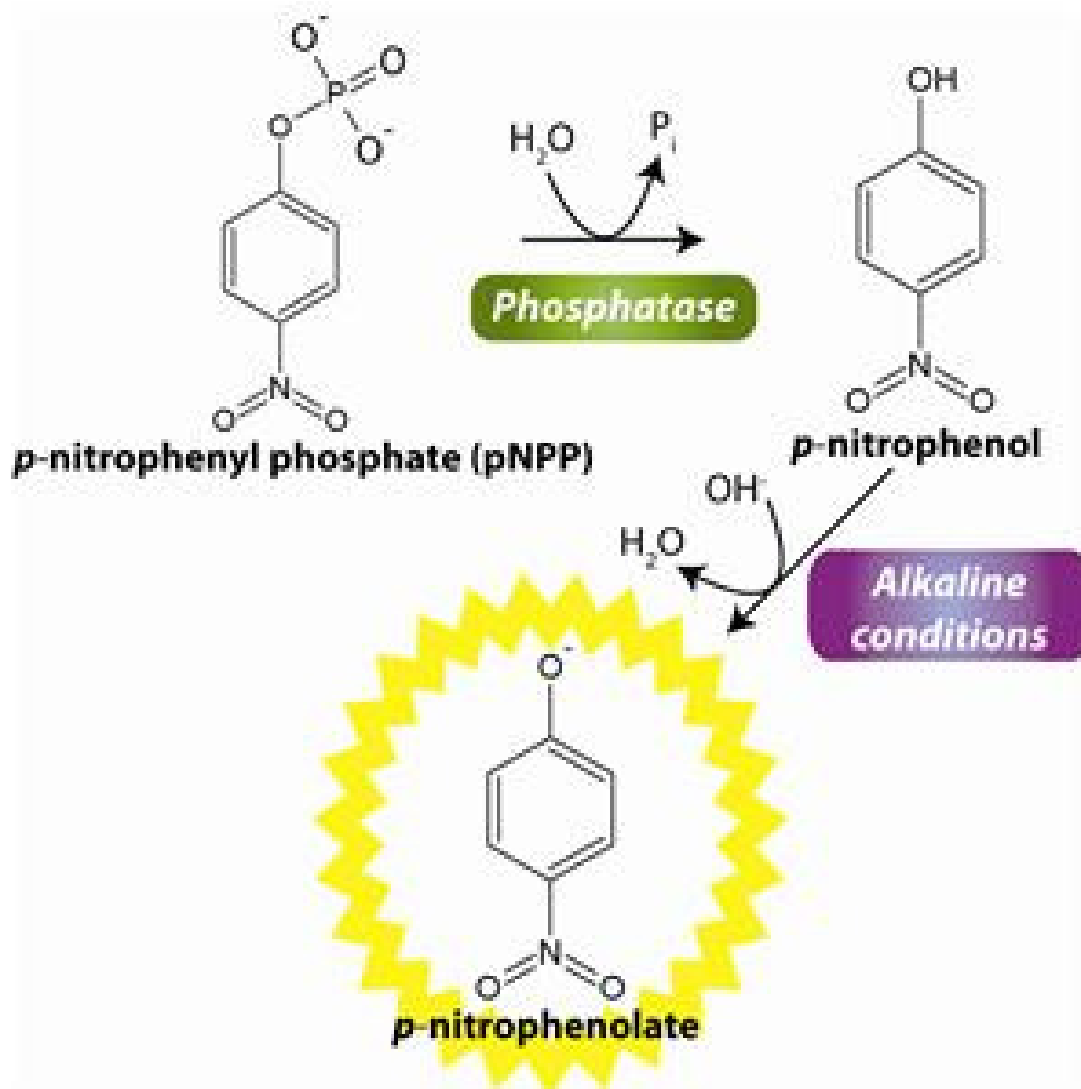


Εργαστηριακές Ασκήσεις

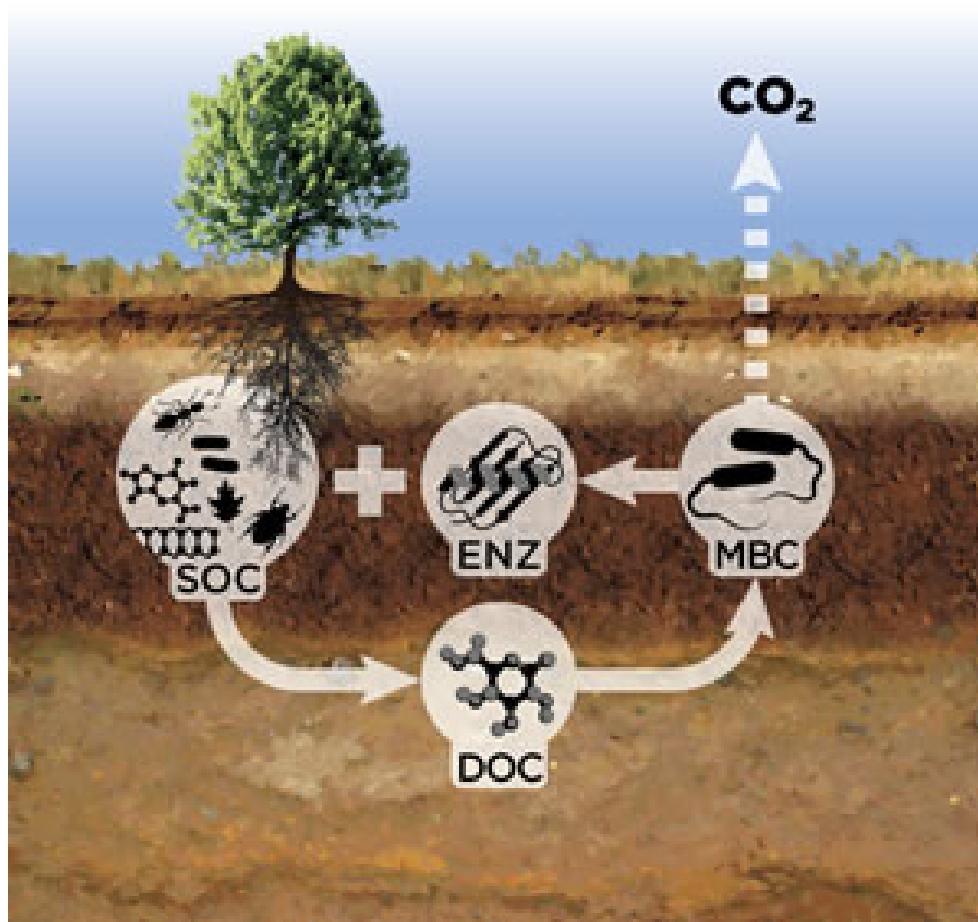
Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας



Λάρισα 2013
Δημήτριος Καρούζας

Εργαστηριακή Άσκηση 4

Προσδιορισμός της δραστηριότητας των φωσφατασών στο έδαφος

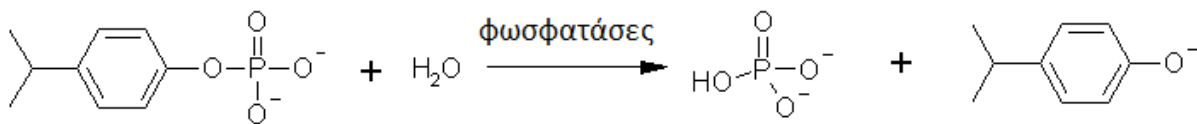


Εισαγωγικά Στοιχεία

Οι φωσφατάσες είναι μια ομάδα ενζύμων που καταλύουν την υδρόλυση των εστέρων και των ανυδριτών του φωσφορικού οξέος (H_3PO_4) προς ανόργανα φωσφορικά ιόντα (Martinez-Salgado et al., 2010, Rahmansyah et al., 2009, Tabatabai, 1994). Διακρίνονται σε φωσφομονοεστεράσες (EC 3.1.3), φωσφοδιεστεράσες (EC 3.1.4) φωσφοτριεστεράσες (EC 3.1.5) και φωσφοροαμιδάσες (EC 3.9.1.1) (Eivazi and Tabatabai, 1977). Οι φωσφομονοεστεράσες διακρίνονται σε όξινες (EC 3.1.3.2) και αλκαλικές φωσφατάσες (EC 3.1.3.1) εξαιτίας της βέλτιστης δραστηριότητας που παρουσιάζουν σε όξινο και αλκαλικό περιβάλλον, αντίστοιχα. Επειδή, τα ανώτερα φυτά στερούνται αλκαλικών φωσφατασών, η δραστηριότητα των αλκαλικών φωσφατασών μπορεί να αποδοθεί αποκλειστικά στους μικροοργανισμούς του εδάφους (Tabatabai, 1994). Παρόλα αυτά οι περισσότερες μελέτες έχουν εστιάσει στις όξινες φωσφατάσες (φωσφομονοεστεράσες) καθώς είναι σχετικά απλός και εύκολος ο προσδιορισμός τους ενώ παρουσιάζουν και τις υψηλότερες τιμές σε σχέση με τις υπόλοιπες φωσφατάσες που αναφέρθηκαν παραπάνω.

Οι όξινες και αλκαλικές φωσφατάσες υδrolύουν κυρίως τους εστερικούς δεσμούς μεταξύ P και C (C-O-P) στην οργανική ύλη του εδάφους. Κατά την πραγματοποίηση της διαδικασίας αυτής, ελευθερώνεται ανόργανος P από αποθεματικές πηγές δεσμευμένου οργανικού P, όπως φυτικά υπολείμματα φύλλων και ριζών, και άλλα οργανικά υπολείμματα χωρίς ακόλουθη ελευθέρωση C. Οι φωσφατάσες συμμετέχουν στην μετατροπή του οργανικού φωσφόρου σε ανόργανο και στην παροχή υδατοδιαλυτών φωσφορικών ιόντων στους φυτικούς οργανισμούς και ως εκ τούτου, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον κύκλο του P στο έδαφος (Rahmansyah et al., 2009, Tabatabai 1994).

Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος υπολογισμού της δραστηριότητας των όξινων και αλκαλικών φωσφατασών περιλαμβάνει την ενσωμάτωση στο έδαφος κατάλληλου υποστρώματος αντίδρασης (φωσφορική *para*-νιτροφαινόλη) όπου παρουσία φωσφατασών ακολουθεί υδρόλυση του φωσφοεστερικού δεσμού του υποστρώματος και συσσώρευση *para*-νιτροφαινόλης η συγκέντρωση της οποίας προσδιορίζεται φωτομετρικά (Tabatabai, 1994) (Εικόνα 1).



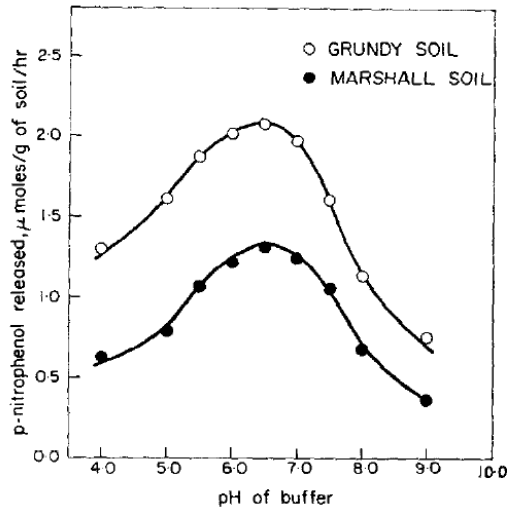
Εικόνα 1. Η αντίδραση υδρόλυσης της φωσφορικής *para*-νιτροφαινόλης με την δράση φωσφατασών που οδηγεί στην παραγωγή *para*-νιτροφαινόλης

Αντιδραστήρια

- Τολουένιο
- MUB (Modified Universal Buffer) pH=6.5
- Διάλυμα φωσφορικής *para*-νιτροφαινόλης (PNP) 0.05 M
- CaCl₂ 0.5M
- NaOH 0.5M
- Διάλυμα αναφοράς *para*-νιτροφαινόλη (1000 µg/ml)

Πειραματική διαδικασία

1. Σε κωνικές φιάλες των 50 ml θα τοποθετηθούν 1 g εδάφους
2. Ακολούθως θα προστεθούν 0.2 ml τολουένιο για την πλασμολυτική και απολυμαντική του δράση, 4 ml MUB (με pH 6.5) ώστε να προσαρμοστεί το pH σε βέλτιστα επίπεδα για τη δράση των φωσφατασών, και 1 ml διαλύματος φωσφορικής *para*-νιτροφαινόλης (PNP) που αποτελεί το υπόστρωμα το οποίο μετά την επώασή του με το εδαφικό δείγμα και τα υπόλοιπα αντιδραστήρια, αποδίδει το φωτομετρικά ανιχνεύσιμο προϊόν της αντίδρασης δηλαδή την *para*-νιτροφαινόλη. Γενικότερα η τιμή pH 6.5 για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας των φωσφατασών του εδάφους βασίζεται στην παρατήρηση ότι γενικότερα υψηλότερη δραστηριότητα για τα συγκεκριμένα ένζυμα καταγράφεται συνήθως σε ουδέτερες τιμές pH (Εικόνα 2) (Tabatabai and Bremner 1969).



Εικόνα 2. Η επίδραση του pH στην δραστηριότητα των φωσφατασών στο έδαφος (Tabatabai and Bremner 1969).

Ακόλουθες μελέτες διαχώρισαν τις φωσφατάσες σε όξινες και αλκαλικές ανάλογα με τις τιμές pH στις οποίες παρουσιάζουν βέλτιστη δραστηριότητα. Για τον λόγο αυτό δίνεται η δυνατότητα διαχωρισμού των μετρήσεων σε όξινες και αλκαλικές φωσφατάσες με την χρήση ρυθμιστικού διαλύματος MUB pH 11 για τις αλκαλικές φωσφατάσες ενώ με το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται στην παρούσα άσκηση MUB pH 6.5 προσδιορίζονται οι όξινες φωσφατάσες.

3. Ακολουθεί σύντομη ανάδευση σε vortex
4. Οι κωνικές φιάλες θα σφραγιστούν με parafilm και θα τοποθετηθούν για 1 ώρα σε σκοτεινό θάλαμο επώασης στους 37°C υπό ανάδευση.
5. Μετά το πέρας της μίας ώρας τα δείγματα θα απομακρυνθούν από τον επωαστικό θάλαμο και θα προστεθούν 1 ml CaCl_2 0.5M και 4 ml NaOH 0.5M με σκοπό i) την αναστολή της δράσης των φωσφατασών, ii) την ανάπτυξη του κίτρινου χρώματος που χαρακτηρίζει την παραγόμενη νιτροφαινόλη και iii) την ανάκτηση της παρα-νιτροφαινόλης από τα εδαφικά δείγματα και στη συνέχεια τα δείγματα αναδεύτηκαν ελαφρώς.
6. Ακολούθως το περιεχόμενο το κωνικών φιαλών θα διηθηθεί διαμέσου Whatman no. 42, σε πάγο (Εικόνα 3), ώστε να ελαχιστοποιηθεί ο σχηματισμός CaPO_4^{-3} που προκαλεί θολερότητα στο διήθημα. Παράλληλα με τα προς ανάλυση δείγματα, παρασκευαστήκαν δείγματα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Σε αντίθεση με τα υπόλοιπα δείγματα, στα δείγματα του μάρτυρα η ποσότητα 1ml

του PNP διαλύματος προστέθηκε αμέσως μετά τα CaCl_2 0.5M και NaOH 0.5M (δηλαδή ακριβώς πριν τη διήθηση).

7. Στο τελευταίο βήμα θα πραγματοποιηθεί μέτρηση της απορρόφησης του εκχυλίσματος που προέκυψε (Εικόνα 5.4), στα 420 nm, όπου τα δείγματα του μάρτυρα καθορίζουν το μηδέν της απορρόφησης.



Εικόνα 3. Φωτογραφίες από την διαδικασία προσδιορισμού της δραστηριότητας των φωσφατασών του εδάφους: (αριστερά) στάδιο διήθησης των εδαφικών διαλυμάτων σε πάγο και (δεξιά) τελικά διηθήματα πριν την φωτομέτρηση .

Ποσοτικός προσδιορισμός ενζυμικής δραστηριότητας

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας των όξινων και αλκαλικών φωσφατασών στο έδαφος έγινε με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης της *πάρα*-νιτροφαινόλης. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης, παρασκευάστηκαν αρχικά πρότυπα διαλύματα συγκεντρώσεων 0, 1, 2, 3, 4 και 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ *παρα*-νιτροφαινόλης. Για το σκοπό αυτό, 1 ml από το πρότυπο διάλυμα *παρα*-νιτροφαινόλης συγκέντρωσης 1000 $\mu\text{g/ml}$ διαλύθηκε σε 100 ml H_2O και ακολούθησε ανάδευση (10 $\mu\text{g/ml}$). Στη συνέχεια, 0, 1, 2, 3, 4 και 5 ml από το αραιωμένο πρότυπο διάλυμα μεταφέρθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες όπου προστέθηκε νερό 5, 4, 3, 2, 1 και 0 ml αντίστοιχα, ώστε ο τελικός όγκος να είναι 5 ml. Τέλος, προστέθηκαν 1ml CaCl_2 0.5M και 4ml NaOH 0.5M και ακολούθησε διήθηση και φωτομέτρηση στα 420nm (Tabatabai, 1994). Σε περίπτωση που οι τιμές απορρόφησης των δειγμάτων είναι υψηλότερες από την μέγιστη τιμή της πρότυπης καμπύλης μπορούν να προετοιμαστούν από το πρότυπο διάλυμα *πάρα*-νιτροφαινόλης (1000 $\mu\text{g/ml}$) αραιωμένα πρότυπα διαλύματα 10 και 20 $\mu\text{g/ml}$ και να μετρηθεί η απορρόφηση τους όπως περιγράφηκε παραπάνω ώστε να ενσωματωθούν στην πρότυπη καμπύλη.

Υπολογισμοί

Συγκέντρωση (μg/ml)	Απορρόφηση (420 nm)
0	
1	
2	
3	
4	
5	
10	
20	

Με βάση τα παραπάνω κατασκευάστε πρότυπη καμπύλη ώστε να υπολογίσετε την δραστικότητα των όξινων φωσφατασών στο δείγμα σας.

Βιβλιογραφία

1. Eivazi F., Tabatabai MA (1977) Phosphatases in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 9:167-172.
2. Martinez-Salgado, M.M., Gutierrez-Romero, V., Jannsens, M., Ortega-Blu, R. (2010) Biological soil quality indicators: a review. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. In: A. Mendez-Vilas (Ed.), pp. 319-328
3. Rahmansyah, M., Antonius, S., Sulistinah, N. (2009) Phosphatase and urease instability caused by pesticides present in soil improved by grounded rice straw. *ARPN Journal of Agricultural and Biological Science* 4: 56-62
4. Tabatabai MA and Bremner JM (1969) Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biology and Biochemistry* 1: 301-307.
5. Tabatabai, M.A., 1994. Soil enzymes. In: Weaver, R.W., Angle, J.S., Bottomley, P.S. (Eds.), *Methods of Soil Analysis: Microbiological and Biochemical Properties*. Part 2. SSSA Book Ser. 5. SSSA, Madison, WI, pp. 775–833.