

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Τμήμα ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

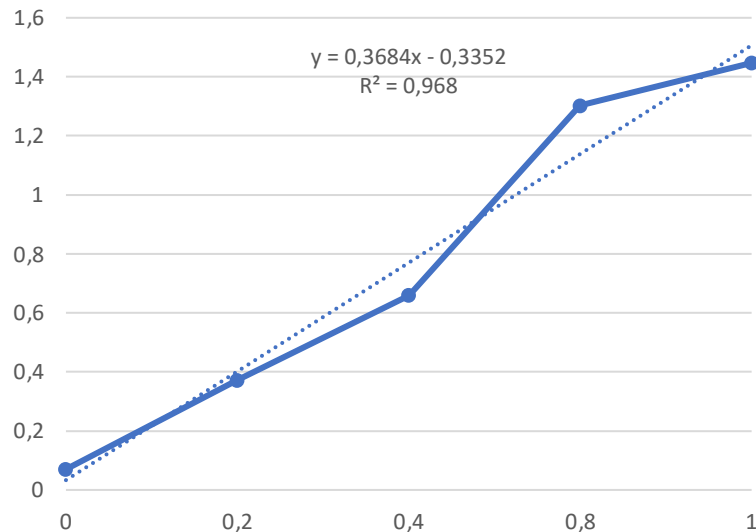
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ

ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΣΚΗΣΗ
«ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΦΩΣΦΑΤΑΣΩΝ ΣΤΟ ΕΔΑΦΟΣ»

Δημήτριος Καρούζας, Καθηγητής (dkarrouzas@bio.uth.gr)
Παναγιώτης Καράς, Ακαδημαϊκός Υπότροφος (pkaras@bio.uth.gr)

ΛΥΣΗ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΡΥΘΜΟΥ ΔΥΝΗΤΙΚΗΣ ΝΙΤΡΟΠΟΙΗΣΗΣ



Απορρόφηση: 0,732

Από τον τύπο της εξίσωσης: $0,732 = 0,3684x - 0,335$ $\Rightarrow x = 1,077 \mu\text{g/ml}$

Αντίδραση ανάπτυξης χρώματος:

5 ml δείγματος, 3 ml buffer και 2 ml δείκτη, άρα

$1,077 \mu\text{g/ml} * 10 \text{ ml (αντιδ.)} / 5 \text{ ml (δείγμα)} = 2,154 \mu\text{g/ml}$

Εκχύλιση νιτρωδών:

5 gr έδαφος, 20 ml υπόστρωμα (NH_4SO_2), 0.1 ml NaClO_4 , 5 ml KCl,
άρα

$2,154 \mu\text{g/ml} * 25.1 \text{ ml (εκχυλιστικού)} / 5 \text{ gr (έδαφος)} = 8,66 \mu\text{g NO}_2^- - \text{N /gr εδάφους} * 6\text{h}$

ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Φωσφατάσες: Ομάδα ενζύμων που καταλύουν την υδρόλυση των εστέρων και των ανυδριτών του φωσφορικού οξέως (H_3PO_4) προς ανόργανα φωσφορικά ιόντα.

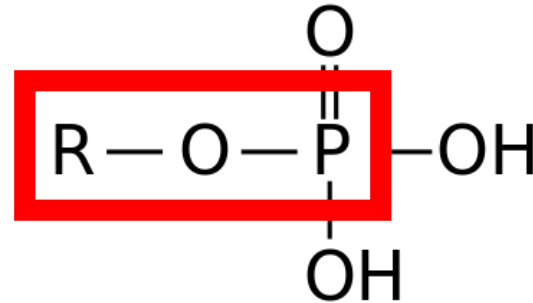
Διακρίνονται σε:

- i. Φωσφομονοεστεράσες (EC 3.1.3)
- ii. Φωσφοδιεστεράσες (EC 3.1.4)
- iii. Φωσφοτριεστεράσες (EC 3.1.5)
- iv. Φωσφοαμιδάσες (EC 3.2.3.1)

Φωσφομονοεστεράσες: Με βάση την βέλτιστη δραστηριότητα τους (περιβάλλον) διακρίνονται σε **όξινες και αλκαλικές.**

Η δράση των αλκαλικών φωσφατασών οφείλεται κυρίως στους μικροοργανισμούς λόγω έλλειψής τους στα ανώτερα φυτά.

Τρόπος δράσης τους: Υδρολύουν κυρίως τους εστερικούς δεσμούς μεταξύ **P** και **C (C-O-P)**.



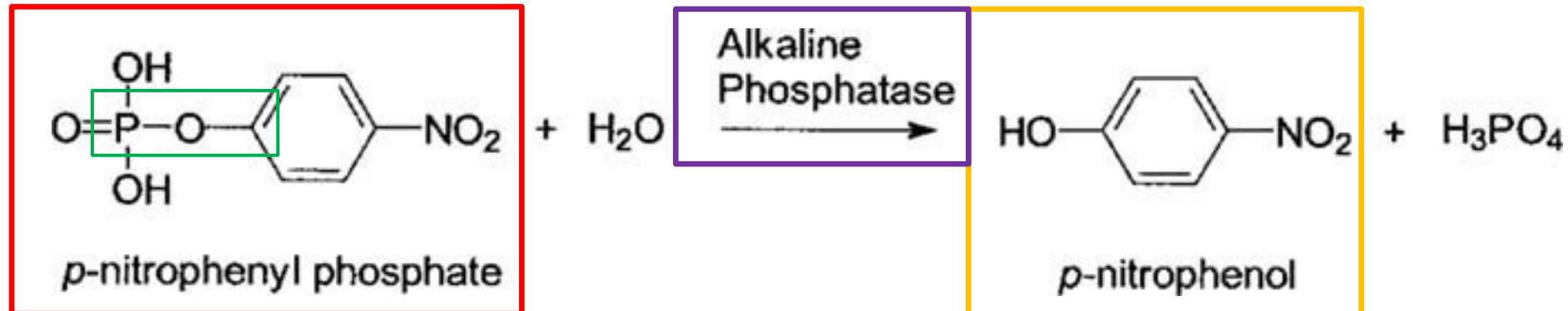
Διαδικασία:

- **Ελευθερώνεται ανόργανος P** από αποθεματικές πηγές δεσμευμένου οργανικού P (π.χ. υπολείμματα φύλλων και ριζών) **χωρίς ακόλουθη ελευθέρωση C**.
- Συμμετέχουν στην μετατροπή του οργανικού φωσφόρου σε ανόργανο και την παροχή υδατοδιαλυτών φωσφορικών ιόντων στους φυτικούς οργανισμούς (σημαντικό ρόλο στον κύκλο P στο έδαφος)

ΜΕΘΟΔΟΣ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΥ

Μέθοδος υπολογισμού δραστηκότητας όξινων – αλκαλικών φωσφατασών:

- Ενσωμάτωση στο έδαφος κατάλληλου υποστρώματος αντίδρασης (**φωσφορική πάρα-νιτροφαινόλη**)
- Παρουσία **φωσφατασών** → Υδρόλυση του **φωσφομονοεστερικού δεσμού**
- Συσσώρευση **πάρα-νιτροφαινόλης**



ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ:

- Σε γυάλινα φιαλίδια τοποθετείτε 1 gr εδάφους
- Προσθήκη 0.2 ml Τολουένιο και 4 ml MUB (pH 11)
- Προσθήκη 1 ml φωσφορικής πάρα-νιτροφαινόλης (PNP), όχι στα δείγματα μάρτυρα
- Ανάδευση στους 37 °C για 30 min
- Μετά την ανάδευση προσθήκη 1 ml CaCl₂ και 4 ml NaOH
- Φιλτράρισμα σε πάγο με διηθητικό χαρτί
- Φωτομέτρηση στα 420 nm

Καμπύλη αναφοράς

Συγκέντρωση (μg/ml)	Απορρόφηση (420 nm)
20	1,435
10	1,092
5	0,750
4	0,538
2	0,257
1	0,162
0	0,093

Απορρόφηση δείγματος εδάφους Α: 0,935

Εργαστηριακή Αναφορά

- Γραπτή αναφορά της εργαστηριακής άσκησης
- Υπολογισμός της ενζυμικής δραστηριότητας της αλκαλικής φωσφατάσης σε **μg p-νιτροφαινόλης/gr**
εδάφους