρώσεις καδμίου στα, φύλλα κορυφής των φυτών *N. tabacum*.



Εικόνα 39: Ενδογενείς συγκεντρώσεις καδμίου στο βλαστό βάσης των φυτών *N. tabacum*.



Εικόνα 40: Ενδογενείς συγκεντρώσεις καδμίου στο βλαστού κορυφής των φυτών *N. tabacum*.

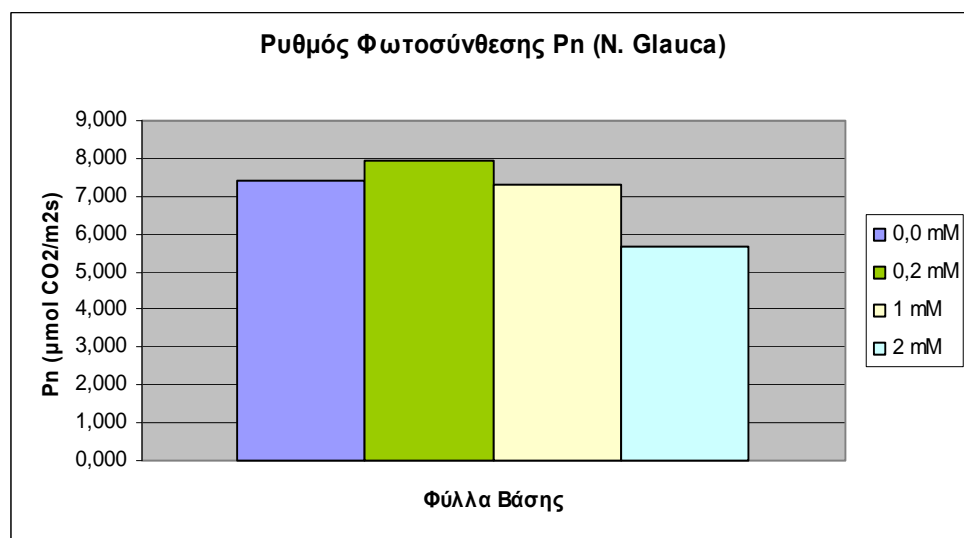


Εικόνα 41: Ενδογενείς συγκεντρώσεις καδμίου στη ρίζα των φυτών *N. tabacum*.

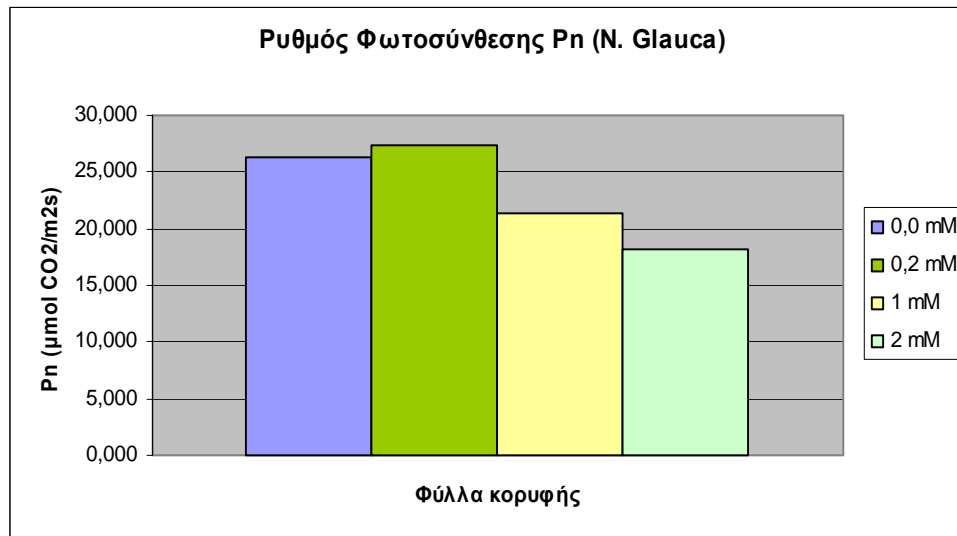
Οι επεμβάσεις καδμίου είχαν αρνητική επίδραση στις φωτοσυνθετικές παραμέτρους των δύο φυτικών ειδών όπως στα επίπεδα χλωροφυλλών, στον επαγωγικό φθορισμό των χλωροφυλλών (Fv/Fm) και στο ρυθμό φωτοσύνθεσης (Pn).

3.1.6. Φωτοσύνθεση

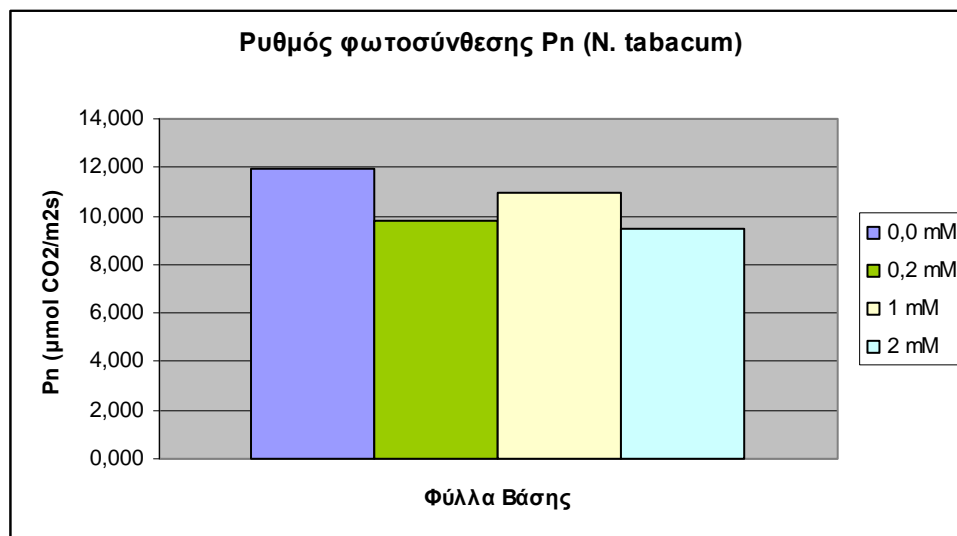
Ο ρυθμός φωτοσύνθεσης παρουσίασε σημαντική μείωση, ιδιαίτερα στα φύλλα κορυφής στη μεγάλη συγκέντρωση καδμίου και στα δύο φυτικά είδη (Εικ. 43,45). Στα φύλλα βάσης δεν παρατηρήθηκε έντονη φωτοσυνθετική δραστηριότητα, γεγονός που μπορεί να οφείλεται όχι μόνο στη παρουσία καδμίου, αλλά και στην φυσιολογική τους γήρανση (Εικ. 42,44).



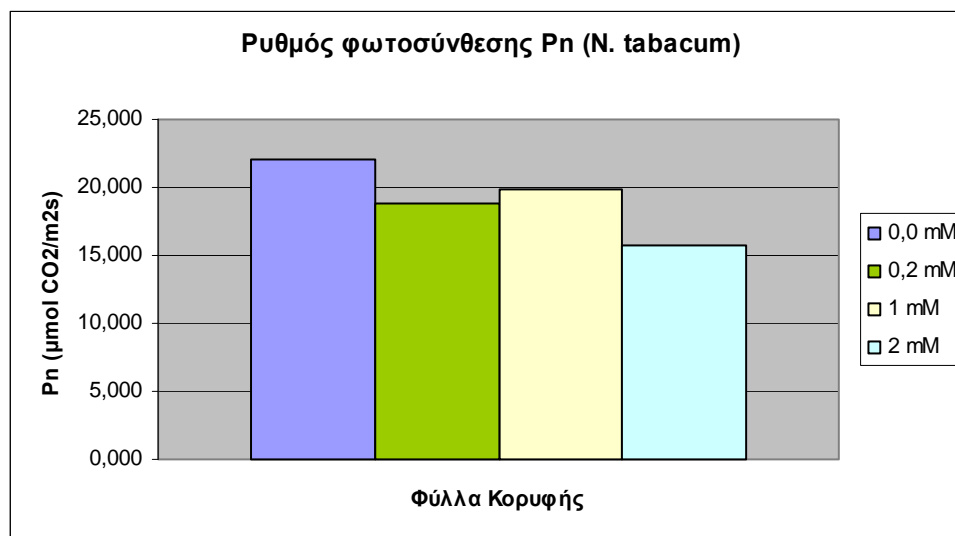
Εικόνα 42: Μεταβολή του ρυθμού φωτοσύνθεσης υπό την επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων καδμίου στα φύλλα βάσης του φυτού *N. glauca*



Εικόνα 43: Μεταβολή του ρυθμού φωτοσύνθεσης υπό την επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων καδμίου στα φύλλα κορυφής του φυτού *N. glauca*



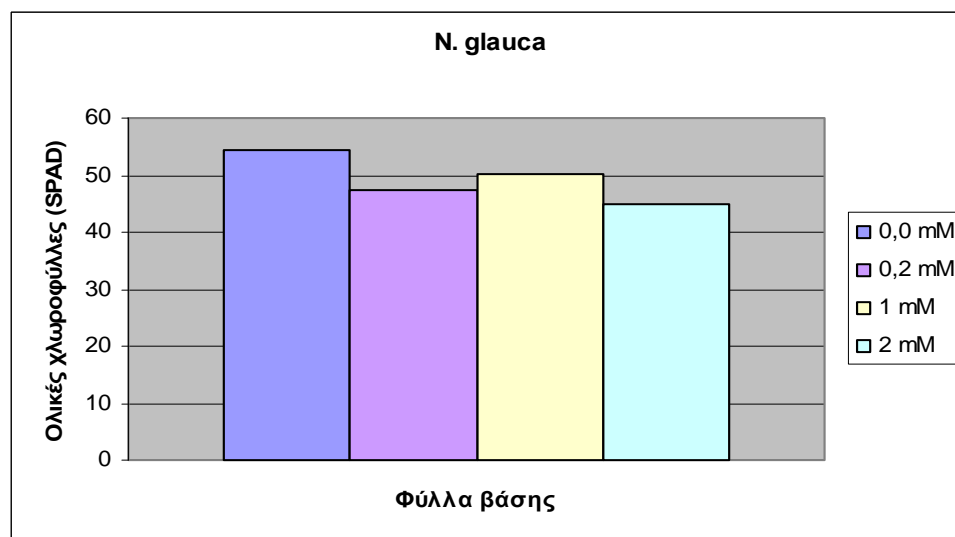
Εικόνα 44: Μεταβολή του ρυθμού φωτοσύνθεσης υπό την επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων καδμίου στα φύλλα βάσης του φυτού *N. tabacum*



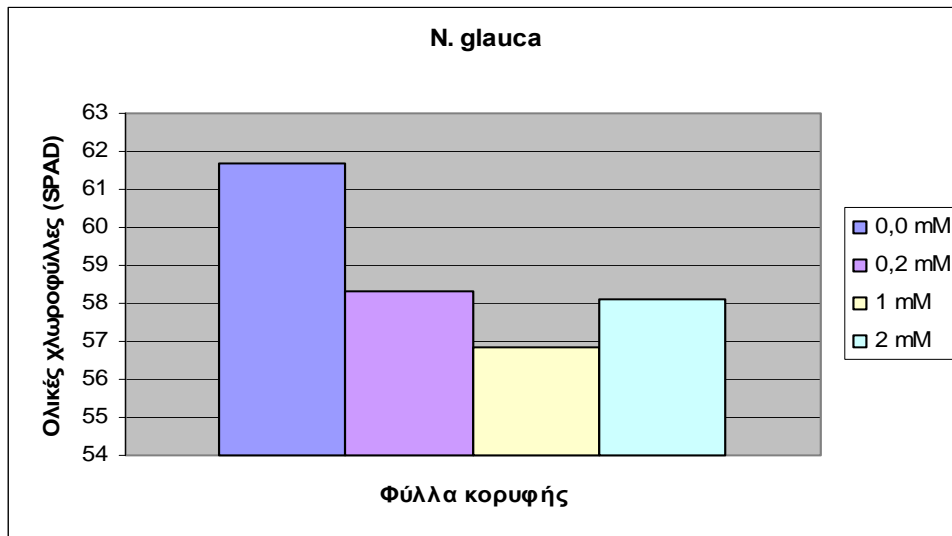
Εικόνα 45: Μεταβολή του ρυθμού φωτοσύνθεσης υπό την επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων καδμίου στα φύλλα κορυφής του φυτού *N. tabacum*

3.1.7. Μέτρηση ολικών χλωροφυλλών

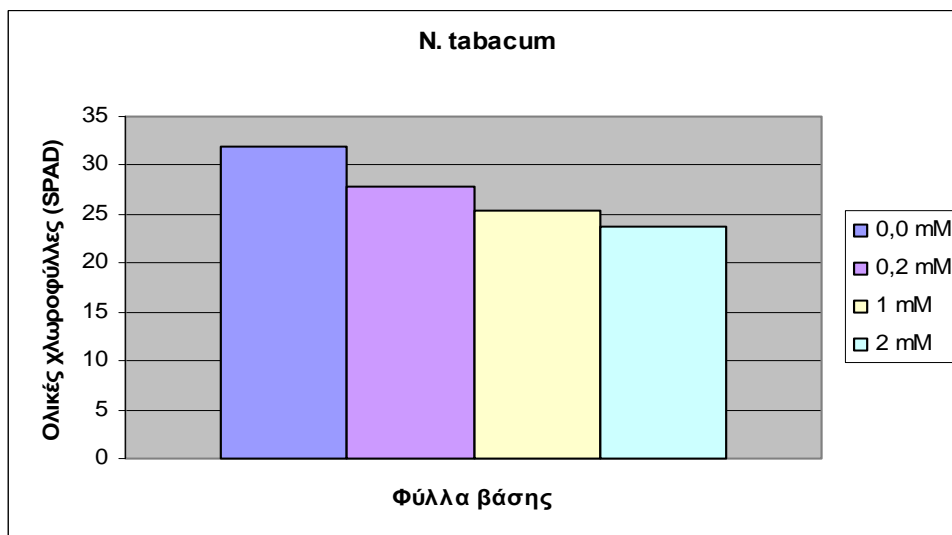
Ο αριθμός ολικών χλωροφυλλών παρουσίασε σημαντική μείωση, ιδιαίτερα στα φύλλα κορυφής στη μεγάλη συγκέντρωση καδμίου και στα δύο φυτικά είδη γεγονός που εξηγεί και τις εκτεταμένες χλωρώσεις που παρατηρήθηκαν στα φυτά (Εικ. 47,49).



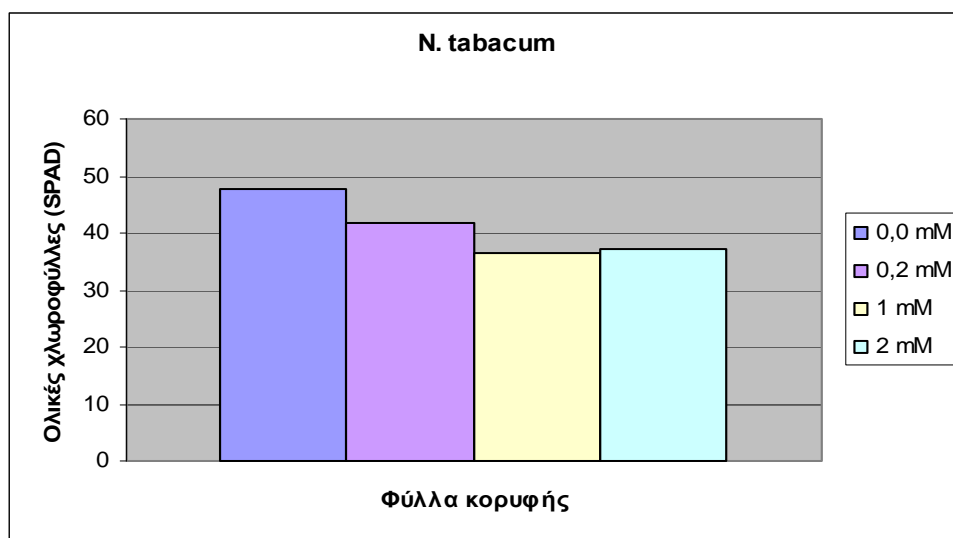
Εικόνα 46: Μεταβολή των ολικών χλωροφυλλών (αυθαίρετες μονάδες SPAD) στα φύλλα βάσης των φυτών *N. glauca* ανά επέμβαση.



Εικόνα α 47: Μεταβολή των ολικών χλωροφυλλών (αυθαίρετες μονάδες SPAD) στα φύλλα κορυφής των φυτών *N. glauca* ανά επέμβαση.



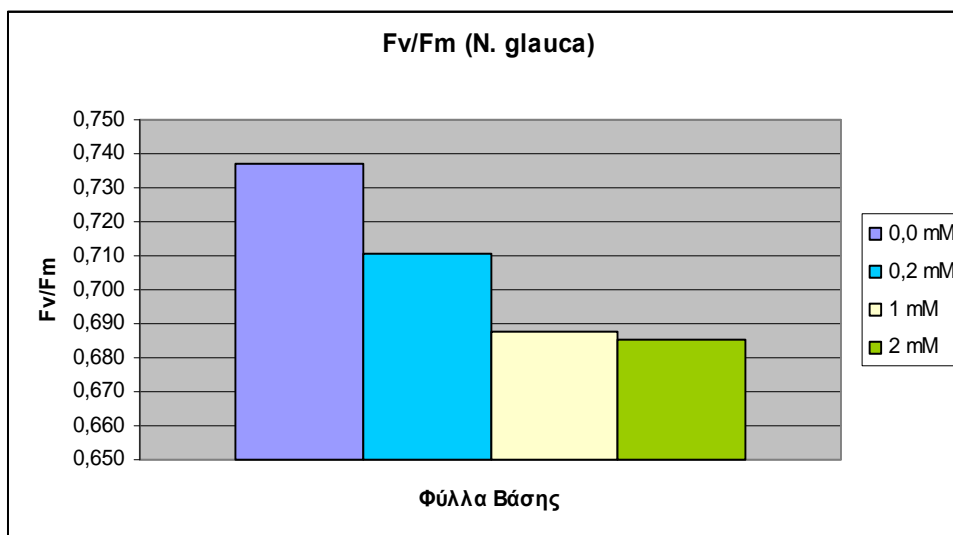
Εικόνα 48: Μεταβολή των ολικών χλωροφυλλών (αυθαίρετες μονάδες SPAD) στα φύλλα βάσης των φυτών *N. glauca* ανά επέμβαση.



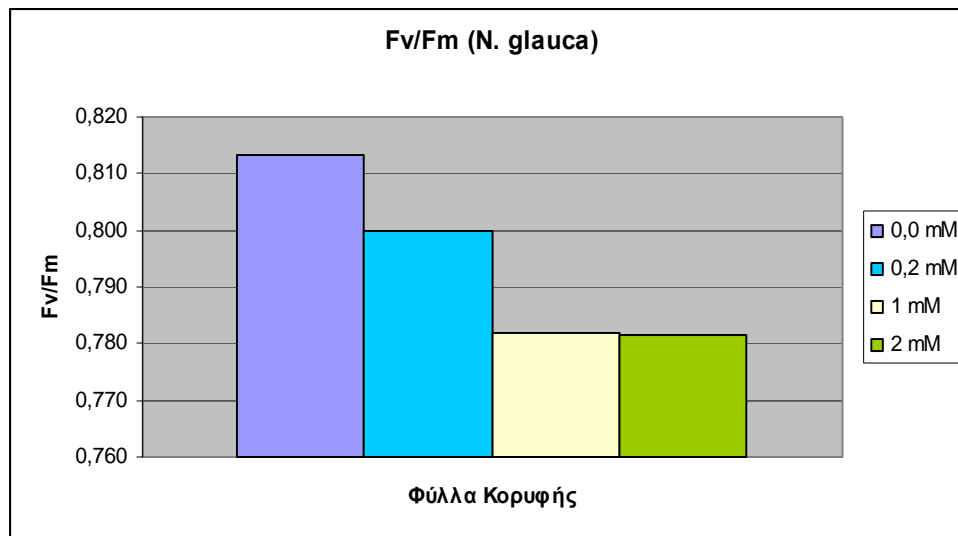
Εικόνα 49: Μεταβολή των ολικών χλωροφυλλών (αυθαίρετες μονάδες SPAD) στα φύλλα κορυφής των φυτών *N. tabacum* ανά επέμβαση.

3.1.8. Επαγωγικός φθορισμός

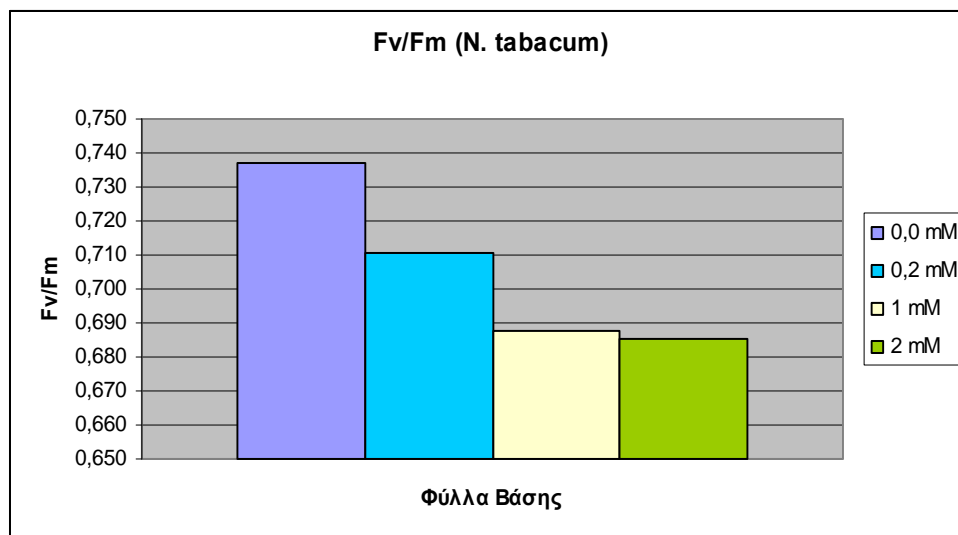
Στον επαγωγικό φθορισμό των χλωροφυλλών παρουσιάστηκε σημαντική μείωση των τιμών, ιδιαίτερα στη μεγάλη συγκέντρωση καδμίου και στα δυο φυτικά είδη, γεγονός που αποδεικνύει την καταπόνηση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (Εικ. 50,51,52,53).



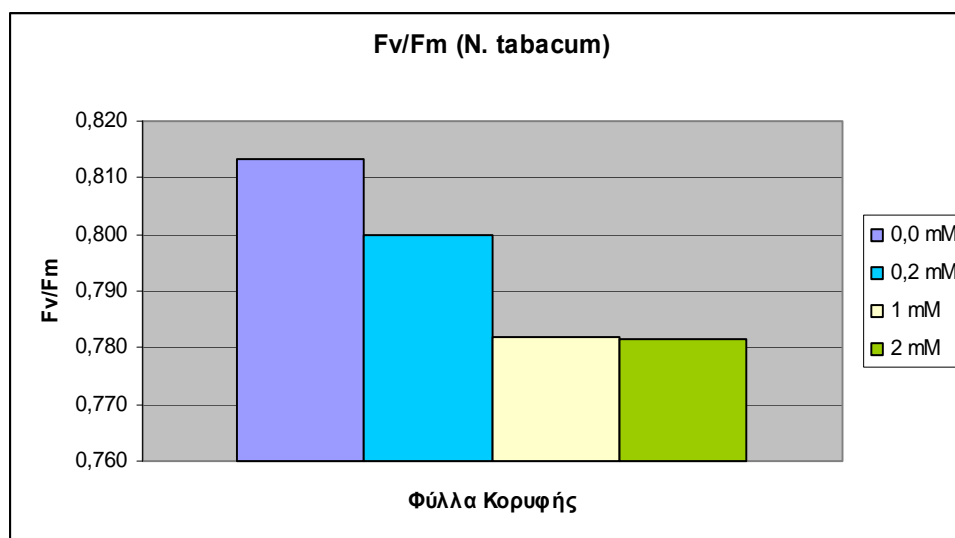
Εικόνα 50: Μεταβολή του φθορισμού της χλωροφύλλης των φύλλων βάσης των φυτών *N. glauca* ανά επέμβαση.



Εικόνα 51: Μεταβολή του φθορισμού της χλωροφύλλης των φύλλων κορυφής των φυτών *N. glauca* ανά επέμβαση.



Εικόνα 52: Μεταβολή του φθορισμού της χλωροφύλλης των φύλλων βάσης των φυτών *N. tabacum* ανά επέμβαση.



Εικόνα 53: Μεταβολή του φθορισμού της χλωροφύλλης των φύλλων κορυφής των φυτών *N. tabacum* ανά επέμβαση.

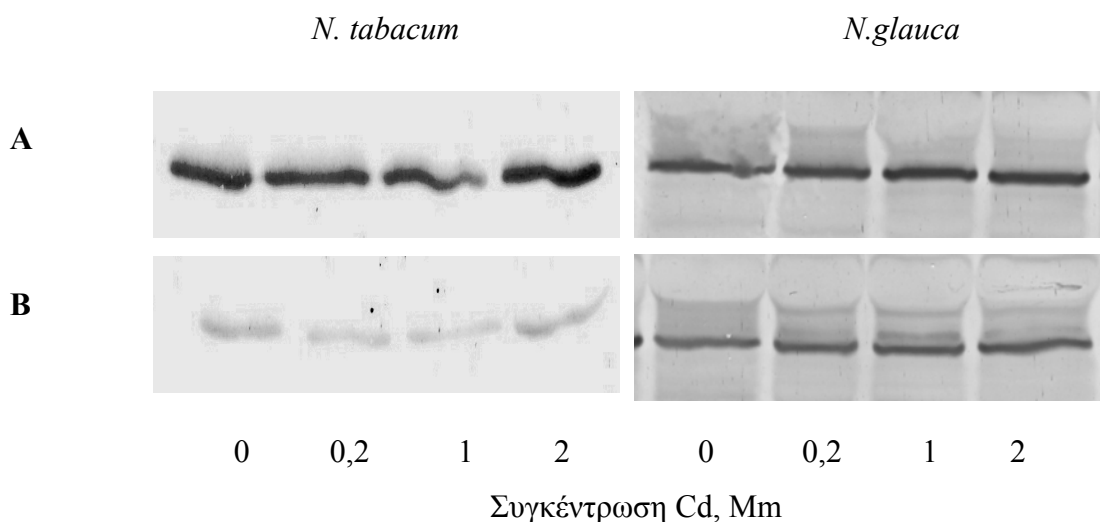
3.2. Επίδραση του καδμίου (Cd) σε βιοχημικά χαρακτηριστικά του φυτικού είδους *Nicotiana tabacum*

Από τα μεσαία φύλλα των φυτών που είχαν φυλαχθεί στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ έγινε εκχύλιση ολικών πρωτεϊνών και τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα που προέκυψαν χρησιμοποιήθηκαν για το χαρακτηρισμό του ενζύμου GDH GS και της Fd-GOGAT των φυτών του *N. tabacum* και *N. glauca*. Στα εκχυλίσματα έγινε ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Lowry, για να εκτιμηθεί η σχετική περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων κάθε δείγματος σε πρωτεΐνες και στην συνέχεια ίση ποσότητα ολικών πρωτεϊνών από κάθε δείγμα μετουσιώθηκε και ηλεκτροφορήθηκε με SDS-PAGE σε επίπεδα πηκτώματα 10% ακρυλαμίδης, με σκοπό την ανάλυση των επιμέρους πρωτεϊνικών ζωνών. Το πρωτεϊνικό πρότυπο κάθε δείγματος, προέκυψε μετά την χρώση του πηκτώματος με Coomassie Brilliant Blue R-250. Για τη μελέτη των ενζύμων της γλουταμικής αφυδρογονάσης (GDH), γλουταμινικής συνθετάσης (GS) και γλουταμικής συνθάσης(Fd-GOGAT), τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα που αναλύθηκαν με SDS-PAGE, υποβλήθηκαν σε Western Blot (με τη μέθοδο αυτή οι πρωτεΐνες μεταφέρονται από το πήκτωμα σε σταθερό υπόστρωμα, στην προκειμένη περίπτωση σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, όπου στη συνέχεια μπορεί εύκολα να ανιχνευτεί μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη, από το σύνολο

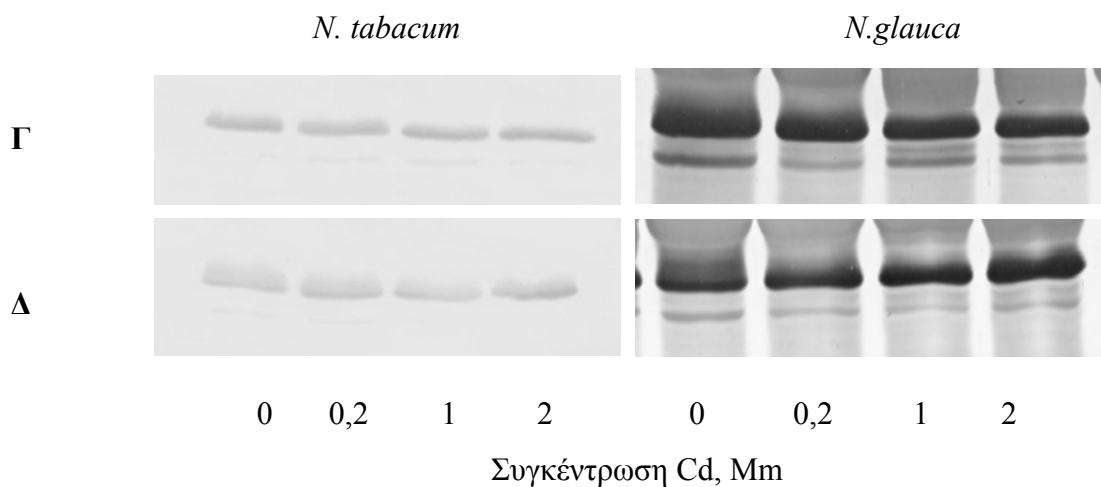
των πρωτεϊνών που έχουν αναλυθεί) και ανιχνεύτηκαν ανοσολογικά. Η ανοσοανίχνευση έγινε με τη βοήθεια αντισωμάτων κουνελιού.

3.2.1. Έκφραση των ενζύμων αφομοίωσης των αμμωνιακών ιόντων σε φυτά *N. Tabacum* και *N. glauca*.

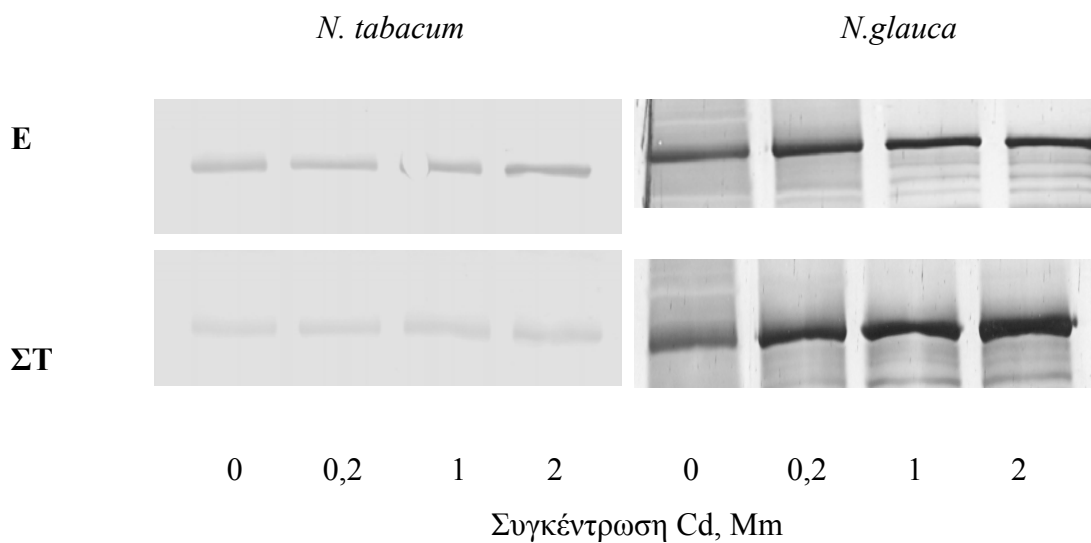
Η συγκέντρωση του Cd στο υπόστρωμα καλλιέργειας οδήγησε σε διαφοροποιημένα πρότυπα έκφρασης των ενζύμων που σχετίζονται με την αφομοίωση των αμμωνιακών ιόντων στη φυτά. Η ανοσοεντοπιζόμενες πρωτεΐνες GS και Fd-GOGAT παρουσίασαν σχετικά σταθερές με τάση μείωσης τιμές στις υψηλές συγκεντρώσεις του μετάλλου, ενώ αντίθετα, η συγκέντρωση του Cd φαίνεται να σχετίζεται θετικά με τα επίπεδα του ενζύμου GDH. (Εικόνα 54,55,56).



Εικόνα 54: Ανοσοανιχνεύσιμη πρωτεΐνη των GDH σε φύλλα βάσης (A) και κορυφής (B), των *N. tabacum* και *N. glauca*, ανεπτυγμένο σε τεχνητό υπόστρωμα, παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων καδμίου.



Εικόνα 55: Ανοσοανιχνευόμενη πρωτεΐνη GS σε φύλλα βάσης (Γ) και κορυφής (Δ), των *N. tabacum* και *N. glauca* ανεπτυγμένο σε τεχνητό υπόστρωμα, παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων καδμίου.



Εικόνα 56: Ανοσοανιχνευόμενη πρωτεΐνη GOGAT σε φύλλα βάσης (Ε) και κορυφής (ΣΤ) των *N. tabacum* και *N. glauca*, ανεπτυγμένο σε τεχνητό υπόστρωμα, παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων καδμίου.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η εργασία αυτή έγινε με σκοπό τη μελέτη της επίδρασης των βαρέων μετάλλων καδμίου, σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις στο νερό άρδευσης, σε μορφολογικές και βιοχημικές παραμέτρους της ανάπτυξης φυτών καλλιεργούμενου *N. tabacum* και άγριου *N. glauca* καπνού εγκατεστημένων σε γλάστρες στο θερμοκήπιο. Επιλέχθηκαν για τη μελέτη ένα καλλιεργούμενο φυτό και ένα συγγενικό του (του ίδιου γένους) αυτοφυές, με δυναμικό υπερσυσσώρευσης βαρέων μετάλλων, για να συγκριθούν οι αποκρίσεις τους στο παραπάνω μέταλλο.

Το μέταλλο προσλήφθηκε και από τα δύο φυτικά είδη σε όλες τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν.

Το μέταλλο ανιχνεύθηκε σε υψηλότερα επίπεδα στα φύλλα του καλλιεργούμενου καπνού από ότι του άγριου (Εικ. 32,33,38,39). Πιο συγκεκριμένα το Cd, στην επέμβαση των 1mM και 2 mM εντοπίστηκε μεγαλύτερη συγκέντρωση καδμίου στα φύλλα της βάσης συγκριτικά με τα φύλλα της κορυφής, ιδιαίτερα στο *N. Tabacum* (Εικ. 38,39). Στο *N. glauca* ανιχνεύτηκε μεγαλύτερη συσσώρευση στις ρίζες (Εικ. 37), ενώ στο *N. tabacum* στα φύλλα βάσης και στις ρίζες. (Εικ. 38,42). Ο άγριος καπνός έχει χρησιμοποιηθεί σε πειράματα φυτοεξυγίανσης ως υπερσυσσωρευτής εξαιτίας της γρήγορης ανάπτυξής του, της μεγάλης βιομάζας του και της προσαρμοστικότητας του στις περιβαλλοντικές συνθήκες (Barazani et al., 2004).

Στον καλλιεργούμενο καπνό ενώ οι μεγάλες συγκεντρώσεις των δύο μετάλλων επηρέασαν αρνητικά το ύψος των φυτών, τον αριθμό των φύλλων, το φρέσκο βάρος αλλά και τα μεσογονάτια (φαίνονται και στις Εικόνες) η μικρή συγκέντρωση διατηρούσε τα ίδια ίσως και παραπάνω επίπεδα τιμών με το μάρτυρα επιδρώντας θετικά στα μορφολογικά κυρίως χαρακτηριστικά.

Η ένταση και η έκταση των χλωρώσεων που παρατηρήθηκαν μακροσκοπικά στα φύλλα των δύο ειδών, συσχετίζονται πολύ καλά με τις τιμές των ολικών χλωροφυλλών που προσδιορίστηκαν και με τις συγκεντρώσεις του μετάλλου. Η αναστολή των ενζύμων βιοσύνθεσης των χλωροφυλλών και οι χλωρώσεις που έχει σαν αποτέλεσμα, αποτελούν τυπικές επενέργειες του Cd (Haag-Kerwer et al., 1999, Panou-Filotheou et al., 2001, Gharbi et al., 2005).

Ο επαγωγικός φθορισμός των χλωροφυλλών (ο λόγος Fv/Fm, δείκτης της φωτοχημικής απόδοσης της φωτοσύνθεσης) και στα δυο φυτικά είδη δεν επηρεάστηκε από τις χαμηλές συγκεντρώσεις Cd και μόνο η υψηλή συγκέντρωση του Cd μείωσε το λόγο σε σχέση με τον μάρτυρα ειδικά στον άγριο καπνο, υποδεικνύοντας καταπόνηση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού.

Το μέταλλο προκάλεσε σημαντικές αλλαγές γενικότερα στη γονιδιακή έκφραση των δύο φυτικών ειδών, αλλαγές οι οποίες ανιχνεύθηκαν από τη διαφοροποίηση του προτύπου των ολικών πρωτεϊνών, μετά από μίας διάστασης αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση. Πιο συγκεκριμένα, επαγωγή των μεταλλοθειονινών και του ενζύμου της συνθάσης των φυτοχλατινών προκαλούν όλα τα βαρέα μέταλλα σε όλα τα φυτικά είδη (Cobbett, 2000 και οι αναφορές εκεί) ενώ πολλά ένζυμα στο μεταβολισμό του αζώτου επάγονται ή καταστέλλονται από βαρέα μέταλλα (Chugh et al., 1992, Ju et al., 1997, Llorens et al., 2000, Gouia et al., 2000, 2003).

Στην παρούσα μελέτη το Cd αύξησε την ανοσοανιχνεύσιμη πρωτεΐνη της γλουταμικής αφυδρογονάσης στον καλλιεργούμενο καπνό ενώ τη μείωσε στον άγριο (Εικ. 55), ταυτόχρονα οι πρωτεΐνες GS και GOGAT παρουσίασαν σχετικά σταθερές με τάση μείωσης τιμές στις υψηλές συγκεντρώσεις.

Συμπερασματικά, το Cd προκάλεσε σημαντικές αλλαγές σε όλες τις παραμέτρους ανάπτυξης των δύο φυτικών ειδών που μελετήθηκαν και οι οποίες συσχετίζονται με την απορρόφηση και συσσώρευση των μετάλλων στους φυτικούς ιστούς. Ο καλλιεργούμενος καπνός, παρόλο που συσσώρευσε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των μετάλλων συγκριτικά με τον άγριο επηρεάστηκε λιγότερο, γεγονός που αποδίδεται από την βιβλιογραφία στην ύπαρξη μηχανισμού αποτοξίνωσης των μετάλλων ο οποίος συνδέεται με την αυξημένη σύνθεση χηλικών των μετάλλων ενώσεων (μεταλλοθειονίνες και φυτοχλατίνες – πεπτιδία πλούσια σε κυστεΐνη και γλουταμικό, Cobbett, 2000). Έτσι ίσως εξηγείται και η επαγωγή της πρωτεΐνης της GDH τουλάχιστον στον καλλιεργούμενο καπνό, προκειμένου να αναπληρώσει τα αποθέματα του γλουταμικού που χρησιμοποιείται για την σύνθεση των προαναφερθέντων πεπτιδίων.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Avi Golan-Goldhirsh Heavy metal accumulation by *Nicotiana glauca* Barazani, O., Sathiyamoorthy, P., Manandhar, U., Vulkan, R., Golan-Goldhirsh, A., 2004. Heavy metal accumulation by *Nicotiana glauca*
- Boominathan, R., Doran, P.M., 2003. Cadmium tolerance and antioxidative defenses in hairy roots of the cadmium hyperaccumulator, *Thlaspi caerulescens*. *Biotechnol. Bioeng.*
- Boussama, N., Ouariti, O., Suzuki, A., Ghorbal, M.H., 1999. Cd-stress on nitrogen assimilation. *J. Plant Physiol.*
- Brooks, R.R., M.F. Chambers, L.J. Nicks and B.H. Robinson, 1998. *Phytomining. Trends Plant Sci.*
- Cadmium exposure in *Brassica juncea* causes a decline in transpiration rate and leaf expansion without effect on photosynthesis. *Journal of Experimental Botany.*
- Chen, L.M., Lin, C.C., Kao, C.H., 2000. Copper toxicity in rice seedlings: Changes in antioxidative enzyme activities H₂O₂ level, and cell wall peroxidase activity in roots. *Botanical Bulletin of Academia Sinica.*
- Chugh, L.K., Gupta, V.K., Sawhney, S.K., 1992. Effect of cadmium on enzymes of nitrogen metabolism in pea seedlings. *Phytochemistry.*
- Clemens, S., M.G. Palmgren, and U. Kramer, 2002. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends Plant Sci.*
- Cobbett, C.S., 2000. *Phytochelatin and Their Roles in Heavy Metal*
- 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.*
- Cunningham, S.D., Anderson, T.A., Schwab, A.P., Hsu, F.C., 1996. *Detoxification. Plant Physiology.*
- Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. Advances in Agronomy.*

Δρ. Θρασύβουλος Μανιός ΡΥΠΑΝΣΗ ΚΑΙ ΜΟΛΥΝΣΗ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

και Σημειώσεις Βιοτεχνολογία και Περιβάλλον.

Gharbi, F., Rejeb, S., Ghorbal, M.H., Morel, J.L., 2005. Plants Response to Copper Toxicity as Affected by Plant Species and Soil Type. *Journal of Plant Nutrition*.

Gouia, H., Ghorbal, M.H., Meyer, C., 2000. Effects of cadmium on activity of nitrate reductase and on other enzymes of the nitrate assimilation pathway in bean. *Plant Physiol. Biochem.*

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. Plant Physiol.*

Gouia, H., Suzuki, A., Brulfert, J., Ghorbal, M.H., 2003. Effects of cadmium on nitrogen and carbon metabolism in bean seedlings..

Haag-Kerwer, A., Schafer, H.J., Heiss, S., Walter, C., Rausch, T., 1999..

Hernandez, L.E., Garate, A., Carpena-Ruiz, R., 1997. Effects of cadmium on the uptake, distribution and assimilation of nitrate in *Pisum sativum*. *Journal of Plant Physiology*

Ju, G.C., Li, X.Z., Rauser, W.E., Oaks, A., 1997. Influence of cadmium on the production of γ -glutamylcysteine peptides and enzymes of nitrogen assimilation in *Zea mays* seedlings. *Physiologia Plantarum*.

Kneer, R., Zenk, M.H., 1992. Phytochelatins protect plant enzymes from heavy metal poisoning. *Phytochemistry*.

Κονσολάκης Γ., (2004) πτυχιακή εργασία: επίδραση βαρέων μετάλλων στα ένζυμα αφομοίωσης του ανόργανου αζώτου σε ιστοκαλλιέργειες αγγουριάς

Krause, G.H., Weis, E., 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The Basics. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biologi.*

Λ. Ζαμπετάκης, Θ. Μανιός, Γ. Καρατζάς, Καινοτομικές μεθόδους εξυγίανσης ρυπασμένων εδαφών και υπόγειων υδάτων. Η τεχνολογία της Φυτοεξυγίανσης.

- Lea, J.P., and R.C. Leegood, 1993. Plant Biochemistry and Molecular Biology. John Wiley & Sons Ltd. England.
- Llorens, N., Arola, L., Blade, C., Mas, A., 2000. Effects of copper exposure upon nitrogen metabolism in tissue cultured *Vitis vinifera*. Plant Science.
- Λουλακάκης, Κ.Α., 2004. Βιοτεχνολογία Φυτών Ασκήσεις Εργαστηρίου. Τ.Ε.Ι. Κρήτης, Σ.Τ.Ε.Γ.. Ηράκλειο.
- Loulakakis, K.A., Roubelakis-Angelakis, K.A., 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.
- Loulakakis, K.A., Roubelakis-Angelakis, K.A., 1992. Ammonium-induced increase in NAD(H)-glutamate dehydrogenase activity is caused by de novo synthesis of the α-subunit. Planta.
- Loulakakis, K.A., and K.A. Roubelakis-Angelakis, 1996a. The seven NAD(H)-glutamate dehydrogenase isoenzymes exhibit similar anabolic and catabolic activities. Plant Physiol.
- 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.
- 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.
- Loulakakis, K.A., and K.A. Roubelakis-Angelakis, 2000. Enzymes of ammonia assimilation in *Vitis vinifera*. Acta Hort.
- Mahboobi, H., Yucel, M., Oktem, H.A., 2002. Nitrate reductase and glutamate dehydrogenase activities of resistant and sensitive cultivars of wheat and Boron toxicity. Journal of plant nutrition.
- Μαρουλάκη, Μ. Ι., 2003. Επίδραση βαρέων μετάλλων (ψευδαργύρου και μολύβδου) στα ένζυμα αφομοίωσης αζώτου των φυτικών ειδών αγγουριάς (*Cucumis sativus*) και πιπεριάς (*Capsicum annuum*). Πτυχιακή εργασία, ΤΕΙ Κρήτης, Ηράκλειο.

- Mejare, M. and L. Bulow, 2001. Metal-binding proteins and peptides in bioremediation and phytoremediation of heavy metals. Trends Biotechnol.
- Panou-Filothou, H., Bosabalidis, A.M., Karataglis, S., 2001. Effects of Copper Toxicity on Leaves of Oregano (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*). Annals of Botany.
- Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, Α.Κ., 2003. Φυσιολογία Φυτών. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο.
- Salt, D.E., R.D. Smith and I. Raskin, 1998. Phytoremediation. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.
- Sandalio, L.M., H.C. Dalurzo, M. Gomez, M.C. Romero-Puertas and L.A. del Rio, 2001. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. J. Exp. Bot.
- Sharma, S.S., Dietz, K.J., 2006. The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. Journal of Experimental Botany.
- Singer, A.C., D.E. Crowley and I.P. Thompson, 2003. Secondary plant metabolites in phytoremediation and biotransformation. Trends Biotechnol.
- Syntichaki, K.M., Loulakakis, K.A., Roubelakis-Angelakis, K.A., 1996. The amino-acid sequence similarity of plant glutamate dehydrogenase to the extremophilic archaeal enzyme conforms to its stress-related function. Gene.