



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΦΥΤΟΡΜΟΝΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΒΙΟΚΑΤΑΛΥΤΙΚΗ ΜΕΤΑΤΡΟΠΗ ΒΙΟΑΠΟΒΛΗΤΩΝ ΣΕ ΕΔΑΦΟΒΕΛΤΙΩΤΙΚΑ

Κωνσταντίνος Κ. Χασάπης

Επιβλέπων καθηγητής : Βλυσίδης Απόστολος

Αθήνα, Οκτώβριος 2019

Ευχαριστίες

Ευχαριστώ τον καθηγητή μου κ. Απόστολο Βλυσίδα ο οποίος μου έδωσε την δυνατότητα να μελετήσω το παραπάνω θέμα.

Ευχαριστώ την καθηγήτρια κα Χριστιάνα Μητσοπούλου η οποία μου προσέφερε την δυνατότητα να εργασθώ, υπό την επίβλεψη και την βοήθεια της, στο Εργαστήριο Ανόργανης Χημείας του ΕΚΠΑ το οποίο διέθετε τον κατάλληλο εξοπλισμό. Επίσης ευχαριστώ τον καθηγητή κ. Νίκο Θωμαΐδη, την Δρ. κ. Μαρία Ρούλια και την υποψήφια διδάκτορα κ. Ανθή Πανάρα για την βοήθεια τους στην ανάπτυξη της πρωτότυπης μεθόδου.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Σε πολλές μελέτες και επιστημονικά άρθρα σχετικά με οργανικά λιπάσματα και εδαφοβελτιωτικά αναφέρονται φυτορυθμιστικές δράσεις κυρίως αυξητικές. Αυτές αποδίδονται στα χουμικά συστατικά. (1,2)

Μετά από βιβλιογραφική ανασκόπηση, δεν βρέθηκαν στοιχεία για την ύπαρξη φυτορμονών σε οργανικά λιπάσματα και εδαφοβελτιωτικά. Επίσης δεν εντοπίστηκε αναπτυγμένη μεθοδολογία για την μέτρηση φυτορμονών σε τέτοια, χημικά πολύπλοκα υλικά.

Η παρούσα διπλωματική εργασία έχει σκοπό την ανάπτυξη μεθόδου για την μέτρηση των φυτορμονών σε εδαφοβελτιωτικά που παραχθήκαν με βιοκαταλυτική μετατροπή. Παράλληλα, την εξαγωγή κάποιου αρχικού συμπεράσματος για το εάν παράγονται φυτορμόνες κατά την βιοκαταλυτική μετατροπή.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι φυτικές ορμόνες ως μόρια-αγγελιαφόροι ρυθμίζουν την ανάπτυξη των φυτών από τη χρονική στιγμή της βλάστησης των σπόρων μέχρι τη γήρανσή τους, καθώς και τις αποκρίσεις σε βιοτικά και αβιοτικά ερεθίσματα που μπορούν να βοηθήσουν το φυτό να ανταπεξέλθει σε καταστάσεις περιβαλλοντικού στρες. Οι πιο σημαντικές φυτορμόνες είναι οι αυξίνες (ινδολο-3-οξικό οξύ, ινδολο-3-βουτανικό οξύ, φαινυλοξικό οξύ), οι κυτοκινόνες (κινητίνη, trans-ζεατίνη, ισοπεντενυλαδενίνη, 6-βενζυλαμινοπουρίνη) και γιββεριλλίνες (γιββεριλλικό οξύ 3). Η ρύθμιση που επιτυγχάνουν οι φυτικές ορμόνες έχει μεγάλη σημασία για την ανάπτυξη ανθεκτικών ειδών.

Ο τυρφώδης λιγνίτης είναι οργανική ύλη τεταρτογενούς γεωλογικής περιόδου και επελέγη ως πρώτη ύλη εξαιτίας της υψηλής του περιεκτικότητας σε χουμικά συστατικά.

Ένα καινοτόμο οργανικό λίπασμα (EKOTRON®) παράχθηκε από τη βιοκαταλυτική επεξεργασία τυρφώδους λιγνίτη. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει μικροαερόβια κομποστοποίηση του τυρφώδους λιγνίτη με την προσθήκη εκχυλίσματος που περιέχει μικροοργανισμούς εδάφους. Η υγρασία και ο αερισμός ελέγχονταν διαρκώς καθόλη τη διάρκεια της βιομετατροπής.

Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις ποιοτικού ελέγχου του δείγματος (υγρασίας, τέφρας, pH, αγωγιμότητας, χουμικών και ολικού μικροβιακού).

Αναπτύχθηκε μια νέα μέθοδος για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό γιββεριλλικού οξέος 3 και ινδολο-3-οξικού οξέος στο οργανικό λίπασμα με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) εφοδιασμένη με ανιχνευτή υπεριώδους ορατού (HPLC-UV Vis). Η προετοιμασία του δείγματος περιλαμβάνει διαδοχική εκχύλιση και καθαρισμό και οι ποσοτικές μετρήσεις έλαβαν χώρα σε εμβολιασμένα δείγματα (spiked samples).

Plant hormones as signaling molecules regulate plant growth and development from seed germination to whole-plant senescence, as well as responses to biotic and abiotic cues, which can help the plant to tolerate the environmental stresses. Major phytohormones are auxins (indole-3-acetic acid, indole-3-butyric acid, phenylacetic acid), cytokinins (kinetin, trans-zeatin, isopentenyladenine, 6-benzylaminopurine) and gibberellins (gibberellic acid). Regulating plant hormones is vital for tolerant plant species production.

Peaty lignite, an organic rock of the tertiary geological period, was selected as raw material thanks to its high humic substances content.

A novel organic fertilizer (EKOTRON®) was derived from the biocatalytic treatment of peaty lignite. The procedure involves microaerobic composting of peaty lignite with the addition of soil microorganisms extract.

Measurements of quality control have taken place (humidity, ash, pH, humic substances, total microbial number).

A new method was developed for the simultaneous determination of gibberellic acid and indole-3-acetic acid in the organic fertilizer via High Pressure Liquid Chromatography equipped with UV detector (HPLC-UV). The sample preparation included stepwise extraction and purification and the quantification was performed on spiked samples.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ 7

<u>1.1</u>	<u>Φυτορμόνες</u>	7
<u>1.2</u>	<u>Κομποστοποίηση ως διαδικασία παραγωγής φυτορμονών</u>	7
<u>1.3</u>	<u>Δείγμα και φυτορμόνες προς ανίχνευση</u>	7

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΑΝΤΙΚΕΜΕΝΟΥ.....8

2 Φυτορρυθμιστικές ουσίες (φυτορμόνες)..... 8

<u>2.2</u>	<u>Ανακάλυψη των φυτορμονών</u>	8
<u>2.3</u>	<u>Ορισμός, διάκριση και σημασία των φυτορμονών</u>	8
<u>2.4</u>	<u>Αυξίνες</u>	9
<u>2.4.1</u>	<u>Βιοσύνθεση του ινδόλο-3-οξικού οξέος</u>	9
<u>2.4.2</u>	<u>Δράση του ινδόλο-3-οξικού οξέος</u>	10
<u>2.4.3</u>	<u>Ιδιότητες του ινδόλο-3-οξικού οξέος</u>	10

<u>2.5</u>	<u>Γιββεριλλίνες</u>	10
<u>2.5.1</u>	<u>Βιοσύνθεση των γιββεριλλίνων</u>	11
<u>2.5.2</u>	<u>Μετακίνηση των γιββεριλλίνων στο φυτό</u>	11
<u>2.5.3</u>	<u>Δράση των γιββεριλλίνων</u>	11
<u>2.5.4</u>	<u>Πεδίο εφαρμογής των γιββεριλλίνων</u>	12
<u>2.5.5</u>	<u>Ιδιότητες του γιββεριλλικού οξέος 3</u>	12

3. Προϊόντα βιαποβλήτων 13

<u>3.1</u>	<u>Χουμικά</u>	13
<u>3.2</u>	<u>Περιγραφή του δείγματος</u>	14

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....15

4 Μετρήσεις ποιοτικού ελέγχου στο δείγμα15

<u>4.1</u>	<u>Προσδιορισμός υγρασίας</u>	15
<u>4.2</u>	<u>Προσδιορισμός pH</u>	15
<u>4.3</u>	<u>Προσδιορισμός ηλεκτρικής αγωγιμότητας</u>	15
<u>4.4</u>	<u>Προσδιορισμός τέφρας</u>	16
<u>4.5</u>	<u>Προσδιορισμός χουμικών</u>	16
<u>4.6</u>	<u>Προσδιορισμός μικροβιακού πληθυσμού</u>	17
<u>4.7</u>	<u>Αποτελέσματα</u>	17

5. Ανάπτυξη μεθόδου για τον προσδιορισμό ινδόλο-3- οξικού οξέος(IAA) και γιββερελικού οξέος 3 (GA3) με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης και ανιχνευτή ορατού-υπεριώδους (HPLC UV- Vis).....	18
5.1 <u>Πρότυπα και αντιδραστήρια</u>	18
5.2 <u>Οργανολογία</u>	19
5.3 <u>Χρωματογραφική ανάλυση</u>	20
5.3.1 <u>Ανάπτυξη της μεθόδου</u>	20
5.3.2 <u>Βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες</u>	24
5.4 <u>Προκατεργασία των δειγμάτων</u>	24
5.4.1 <u>Εκχύλιση</u>	24
5.4.2 <u>Καθαρισμός εκχυλίσματος</u>	25
5.4.3 <u>Παρασκευή εμβολιασμένων δειγμάτων</u>	25
5.5 <u>Γραμμικότητα</u>	25
5.6 <u>Αποτελέσματα</u>	27
5.6.1 <u>Ποσοτικοποίηση με τα εμβολιασμένα δείγματα</u>	28
5.6.2 <u>Ποσοτικοποίηση με το ποσοστό ανάκτησης</u>	28
6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	30
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	31
8. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	33

Κατάλογος εικόνων

Εικόνα 1:Τα μονοπάτια βιοσύνθεσης του Ινδόλο-3-οξικού οξέος από την τρυπτοφάνη	9
Εικόνα 2 : Απεικόνιση του Γιββερελλικού οξέος	12
Εικόνα3: Χρωματογράφημα από την εργασία των M.Kenneletalόπου φαίνονται οι κορυφές των GA3, IAA, ABA.....	20
Εικόνα 4: Χρωματογραφήματα προτύπου GA3 με κινητή φάση μεθανόλη : υδατικό διάλυμα οξικού οξέος.....	21
Εικόνα 5: Καμπύλη αναφοράς προτύπων GA3 με κινητή φάση μεθανόλη υδατικό διάλυμα οξικού οξέος.....	21
Εικόνα 6: Καμπύλη αναφοράς προτύπων IAA με κινητή φάση μεθανόλη : υδατικό διάλυμα οξικό οξέος.....	22
Εικόνα 7: Χρωματογράφημα προτύπων GA3 , βενζοϊκό οξύ και IAA με κινητή φάση μεθανόλη : υδατικό διάλυμα οξικού οξέος	22
Εικόνα 8: Καμπύλη αναφοράς προτύπων GA3 με κινητή φάση ρυθμιστικό διάλυμα : ακετονιτρίλιο με διάλυση προτύπων σε μεθανόλη	23
Εικόνα 9: Καμπύλη αναφοράς προτύπων IAA με κινητή φάση ρυθμιστικό διάλυμα : ακετονιτρίλιο με διάλυση προτύπων σε μεθανόλη	23
Εικόνα 10: Καμπύλη αναφοράς προτύπων GA3 με κινητή φάση ρυθμιστικό διάλυμα : ακετονιτρίλιο πριν την μέτρηση, με διάλυση στο δια//μα της κινητής φάσης	26

Εικόνα 11:Καμπύλη αναφοράς προτύπων IAA με κινητή φάση ρυθμιστικό διάλυμα : ακετονιτρίλιο πριν την μέτρηση, με διάλυση στο δια//μα της κινητής φάσης	26
Εικόνα 12: Χρωματογράφημα προτύπων GA3 και IAA με κινητή φάση ρυθμιστικό : ακετονιτρίλιο	27
Εικόνα 13: Χρωματογράφημα του δείγματος.....	27
Εικόνα 14: Καμπύλη προσθήκης του GA3	28
Εικόνα 15: Καμπύλη προσθήκης του IAA.....	29
Εικόνα 16:Χρωματογράφημα των εμβολιασμένων δειγμάτων	29

Κατάλογος πινάκων

Πίνακας 1: Χημική ανάλυση Ekotron	14
Πίνακας 2: Μετρήσεις ποιοτικού ελέγχου 5 δειγμάτων Ekotron	18
Πίνακας 3: Πρόγραμμα ισοκρατικής έκλουσης χρωματογραφίας	24
Πίνακας 4: Επίπεδα συγκεντρώσεων για το GA3 και το IAA στα εμβολιασμένα δείγματα	25
Πίνακας 5 : Αναλυτικές μέθοδοι από δημοσιεύσεις.....	33

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Φυτορμόνες

Οι φυτορμόνες παίζουν κρίσιμο ρόλο στον τρόπο με τον οποίο τα φυτά μεγαλώνουν και αναπτύσσονται. Οι ορμόνες είναι αυτές που καθορίζουν την ταχύτητα της αύξησης σε κάθε στάδιο και συγκροτούν τα στάδια για να παραχθεί ο φυτικός οργανισμός. Επιπλέον παίζουν ρυθμιστικό ρόλο στις διαδικασίες της αναπαραγωγής. (3)

Οι φυτικές ορμόνες (φυτορμόνες) είναι μικρά μόρια που εμφανίζονται σε χαμηλά επίπεδα συγκεντρώσεων και επηρεάζουν την ανάπτυξη των φυτών. Οι κύριες ομάδες φυτικών ορμονών που ρυθμίζουν την ανάπτυξη των φυτών περιλαμβάνει: αυξίνες (ινδολο-3-οξικό οξύ, ινδολο-3-βουτυρικό οξύ, φαιτυλοξικό οξύ), κυτοκινίνες (κινετίνη, trans-ζεατίνη, ισοπεντενυλαδενίνη, 6-βενζυλαμινοπουρίνη) και γιββερελλίνες. (4)

Διατίθενται στην αγορά, συνθετικές, σε τιμές υψηλές μεταξύ 100-200€ / kg.

1.2 Κομποστοποίηση ως διαδικασία παραγωγής φυτορμονών

Η κομποστοποίηση είναι μια διαδικασία βιολογικής αποσύνθεσης και ανασύνθεσης της οργανικής ύλης υπό αερόβιες συνθήκες. Τα εδαφοβελτιωτικά που παράγονται από βιοαπόβλητα, γεωργικά απόβλητα και απορρίμματα οργανικών πετρωμάτων ενδέχεται να περιέχουν ενώσεις που επηρεάζουν την ανάπτυξη των φυτών.(1)

Κατά την εφαρμογή τους στα φυτά, παρατηρήθηκε επίδραση σε πολυάριθμες φυσιολογικές διεργασίες. Ανάμεσα στα παρατηρηθέντα αποτελέσματα είναι: βελτιωμένη κατάσταση του ριζικού συστήματος, αυξημένη απορρόφηση του ριζικού συστήματος σε θρεπτικά συστατικά, βελτιωμένη αντοχή στο στρες, τις ασθένειες και καθυστερημένη γήρανση.(1)

Σκοπός της έρευνας είναι να αναλυθεί η εμφάνιση φυτικών ορμονών σε ώριμα κόμποστ που παρασκευάζονται από επιλεκτική συλλογή τού οργανικού κλάσματος φυτικών υπολειμμάτων και απορριμμάτων ορυχείων λιγνιτών. (2)

1.3 Δείγμα και φυτορμόνες προς ανίχνευση

Επιλέχθηκε προϊόν από την 2^η κατηγορία (απορρίμματα ορυχείου λιγνίτη Μεγαλοπόλεως) για το οποίο αναπτύξαμε μεθοδολογία και μετρήθηκε το ινδόλο-3-οξικό οξύ και το γιββεριλλικό οξύ 3.

Η επιλογή του συγκεκριμένου προϊόντος οφείλεται στο ότι ήταν σε διαδικασία παραγωγής στο χρονικό διάστημα της μελέτης και υπήρχαν διαθέσιμα δείγματα.

Επιλέχθηκαν οι συγκεκριμένες φυτορμόνες διότι είναι οι πλέον διαδεδομένες.

Με την μελέτη και ανάπτυξη της μεθοδολογίας καταγράφεται και ένα 2^ο καινοτομικό στοιχείο. Διαπιστώθηκε ότι δεν υπάρχει τεκμηριωμένη μεθοδολογία για την απομόνωση και μέτρηση των φυτορμονών στα συγκεκριμένα υλικά.

Τα στοιχεία που καταγράφονται στην παρούσα διπλωματική εργασία οδήγησαν στην συγγραφή άρθρου το οποίο θα παρουσιασθεί στο 6^ο Πανελλήνιο συνέδριο με διεθνείς συμμετοχές : Green Chemistry and Sustainable Development October 18-20, 2019 Τμ. Χημείας ΕΚΠΑ.

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟΥ

2. Φυτορρυθμιστικές ουσίες (φυτορμόνες)

2.1 Δράση των φυτορμονών

Η φυτορμόνες αποτελούν μια ομάδα ανεξάρτητων μακρομορίων τα οποία έχουν σημαντική επίδραση σε διάφορες πτυχές στην ανάπτυξη και την φυσιολογία των φυτών. Αποτελούν προϊόντα του δευτερεύοντα μεταβολισμού των φυτών και εμφανίζουν ενεργότητα σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις(3). Κάποιες φυτορμόνες δρουν στο χώρο σύνθεσης τους ενώ άλλες όπως οι αυξίνες μεταφέρονται στον φυτικό ιστό μέσω ενός πολικού μηχανισμού μεταφοράς. Με τις μεθόδους της γενετικής μηχανικής (εμβολιασμός μεταλλαγμένων γονιδίων κ.α.) εντοπίστηκαν πολλά από τα γονίδια που συμμετέχουν στην ορμονική βιοσύνθεση και δράση. (4)

2.2 Η ανακάλυψη των φυτορμονών

Από την εποχή που η επιστήμη προσπάθησε να ερμηνεύσει τα διάφορα φαινόμενα έγινε πλήρως αποδεκτό ότι στα φυτά υπάρχουν ουσίες που παράγονται και κυκλοφορούν μέσα σε αυτά, ρυθμίζοντας καλύτερα τις διάφορες λειτουργίες και αντιδράσεις τους στα διάφορα ερεθίσματα του περιβάλλοντος και καθορίζουν τη μορφολογία του φυτού ή των φυτικών οργάνων.

2.3 Ορισμός, διάκριση και σημασία των φυτορμονών

Φυτορρυθμιστική ουσία ή φυτορμόνη είναι μια οργανική ουσία, που δεν είναι απαραίτητα θρεπτικό συστατικό, και που σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις (<1 ppm) προάγει, παρεμποδίζει ή τροποποιεί ποιοτικά την αύξηση και την ανάπτυξη του φυτού.(3)

Οι φυτορμόνες μπορεί να δρουν σε ένα συγκεκριμένο στάδιο της ανάπτυξης ή να βοηθούν στη μετάβαση σε ένα άλλο στάδιο. Κάθε ορμόνη μπορεί να έχει διαφορετικά αποτελέσματα σε διαφορετικούς ιστούς ή διαφορετικά στάδια ανάπτυξης στον ίδιο ιστό. Η δράση των ορμονών δεν παρουσιάζει εξειδίκευση. Για τον συντονισμό της αύξησης και της ανάπτυξης αυτό που χρειάζεται είναι ένα κατάλληλο ισοζύγιο φυτορμονών. Κάθε στάδιο ανάπτυξης ελέγχεται από το σύνολο μιας ομάδας ορμονών, παρόλο που σε πολλές περιπτώσεις μία από αυτές μοιάζει να έχει μεγαλύτερη δράση και αναγνωρίζεται ως η κυρίαρχη του σταδίου αυτού.(5)

Οι φυτορρυθμιστικές ουσίες διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, τις φυσικές και τις συνθετικές.

Ως φυσικές φυτορρυθμιστικές ουσίες ορίζονται εκείνες που παράγονται σε ορισμένα μέρη του φυτού και μπορούν από εκεί να μετακινούνται και σε άλλα μέρη προκαλώντας ειδικές βιοχημικές, φυσιολογικές ή μορφολογικές αντιδράσεις

Οι φυσικές φυτορμόνες είναι φυσικά προϊόντα που παράγονται από τα φυτά και μπορούν με κατάλληλες μεθόδους να εξαχθούν και να προσδιοριστούν.

Οι συνθετικές φυτορρυθμιστικές ουσίες παράγονται τεχνητά και μπορεί να μοιάζουν χημικά με τις φυσικές. Έχουν τον ίδιο τρόπο δράσης με τις φυσικές, σαν χημικοί αγγελιοφόροι μέσα στο φυτό, όταν εναρμονιστούν με τον κατάλληλο τρόπο και στον κατάλληλο χρόνο.

2.4 Αυξίνες

Οι αυξίνες είναι οι κύριες φυτικές ορμόνες που καθορίζουν την ποσότητα, τον τύπο και την κατεύθυνση της βλάστησης και εντοπίζονται σε όλα τα είδη του φυτικού βασιλείου. Περιλαμβάνουν φυτικές ουσίες, αλλά και τεχνητές, οι οποίες έχουν παρόμοια αποτελέσματα με αυτά των φυσικών.

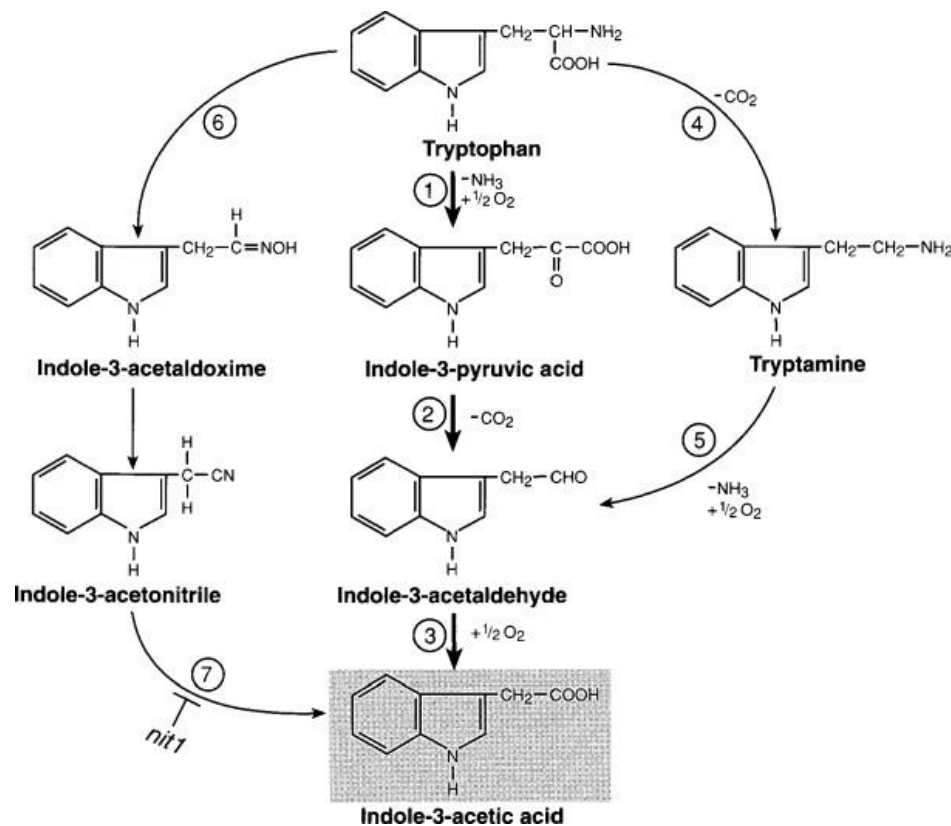
Η φυσική αυξίνη ήταν η πρώτη φυτορρυθμιστική ουσία που ανακαλύφθηκε. Ο όρος «αυξίνη» προέρχεται από την Ελληνική λέξη «αυξίν»

Είναι γνωστό ότι ο όρος αυξίνη περιλαμβάνει αρκετές παρόμοιες μεταξύ τους ουσίες.

Οι αυξίνες ρυθμίζουν την επιμήκυνση και την διαίρεση των κυττάρων με την πιο διαδεδομένη αυξίνη στην φύση είναι το ινδόλο-3-οξικό οξύ (IAA). (5)

2.4.1 Βιοσύνθεση του ινδόλο-3-οξικού οξέος

Η βιοσύνθεση του γίνεται κυρίως με πρόδρομη ουσία την τρυπτοφάνη στα επάνω μέρη του βλαστού, στο μερίστωμα και στα νεαρά αναπτυσσόμενα φύλλα.



Εικόνα 1 :Τα μονοπάτια βιοσύνθεσης της IAA από την τρυπτοφάνη. Το μονοπάτι μέσω του ινδόλο-3-πυροβικού οξέος θεωρείται το πιο διαδεδομένο από αυτά του ακετονιτριλίου και της τρυπταμίνης. Τα ένζυμα που συμμετέχουν σε κάθε στάδιο συμβολίζονται με αριθμό : 1 τρανσαμινάση της τρυπτοφάνης, 2 Ισοπροπανολοδικαρβοξυλάση, 3 Ινδόλο-3-αλδεύδη διυδρογονάση, 4 δικαρβοξυλάση της τρυπτοφάνης, 5 αμίνσοξυδάση, 6 κυτόχρωμα P450 υδροξυλάση, 7 νιτριλάση. (5)

Η IAA καταβολίζεται είτε μέσω φωτοοξειδωσης είτε με αποικοδόμηση από τα ένζυμα αύξινο-οξειδάσες. Μορφές της συζευγμένες με αμινικά οξέα χρησιμεύουν ως ανενεργές μορφές αποθήκευσης της. Αντίστοιχα με τις Γιββεριλλίνες το IAA μεταφέρεται στο φυτό μέσω του ρηιοem sar λόγω της πολικότητας της.

2.4.2 Δράση του ινδόλο-3-οξικού οξέος

Κύρια δράση της είναι η ενίσχυση της διόγκωσης των φυτικών κυττάρων.

- Συγκεκριμένα, αποδυναμώνει τους δεσμούς μεταξύ των μορίων του κυτταρικού τοιχώματος και τροποποιεί την πλαστικότητα και την ελαστικότητα του. Το παραπάνω συντελεί στην επιμήκυνση του βλαστού και των ανθών των λουλουδιών, όμως υπάρχει κατώφλι συγκέντρωσης της IAAπάνω από το οποίο γίνεται φυτοτοξική.
- Στα μονοκοτυλήδονα φυτά η IAA ενισχύει την ανάπτυξη του ελάσματος του φύλλου, αντίθετα σε κάποια δικοτυλήδονα φυτά την εμποδίζει.
- Επίσης, καθυστερεί το πέσιμο των φύλλων
- Καθώς ενισχύει την ανάπτυξη των κυττάρων πιστεύεται ότι ενισχύει τα φαινόμενα του γεωτροπισμού και του φωτοτροπισμού
- Σε χαμηλές συγκεντρώσεις υπό την παρουσία κυττοκινονών, μπορεί να συνεισφέρει στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, με αποτέλεσμα να συνεισφέρει στην διαφοροποίηση των μερών του αγγειακού ιστού του φυτού όπως μεταξύ του ξηλώματος και του φλοιώματος.
- Σε μεγάλες συγκεντρώσεις ενισχύει των σχηματισμό των ριζών
- Γενικά η μεταφορά λόγω της πολικότητας της κατά μήκος του βλαστού (μέσω του ρηιοem sar) χρησιμοποιείται για να δημιουργήσει βαθμίδωση συγκέντρωσης της IAA αυξανόμενη από το πάνω μέρος του φυτού προς το κάτω, το παραπάνω οδηγεί στην δημιουργία των ριζών στην βάση του φυτού και των ανθών στο πάνω μέρος.
- Έρευνες έχουν δείξει ότι για την ενεργοποίηση της δράσης της απαιτείται η αποικοδόμηση ενός ή περισσότερων πρωτεϊνών.
- Το IAA είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη φυτικών κυττάρων σε καλλιέργεια.

(4,5,6)

2.4.3 Ιδιότητες του Ινδόλο-3-οξικού οξέος

Χημικός τύπος : $C_{10}H_9NO_2$

Μοριακό βάρος: 175,18g/mol

Διαλυτότητα στο νερό : 1,5g/L (25°C)

Διαλυτότητα στην αιθανόλη : 50 g/L (25°C)

LogP (οκτανόλη-νερό) : 1,41

(1)

2.5 Γιββεριλλίνες

Έχουν ανακαλυφθεί πάνω από 130 γιββεριλλίνες οι περισσότερες από τις οποίες δεν είναι βιολογικά ενεργές και αποτελούν πρόδρομες ουσίες για τις βιολογικά ενεργές γιββεριλλίνες όπως οι GA1, GA3, GA4 και GA7. Οι γιββεριλλίνες είναι φυτορρυθμιστικές ουσίες για τις οποίες έχει γίνει πλέον αποδεκτό ότι έχουν πολύ μεγάλη σημασία στη φυσιολογία του φυτού. Η ανακάλυψη της μεγάλης αυτής ομάδας φυτορμονών έγινε τη δεκαετία του 1920. Παρόλο που φαινομενικά οι

γιββεριλλίνες έχουν την ίδια δράση με τις αυξίνες, εντούτοις ο τρόπος δράσης είναι διαφορετικός. Σε ορισμένες περιπτώσεις έχει αναφερθεί συνεργατική δράση μεταξύ αυξινών και γιββεριλλινών στην αύξηση των φυτών. Έχει άλλωστε αποδειχθεί ότι σε ένα φυτικό όργανο ή ιστό μπορεί να περιέρχονται συγχρόνως δύο ή και περισσότερες φυσικές γιββεριλλίνες και η περιεκτικότητα και η αναλογία τους ποικίλλει ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης του οργάνου ή του ιστού. (11)

2.5.1 Βιοσύνθεση των γιββεριλλινών

Η βιοσύνθεση των γιββεριλλινών ξεκινά από το μεβαλονικό οξύ (mevalonic acid, mevalonate) το οποίο μέσα από διάφορες αντιδράσεις μετατρέπεται σε καουρένιο, την πρόδρομο ένωση όλων των γιββεριλλινών. Ο μεταβολισμός του καουρενίου σε γιββερελλίνη γίνεται με μια σειρά οξειδωτικών αντιδράσεων παρουσία οξειδασών, οξυγόνου και ανηγμένου πυριδονουκλεοτιδίου (NADPH)

Η ικανότητα των νεαρών βλαστών και των ανώριμων σπόρων να παράγουν καουρένιο είναι σοβαρή ένδειξη παραγωγής γιββεριλλίνης σ' αυτούς.

Η φυσική γιββεριλλίνη συντίθεται κυρίως στην αναπτυσσόμενη κορυφή του βλαστού καθώς επίσης, σε μικρότερες ποσότητες, στα νεαρά φύλλα του ακραίου οφθαλμού και στα λίγο παλαιότερα, αλλά όχι τελείως ανεπτυγμένα, φύλλα του βλαστού. Βιοσύνθεση γιββεριλλίνης γίνεται επίσης στις κορυφές των ριζών (στα ακραία 3-4mm) καθώς και στους αναπτυσσόμενους καρπούς και σπόρους (στις κοτυληδόνες ή στο ενδοσπέρμιο). (7)

2.5.2 Μετακίνηση των γιββεριλλινών στο φυτό

Οι γιββεριλλίνες λόγω της χημικής δομής τους και της διαλυτότητας τους στο νερό μπορούν να μετακινηθούν σε όλο το φυτό μέσω της υδατικής δίοδου στον φλοιό των φυτών (phloem). Συγκεκριμένα οι βιολογικά ανενεργές γιββεριλλίνες εμφανίζεται να διανύουν μεγάλες αποστάσεις στο εσωτερικό των φυτών, σε αντίθεση με τις βιολογικά ενεργές. Για παράδειγμα η ανενεργή GA9 δημιουργείται στις ωθήκες των φυτών και μεταφέρετε στα πέταλα και σέπαλα του ανθού του όπου μετατρέπεται στην ενεργή GA4. (8)

2.5.3. Δράση των γιββεριλλινών

Οι γιββεριλλίνες λειτουργούν ως ρυθμιστές της ανάπτυξης των φυτών, συγκεκριμένα ενεργοποιούν την βλάστηση των σπόρων, βοηθούν στην ανάπτυξη και την ωρίμανση των φύλλων και επηρεάζουν την άνθηση.

- Σχετικά με την βλάστηση των σπόρων, οδηγούν στην έκφραση γονιδίων τα οποία παράγουν πρωτεΐνες (α-αμυλάσες) που διαλύουν τον φλοιό του σπόρου. Η παραπάνω διαδικασία οδηγεί στην επέκταση των κυττάρων
- Τα επίπεδα βιο-ενεργών γιββεριλλινών στα φύλλα μειώνονται με την αύξηση της ηλικίας του φυτού. Συγκεκριμένα, οι γιββεριλλίνες λειτουργούν ως ρυθμιστές γονιδίων πρωτεΐνων (Dellaproteins) που επιβραδύνουν την γήρανση των φύλλων.
- Παράλληλα, παίζουν σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της παραγωγής της ινβερτάσης σε πολλά όργανα του φυτού. Συγκεκριμένα, δημιουργούν έναν μηχανισμό που αυξάνει τα επίπεδα των διαλυτών σακχάρων που σχετίζονται με την παραγωγή τους και δημιουργώντας κορεσμό στο

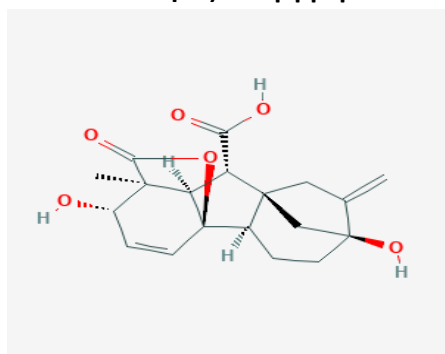
διάλυμα των σακχάρων ώστε να μην παράγονται τα σάκχαρα που σχετίζονται με την παραγωγή ινβερτάσης.

- Οι γιββεριλλίνες τονώνουν την άνθηση των διετών φυτών ενώ στα πολυετή αναστέλλουν την άνθηση. Παράλληλα, στα μεταλλαγμένα φυτά τα οποία δεν έχουν αναπτυχθεί ή εμφανίζουν αργή άνθηση παρατηρείται έλλειψη γιββεριλλίνων, η προθήκη αυτών θα οδηγήσει σε περισσότερο φυσιολογική ανάπτυξη.
 - Η παραγωγή γύρης σχετίζεται άμεσα με τις γιββεριλλίνες, καθώς κατά την ανάπτυξη των 'σωλήνων' γύρης εντοπίζεται αύξηση των επιπέδων τους.
 - Επίσης οι γιββεριλλίνες επηρεάζουν την γονιμότητα των φυτών, συγκεκριμένα παίζουν ρόλο στην καταστολή του σχηματισμού των θηλυκών ανθών.
- (7,8,11)

2.5.4 Πεδίο εφαρμογής του γιββεριλλικού οξέος 3

Οι ιδιότητες των γιββεριλλίνων οδήγησαν στην βιομηχανική παραγωγή τους και στην ευρεία χρήση τους στην γεωργία, με πιο διαδεδομένη την GA3. Στην βιομηχανία σιτηρών η χρήση της οδήγησε σε αύξηση της απόδοσης της παραγωγής, καθώς κατέστη δυνατή η προσθήκη μεγαλύτερων ποσοτήτων νιτρικών λιπασμάτων χωρίς όμως να υπάρχει υπέρμετρη ανάπτυξη του φυτού. Παράλληλα, η GA3 χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη των φυτών που εμφανίζουν φαινότυπο 'άνου'. Επίσης γίνεται χρήση της σε αναπτυσσόμενα οπωροφόρα δέντρα ώστε να μειωθεί η άνθηση τους και να έχουν περισσότερο χρόνο να αναπτυχθούν. Σε άλλο επίπεδο, λειτουργεί αποτρεπτικά στην μόλυνση από ιούς των φυτών που μεταφέρονται με τη γύρη. Στην βιομηχανική παραγωγή λουλουδιών χρησιμοποιείται για την ενεργοποίηση των σπόρων τους σε συνθήκες χαμηλής θερμοκρασίας (Azalea, camellia και hydrangea), για να βελτιώσει τον σχηματισμό των ανθών του κυκλάμιου, για να επιτευχθεί αλλά και να αυξηθεί η άνθιση (Spathiphyllum, limonium), και να περιορίσει την απώλεια χλωροφύλλης (Alstroemeria). (11)

2.5.5 Ιδιότητες του γιββεριλλικού οξέος 3



Εικόνα 2 : απεικόνιση του Γιββερειλλικού οξέος 3

Χημικός τύπος : $C_{19}H_{22}O_6$

Μοριακό βάρος: 346,4 g/mol

Διαλυτότητα στο νερό : 5 g/L (25°C)

Διαλυτότητα στην μεθανόλη : 273 g/L (20 °C)

LogP (οκτανόλη-νερό) : 0.24

(11),14

3. Προϊόντα βιοποβλήτων

Παράγονται στην Ελλάδα και παγκοσμίως μεγάλες ποσότητες οργανικών εδαφοβελτιωτικών-λιπασμάτων με διάφορες μεθοδολογίες και από μεγάλη ποικιλία οργανικών πρώτων υλών συνήθως απορριμμάτων και βιοαποβλήτων. Αξιολογούνται ποιοτικά από τον βαθμό ωριμότητας του οργανικού μέρους, των θρεπτικών στοιχείων και την σταθερότητα της σύνθεσης τους.

Οι παραμεσόγειες χώρες αντιμετωπίζουν προβλήματα από την έλλειψη της οργανικής ουσίας στα εδάφη, το 90% από αυτά χαρακτηρίζονται προς ερημοποίηση. Η λύση που παρουσιάζει σειρά πλεονεκτημάτων είναι η συνδυασμένη χρήση των συμβατικών λιπασμάτων με οργανικά λιπάσματα-εδαφοβελτιωτικά.

Τα τελευταία χρόνια ο κλάδος των οργανικών λιπασμάτων αναπτύσσεται σημαντικά. Η έλλειψη όμως προδιαγραφών και ελέγχων επέτρεψε την παραγωγή αμφιλεγόμενων προϊόντων. Από πληροφορίες της αγοράς λίγα θεωρούνται αξιόλογα όπως τα παρακάτω

Χαρακτηριστικά παραδείγματα από τον Ελληνικό Χώρο

1. Προϊόντα από κοπριές: **ΑΓΡΟΣΥΝ**[®] οργανικό λίπασμα που παράγεται από κοπριά πουλερικών . Αγροτικός Πτηνοτροφικός Συνεταιρισμός Ιωαννίνων ΠΙΝΔΟΣ
2. Προϊόντα από γεωργικά υπολείμματα: **BioAgroOliva**[®] από υπολείμματα παραγωγής ελαιολάδου,(φύλλα ελιάς, ελαιοπυρήνα και υγρά). Οργανοχημική Θράκης (μέθοδος Βλυσίδα) (9)
3. Προϊόντα από απορρίμματα λιγνιτωρυχείων EKOTRON[®] παράγεται στην Ελλάδα για λογαριασμό της Ιταλικής εταιρίας ALBAMILAGROI International SPA με την εμπορική ονομασία **EKOTRON** σύμφωνα με τις Ιταλικές προδιαγραφές. Ανήκει στην κατηγορία των οργανοανόργανων λιπασμάτων (10)

Επιλέξαμε δείγματα από το EKOTRON για την εργασία. Αυτά ήταν διαθέσιμα από παραγωγή σε λειτουργία. Είχε ζητηθεί από το εργαστήριο Ανόργανης Χημείας η αξιολόγηση του βάσει σειράς μετρήσεων που απαιτούσε η Ιταλική εταιρία

3.1 Χουμικά

Βασική παράμετρος για την αξιολόγηση των οργανικών εδαφοβελτιωτικών λιπασμάτων είναι η περιεκτικότητά τους σε χουμικά συστατικά.

Η οργανική ύλη του εδάφους αποτελείται από ένα μίγμα φυτικών και ζωικών προϊόντων σε διάφορες καταστάσεις αποσύνθεσης, το οποίο αποτελείται από βιολογικά και χημικά προϊόντα αποικοδόμησης, μικροοργανισμούς και υπολείμματα αποσύνθεσης. Το κύριο μέρος της οργανικής ύλης αποτελείται από χουμικές ουσίες. Αυτές είναι άμορφες, καφέ ή μαύρες, υδρόφιλες, όξινες ουσίες με μοριακό βάρος από μερικές εκατοντάδες έως δεκάδες χιλιάδες.

Τα χουμικά απαντώνται κυρίως σε ιζήματα και εδάφη μαζί με πανίδα, χλωρίδα, αποσυντιθέμενα ζώα και φυτικά υπολείμματα, με μέταλλα, αργίλους και ορυκτά, ενώνονται με ιχνοστοιχεία, ιόντα, μόρια και άλλα βιοπολυμερή και έχουν την τάση να κροκκιδώνονται μέσω φυσικών και χημικών ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ διαφορετικών αλυσίδων των βιοπολυμερών.

Οι ιδιότητες των χουμικών είναι πολύ σημαντικές για την απόδοση των εδαφών. Το οργανικό μέρος των ανόργανων εδαφών είναι συνήθως της τάξεως 1-5% και δεν αποτελεί ικανοποιητικό ποσοστό ώστε να επιτευχθεί παραγωγικότητα στην γεωργία. Τα χουμικά είναι σημαντικοί

κατιονανταλλάκτες, απελευθερώνοντας στα φυτά θρεπτικά υλικά και ιχνοστοιχεία. Επιπλέον έχουν μεγάλο βαθμό αντίστασης απέναντι στη μικροβιακή δράση,

με αποτέλεσμα να γίνεται σταδιακή και βραδεία αποδέσμευση θρεπτικών στοιχείων στο έδαφος. Η βιομετατροπή των χουμικών συστατικών η οποία συντελείται κατά την παραγωγική διαδικασία εδαφοβελτιωτικών οδηγεί πιθανώς και στην παραγωγή φυτορμονών (1,11)

3.2 Περιγραφή του δείγματος EKOTRON®

Το εδαφοβελτιωτικό-λίπασμα EKOTRON® παράγεται σε μορφή κόκκων η σκόνης, το χρώμα του είναι καφέ-μαύρο και έχει χαρακτηριστική οσμή. Μπορεί να διατηρηθεί συσκευασμένο σε σάκο για μεγάλο χρονικό διάστημα, μεγαλύτερο του ενός έτους. Βάσει του ευρωπαϊκού κανονισμού 889/2008, το εδαφοβελτιωτικό-λίπασμα EKOTRON® είναι κατάλληλο για τις βιολογικές καλλιέργειες. Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται οι μετρήσεις που δίνονται από τον προμηθευτή.

Πίνακας1 : Χημική ανάλυση του EKOTRON®

Παράμετρος	Μέσος όρος	Εύρος τιμών
Οργανική ουσία	65 %	61-74%
Χουμικά συστατικά	68% (επί της οργανικής ουσίας)	64-70%
Οργανικός άνθρακας	30%	25-37%
Άζωτο	3%	2,6-3,2%
Σίδηρος	2%	1,7-3,2%
Μαγνήσιο	1%	0,8-1,3%
Μεταλλικά στοιχεία	2%(Cu, Zn, Mn, Mo, B, V)	1,4-2,7%
Μικροοργανισμοί (Βακτήρια, Ακτινομύκητες, Μύκητες)	$3 \cdot 10^7$ c.f.u/g	$2.4-3,2 \cdot 10^7$ c.f.u/g

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Το πειραματικό μέρος χωρίζεται σε δύο μέρη, το πρώτο αφορά τις μετρήσεις (υγρασίας, τέφρας, χουμικών, pH και αγωγιμότητας) που απαιτούνται για τον χημικό χαρακτηρισμό του προϊόντος ως όργανο-ανόργανο λίπασμα και αναφέρονται στο MSDS του. Το δεύτερο μέρος αφορά την ανάπτυξη μεθόδου για τον προσδιορισμό των φυτορμονών γιββερελλικό οξύ 3 GA3 και Ινδόλο-3-οξικό οξύ IAA στο λίπασμα με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή υπεριώδους ορατού (HPLC-UV Vis).

4. Μετρήσεις ποιοτικού ελέγχου στο EKOTRON®

Ο Προσδιορισμός υγρασίας, pH, ηλεκτρικής αγωγιμότητας, τέφρας έγινε με βάση τα ευρωπαϊκά πρότυπα EN ενώ ο προσδιορισμός των χουμικών και του μικροβιακού πληθυσμού έγινε με βάση την εργασία των Kazamias et al. (12).

4.1 Προσδιορισμός υγρασίας

EN 13040, 1999

Εργαστηριακός εξοπλισμός

Ζυγός Sartorius PT120

Φούρνος WTB binder E53

Ύαλοι ωρολογίου

Η υγρασία προσδιορίστηκε με την απώλεια βάρους του δείγματος όταν θερμανθεί στους 110 ± 5 °C μέχρι σταθερού βάρους. Έγινε ζύγιση του δείγματος σε ζυγό δύο δεκαδικών ψηφίων και τοποθετήθηκε στο πυριαντήριο σε θερμοκρασία 110 ± 5 °C. Έγινε ζύγιση του δείγματος ανά μία ώρα μέχρι σταθερού βάρους. Από την διαφορά βάρους υπολογίζεται το ποσοστό υγρασίας .

4.2 Προσδιορισμός pH

EN 13037, 1999

Εργαστηριακός εξοπλισμός

Πεχάμετρο: (PHS-3DpH-meter).

Για τη μέτρηση του pH τοποθετήθηκαν σε ένα ποτήρι ζέσεως των 100 mL, 5 g από το δείγμα και 50 mL απιονισμένου νερού. Μετά από έντονη ανάδευση, το δείγμα αφέθηκε για 15 λεπτά. Στη συνέχεια μετρήθηκε το pH του υπερκείμενου διαλύματος.

4.3 Προσδιορισμός ηλεκτρικής αγωγιμότητας

EN 13038, 199

Εργαστηριακός εξοπλισμός

Αγωγιμόμετρο : Konduktoskop E365B

Για την μέτρηση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας τοποθετήθηκαν σε ένα ποτήρι ζέσεως των 200 mL, 1 g από το δείγμα και 200 mL απιονισμένου νερού. Μετά από ανάδευση μίας ώρας, το δείγμα αφέθηκε για 15 λεπτά. Στη συνέχεια μετρήθηκε η ηλεκτρική αγωγιμότητα του υπερκείμενου

διαλύματος με αγωγιμόμετρο, με κλίμακα μέτρησης εύρους 0 έως 3000 mS/cm. Η αγωγιμότητα εκφράστηκε σε mS/cm και σε mg διαλυμένων αλάτων ανά g δείγματος (1 mS = 2 ppm διαλυμένων αλάτων).

4.4 Προσδιορισμός τέφρας

EN 13037, 1999

Εργαστηριακός εξοπλισμός

Κάψα πορσελάνης

Ζυγός : SartoriusPT120

Φούρνος : Thermolyne by Sybron 1500 Furnace

Για τον προσδιορισμό της τέφρα έγινε λειοτρίβηση του δείγματος και ξήρανση του (100°C) μέχρι σταθερού βάρους. Στη συνέχεια, ζυγίζεται το ξηρό μέρος και τοποθετείται στον φούρνο όταν η θερμοκρασία φτάσει στους 200 °C. Όταν η θερμοκρασία φτάσει στους 825 ± 25 °C , το δείγμα αφήνεται για δύο ώρες . Τοποθετείται σε ξηραντήρα, και όταν κρυώσει γίνεται ζύγιση της τέφρας, από τη διαφορά βάρους υπολογίζεται το ποσοστό της τέφρας επί ξηράς ουσίας.

4.5 Προσδιορισμός χουμικών

Εργαστηριακός εξοπλισμός-αντιδραστήρια:

Φυγόκεντρος BACACOSSCIENTIFICMLWT54

Μαγνητική πλάκα IKAKS130 basic

Φωτόμετρο MRC Spectronic 20D

NaOH (Lach-ner)

Na₄P₂O₇·10H₂O (Mallinckrodt)

Δημιουργία εκχυλιστικού διαλύματος

Ζυγίζονται 44,6 g πυροφωσφορικού Na, τα προσθέτουμε σε ένα ποτήρι ζέσεως μαζί με 500 ml απιονισμένου νερού και θερμαίνουμε ελαφρώς μέχρι να διαλυθεί. Ζυγίζουμε 4g NaOH (Lach-ner) και τα διαλύουμε σε μικρή ποσότητα απιονισμένου νερού. Έπειτα το NaOH προστίθεται στο διάλυμα του πυροφωσφορικού. Τοποθετείται το διάλυμα σε ογκομετρική φιάλη των 1000 ml και συμπληρώνουμε με απιονισμένο νερό. Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

Εκχύλιση

Τοποθετούνται 2 g του δείγματος σε κωνική φιάλη των 100 ml όπου προσθέτουμε 40 ml από το εκχυλιστικό. Το μίγμα αναταράσσεται για 30 λεπτά στη μαγνητική πλάκα ανάδευσης IKAKS130 basic και κατόπιν διατηρείται σε ηρεμία για 12 ώρες. Ύστερα τοποθετείται το διάλυμα σε φιαλίδια φυγοκέντρησης και φυγοκεντρούμε για μισή ώρα στις 3000 στροφές.

Φασματοφωτομετρία

Αραιώνεται 1 ml από το φυγοκεντρημένο διάλυμα σε 250 ml απιονισμένου νερού, σε ογκομετρική φιάλη. Η φωτομέτρηση του διαλύματος γίνεται σε μήκος κύματος 550 nm. Για να υπολογισθεί η μάζα χουμικών χρησιμοποιείται η εξίσωση αναφοράς $y = 10.885x + 0.0014$ με $r^2 = 0.9999$, όπου y η απορρόφηση και όπου x τα χουμικά οξέα σε g στο διάλυμα με αραιώση 1/250. Το αποτέλεσμα

προσαρμόζεται στην αρχική ζύγιση 2 g στα 40 ml και στη συνέχεια με την τιμή επί τοις εκατό ξηράς ουσίας με βάση την υγρασία του δείγματος

$$\frac{\text{μάζα χουμικών}}{100 \text{ g ξηρού δείγματος}} = \frac{(y - 0,0014)}{10,885} \times \frac{40}{2(1 - \text{ποσοστό υγρασίας})} \times 100$$

4.6 Προσδιορισμός μικροβιακού πληθυσμού

Όργανα-Αντιδραστήρια

Δοχείο universal

Αυτόκαυστος : CETRO clan CV2/1600

Επωαστικός κλίβανος : Elvem

Πιπέτα 200-1000 μl

Πιπέτα 50-200 μl

Τρυβλία

Σωληνάκια erendolf

Διάλυμα Ringer

Θρεπτικό μέσο Nutrient agar (LAB) για ολικό μικροβιακό πλυθισμό.

Μέθοδος

Η μέθοδος στηρίζεται στις διαδοχικές αραιώσεις που γίνονται στο αρχικό διάλυμα. Έτσι από το αρχικό διάλυμα όπου 1 g πρώτης ύλης έχει διαλυθεί σε 10 ml διαλύματος Ringer, προκύπτουν με διαδοχικές αραιώσεις διαλύματα με συγκεντρώσεις 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} κ.τ.λ. ως προς το αρχικό. Από κάθε αραιώση 1 ml μεταφέρεται σε τρυβλίο που περιέχει στερεό θρεπτικό μέσο και αμέσως ανακινούμε τα τρυβλία κυκλικά. Με την ανακίνηση των τρυβλίων επιδιώκεται ο πλήρης διαχωρισμός των μικροβιακών κυττάρων μεταξύ τους και η ανάπτυξη αποικιών από κάθε βιώσιμη αναπαραγωγική μονάδα, επιτυγχάνοντας έτσι την απομόνωση μικροβιακών στελεχών. Τοποθετούνται ανεστραμμένα τα τρυβλία σε επωαστικό κλίβανο στους 35 °C. Μετά την επώαση των τρυβλίων για 2-3 ημέρες, αναπτύσσονται αποικίες που στις μικρές αραιώσεις είναι πιο πυκνές και δυσδιάκριτες ενώ στις μεγαλύτερες αραιώνουν. Το πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι μετρώνται μόνο ζώντες μικροοργανισμοί ενώ το μειονέκτημα ότι δεν υπάρχει κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα για όλους τους μικροοργανισμούς. Επίσης, υπάρχουν μικροοργανισμοί που εμποδίζεται η ανάπτυξή τους από άλλους και δεν σχηματίζουν αποικίες. Υπάρχει επομένως πιθανότητα το αποτέλεσμα της καταμέτρησης του πληθυσμού να είναι μικρότερο από το πραγματικό.

Εκχύλιση των μικροοργανισμών από το υπόστρωμα

Η απλούστερη μέθοδος εκχύλισης είναι αυτή που πραγματοποιείται εν αιώρηση των μικροοργανισμών του εδαφικού δείγματος σε κατάλληλο ρυθμιστικό και ανάδευση, ώστε να αποκολληθούν τα κύτταρα από τα εδαφικά συμπλέγματα και να καταστεί δυνατός ο προσδιορισμός τους και η απομόνωσή τους με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων.

Το ρυθμιστικό αυτό διάλυμα (διάλυμα Ringer) που χρησιμοποιούμε για την εκχύλιση του δείγματος είναι ένα υδατικό διάλυμα που περιέχει εν διαλύσει άλατα στις εξής ποσότητες:

Διάλυμα Ringer (Παρασκευή 1000 ml)

2.25 g NaCl (Merck)
0.10 g KCl (Merck)
0.12 g CaCl₂·2H₂O (Merck)
0.05 g NaHCO₃ (Merck)

4.7 Αποτελέσματα

Στον πίνακα 2 παρατίθενται οι μέσοι όροι από πέντε δείγματα ΕΚΟΤΡΟΝ από την ίδια παρτίδα παραγωγής, και εύρη τιμών από μετρήσεις τελευταίας τριετίας, σύνολο εξήντα οκτώ δείγματα. Οι μέσοι όροι είναι σύμφωνα με τις προδιαγραφές που απαιτεί η εταιρία Alba-Milagro.

Πίνακας 2 : Μετρήσεις ποιοτικού ελέγχου 5 δειγμάτων Εκοτρον

Παράμετρος	Μέσος όρος	Εύρος τιμών
Υγρασία (%)	39	35 - 44
pH	7,5	7,2 – 7,7
Ηλεκτρική αγωγιμότητα	280	230 – 310
Τεφρά (%) επί ξηρού	32	25 - 38
Χουμικά (%) επί ξηρού	36	27 - 40
Μικροβιακός Πληθυσμός c.f.u./g	2 10 ⁷	(1 – 3) 10 ⁷

5. Ανάπτυξη μεθόδου για τον προσδιορισμό ινδόλο-3- οξικού οξέος (IAA) και γιββερελικού οξέος 3 (GA3) με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης και ανιχνευτή ορατού-υπεριώδους (HPLC UV-Vis)

5.1 Πρότυπα και αντιδραστήρια

Χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα ινδόλο-3-οξικού οξέος και γιββερελικού οξέος 3, τα οποία αγοράστηκαν από τη Dr. Ehrenstorfer και ήταν καθαρότητας >99,6% και 97,9% αντίστοιχα. Το ακετονιτρίλιο και η μεθανόλη (LC-MS grade) αγοράστηκε από τη Merck (HPLC Grade), η μεθανόλη από τη Fischer Scientific (HPLC Grade), το διόξινο φωσφορικό νάτριο από την Lach-ner, το φωσφορικό οξύ από την Panreac, η ισοπροπανόλη από την Honeywell (HPLC Grade), το υδροχλωρικό οξύ από την Fischer Scientific (HPLC Grade), και το οξικό οξύ Fischer Scientific (HPLC Grade).

Πρότυπα διαλύματα

Παρασκευάστηκε για κάθε αναλύτη ένα πυκνό πρότυπο διάλυμα συγκέντρωσης 1000 μg/ml. 10 mg της πρότυπης ουσίας ζυγίστηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL, και αραιώθηκαν μέχρι τη χαραγή με μεθανόλη καθαρότητας LC-MS grade. Τα διαλύματα παρακαταθήκης αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη (-18 °C) σε σκουρόχρωμα δοχεία ώστε να είναι προστατευμένα από το φως. Κάθε 6 μήνες παρασκευάζονται εκ νέου πρότυπα διαλύματα παρακαταθήκης.

Παρασκευάζονται πρότυπα διαλύματα των 100 μg/mL, αραιώνοντας κατάλληλους όγκους από το διάλυμα των 1000 μg/ml με μεθανόλη. Οι συγκεντρώσεις των προτύπων για την κατασκευή της καμπύλης των προτύπων έγινε αραιώνοντας τα διαλύματα των 100 μg/L με προσθήκη κατάλληλων

όγκων του διαλύματος της κινητής φάσης (74% Υδατικό διάλυμα 30 mM NaH₂PO₄·2H₂O που, με ρύθμιση του pH στο 4 με προσθήκη H₃PO₄, και 26% ακετονιτρίλιο).

Υδατικό διάλυμα της κινητής φάσης

Για την παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος 30 mg NaH₂PO₄·2H₂O (pH=4) , ζυγίστηκαν 2,34 g NaH₂PO₄·2H₂O σε ζυγό ακριβείας 4 δεκαδικών ψηφίων, διαλυτοποιήθηκαν με απιονισμένο H₂O σε ποτήρι ζέσεως. Ακολούθησε ρύθμιση του pH με την προσθήκη αραιού διαλύματος φωσφορικού οξέως στην τιμή 4 με τη χρήση πεχάμετρου. Στη συνέχεια το διάλυμα μεταγγίστηκε σε ογκομετρική φιάλη των 500 mL όπου συμπληρώθηκε μέχρι τη χαραγή με νερό.

5.2 Οργανολογία

Υδροχρωματογραφικό σύστημα Agilent 1100 (B-LC-01), αποτελούμενο από αντλία Agilent 1100 G1311A Quand Pump με δυνατότητα βαθμιδωτής έκλουσης τεσσάρων διαλυτών, των οποίων η απαέρωση πραγματοποιείται με απαερωτή μεμβράνης Agilent 1100 G1379A0, ανιχνευτή ορατού υπεριώδους VWD Agilent 1100 G1314A και φθορισμομετρικό ανιχνευτή Agilent 1100 FLDG1321A και βρόχο εισαγωγής δείγματος 20 μL.

Στο παραπάνω υδροχρωματογραφικό σύστημα περιλαμβάνεται, επίσης, αναλυτική στήλη αντιστροφής φάσης C18, Luna-C18, διαμέτρου 4,6 mm, μήκους 150 mm και διαμέτρου σωματιδίων πλήρωσης 5 μm. Η καταγραφή και η επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιείται με το λογισμικό πρόγραμμα Agilent Chemstation.

Εργαστηριακός εξοπλισμός

- Συσκευή παραγωγής υπερκάθαρου νερού ειδικής αντίστασης 18,2 MΩ/cm (Millipore Direct-Q UV)
- Λουτρό υπερήχων Selecta Ultrasons H-D (3000866).
- Συσκευή περιδίνησης (vortex) τύπου GV Lab Gilson.
- Φυγοκεντρική συσκευή (Rotofix 32 Hettich)
- Διακριβωμένος αναλυτικός ζυγός τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων B-01 Sartorius basic
- Συσκευή εξάτμισης με αέριο N₂ (nitrogen evaporator).
- Οριζόντιος αυτόματος αναδευτήρας, IKA Vibrax VXR Basic.
- Αυτόματες πιπέτες μεταβλητού όγκου 1-10 μL (Gilson), 5-50 μL (Hirschmann) 10-100 μL (Transferpette Digital, Smart Accumax, Gilson), 20-200 μL (Transferpette Digital) και 100-1000 μL (Transferpette Digital, Smart Accumax, Gilson) διακριβωμένες.
- Φίλτρα σύριγγας αναγεννημένης κυτταρίνης (RC), μέγεθος πόρων 0,2 μm, διαμέτρου 15 mm.
- Φυσίγγια υδρόφιλων - λιπόφιλων αλληλεπιδράσεων OASIS HLB 3cc (waters).
- Φυγοκεντρικοί σωλήνες των 50 και των 25 mL.
- Ποτήρια ζέσεως.
- Ογκομετρικός κύλινδρος των 10 mL.
- Ογκομετρικές φιάλες των 10, 50, 100 και 500 mL, τύπου A διακριβωμένες.
- Πλαστικές πιπέτες Pasteur.
- Δοκιμαστικοί σωλήνες.

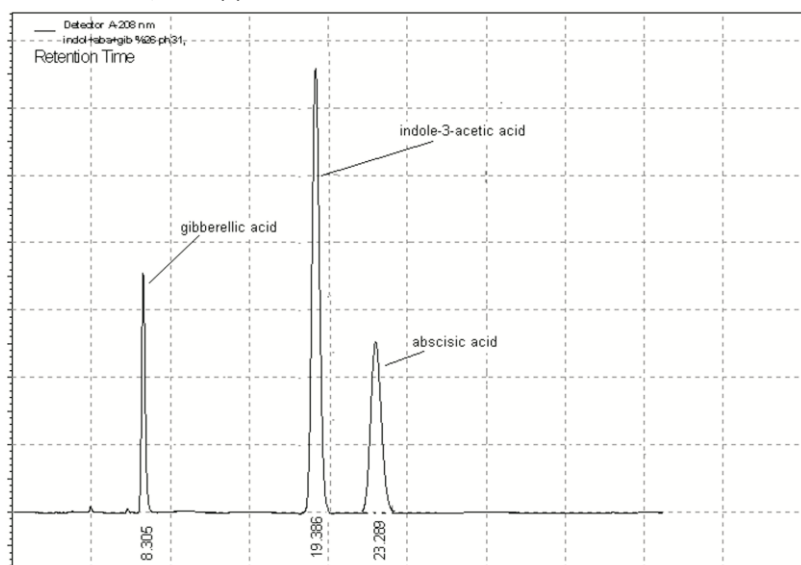
5.3 Χρωματογραφική ανάλυση

5.3.1 Ανάπτυξη της μεθόδου

Κατά την ανάπτυξη της χρωματογραφικής μεθόδου, αρχικά βελτιστοποιήθηκε το χρωματογραφικό μέρος (σύσταση και σύνθεση κινητής φάσης, ροή κινητής φάσης, θερμοκρασία στήλης, μήκος κύματος ανιχνευτή). Στόχος της βελτιστοποίησης αυτής είναι η επίτευξη χρωματογραφικών κορυφών διαχωρισμένων μεταξύ τους, με ικανοποιητική ένταση και καλά χρωματογραφικά χαρακτηριστικά.

Στη συνέχεια για τον προσδιορισμό των φυτορμονών στο δείγμα, επιλέχθηκε μια προκατεργασία που να εκχλιρίζει τις φυτομόνες από το δείγμα, να απομακρύνει τα συστατικά της μήτρας καθώς και να επιτυγχάνει προσυγκέντρωση των αναλυτών του ενδιαφέροντος μας.

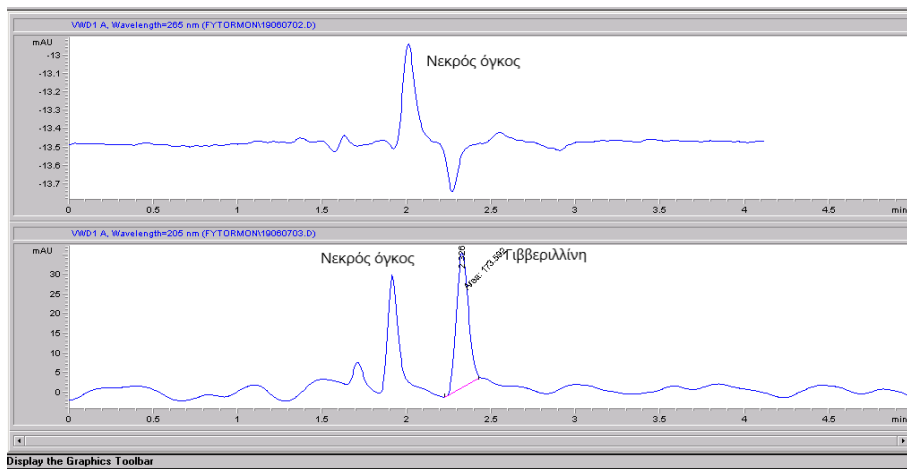
Μέσα από βιβλιογραφική ανασκόπηση άρθρων για τον προσδιορισμό των IAA και GA3, και μιας σειράς πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν διαμορφώθηκε η τελική μέθοδος για τη μέτρηση των δύο αυτών φυτοορμονών.



Εικόνα3 : Χρωματογράφημα από την εργασία των M.Kenneletal όπου φαίνονται κατά σειράι κορυφές των GA3, IAA, ABA. Χαρακτηριστικό παράδειγμα κορυφών με καλά χρωματογραφικά χαρακτηριστικά, οι κορυφές είναι οξείες, και διαχωρισμένες μεταξύ τους.

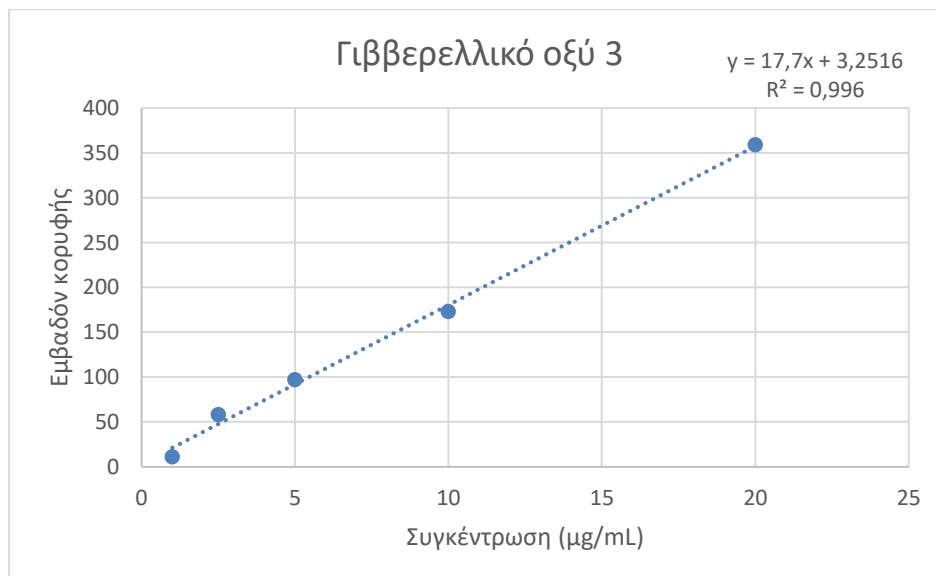
Δοκιμή 1^η- Κατασκευή καμπύλης αναφοράς προτύπων με κινητή φάση μεθανόλη : νερού (οξικό οξύ 6%) με αναλογία 60 :40

Σχετικά με την χρωματογραφία, επιλέχθηκε η κινητή φάση μεθανόλη : υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 0,6 %σε αναλογία 60:40 και δοκιμάστηκαν τα μήκη κύματος 265nm και 208 nm (εικόνα 4)που αναφέρονται στη βιβλιογραφία στο άρθρο των Guptaetal (3), ωστόσο για τη GA3 δε παρατηρήθηκαν χρωματογραφικές κορυφές στα 254nm και 265nm. Συνεπώς, χρωματογραφική κορυφή παρατηρήθηκε στα 208 nm, τα οποία και επιλέχθηκαν.

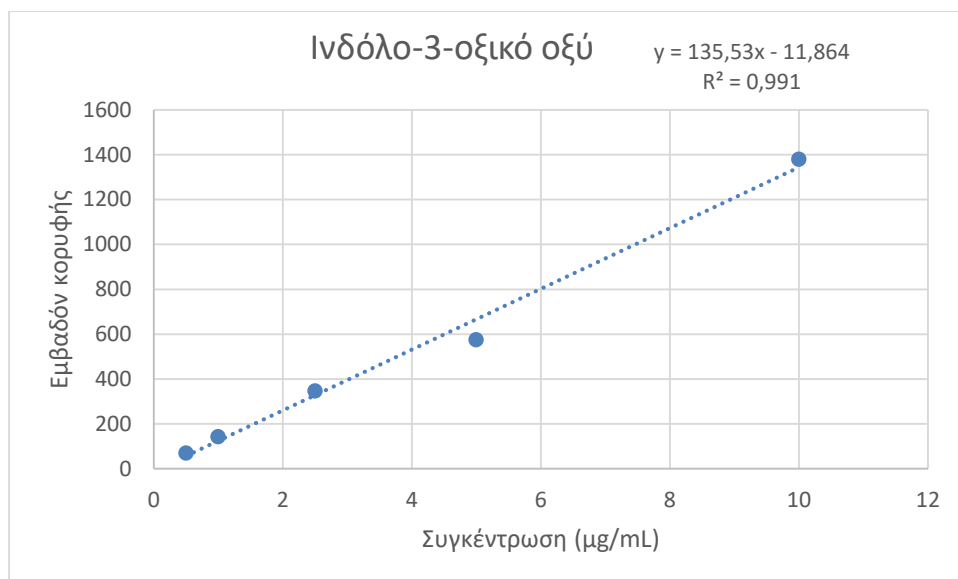


Εικόνα 4 : χρωματογραφήματα πρότυπου διαλύματος GA3 10 µg/mL ,με κινητή φάση μεθανόλη : υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 0,6 % σε αναλογία 60:40το πάνω με μέτρηση στα 265nm όπου δεν εμφανίζει κορυφή και το κάτω με μέτρηση στα 208nm

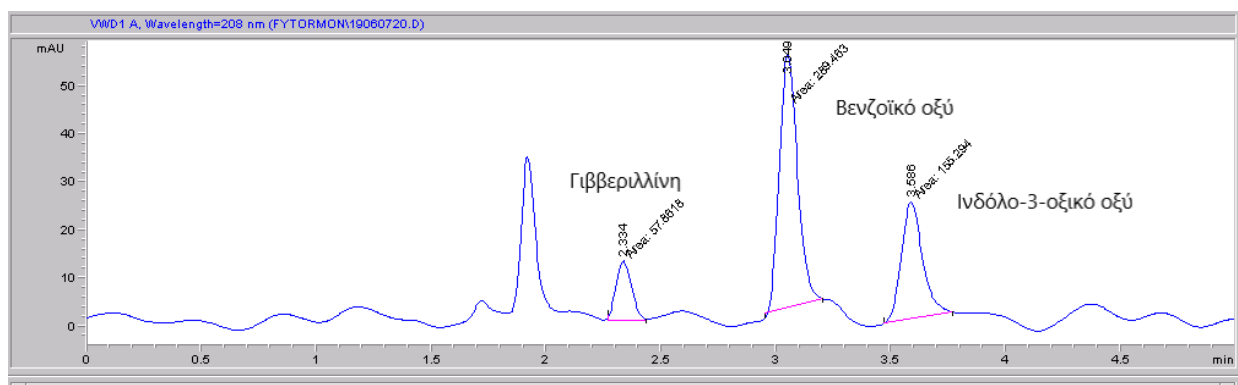
Η ευαισθησία της μεθόδου για το GA3 δεν ήταν ικανοποιητική καθώς για πρότυπο διάλυμα συγκέντρωσης 1 µg/mL, το εμβαδόν κορυφής ήταν πολύ χαμηλό (10,9), ενώ οι χρωματογραφικές κορυφές που λήφθηκαν και για τους δύο αναλύτες ήταν ιδιαίτερα διευρυμμένες. Παράλληλα, οι αναλύτες εκλούονταν νωρίς και υπήρχε ο κίνδυνος συνέκλουσης τους με τα συστατικά της μήτρας, καθώς η GA3 εμφάνιζε χρόνο έκλουσης 2,3min ενώ η IAA 3,6min.



Εικόνα 5 : καμπύλη αναφοράς προτύπων GA3 με κινητή φάση μεθανόλη : υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 0,6 % σε αναλογία 60:40



Εικόνα 6 : καμπύλη αναφοράς προτύπων GA3 με κινητή φάση μεθανόλη : υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 0,6 % σε αναλογία 60:40.



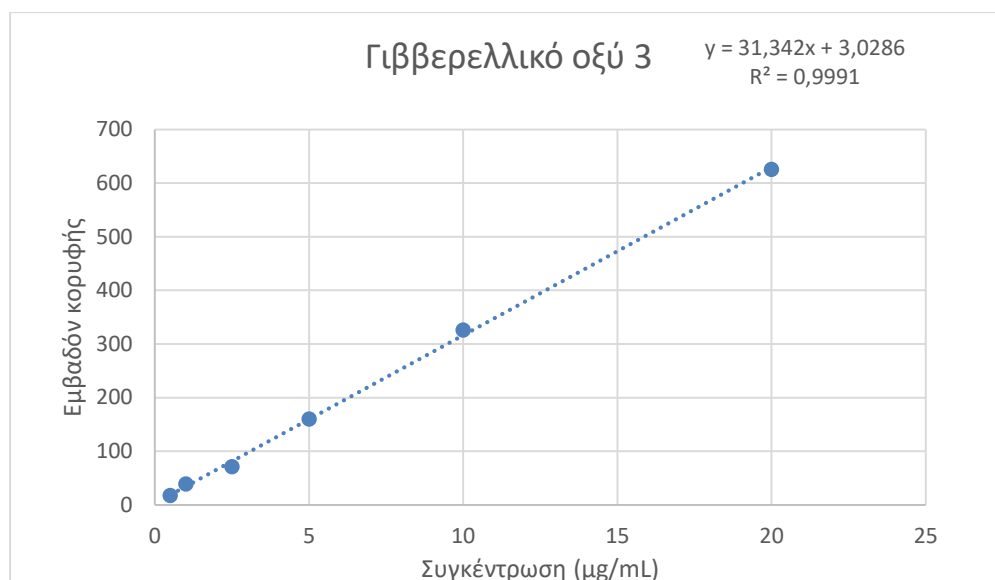
Εικόνα 7 : χρωματογράφημα προτύπων GA3 10 µg/mL , βενζοϊκό οξύ 5 µg/mL και IAA 2,5 µg/mL με κινητή φάση μεθανόλη : υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 0,6 % σε αναλογία 60:40 και μήκος κύματος 208 nm. Το βενζοϊκό οξύ χρησιμοποιείται ως εσωτερικό πρότυπο στην βιβλιογραφία.

Οι καμπύλες αναφοράς που κατασκευάστηκαν από τα πρότυπα διαλύματα GA3 και IAA είναι γραμμικές, αφού ο συντελεστής συσχέτισης R^2 και των δύο είναι μεγαλύτερος από 0,99 (0,996 για το GA3 και 0,991 για IAA).

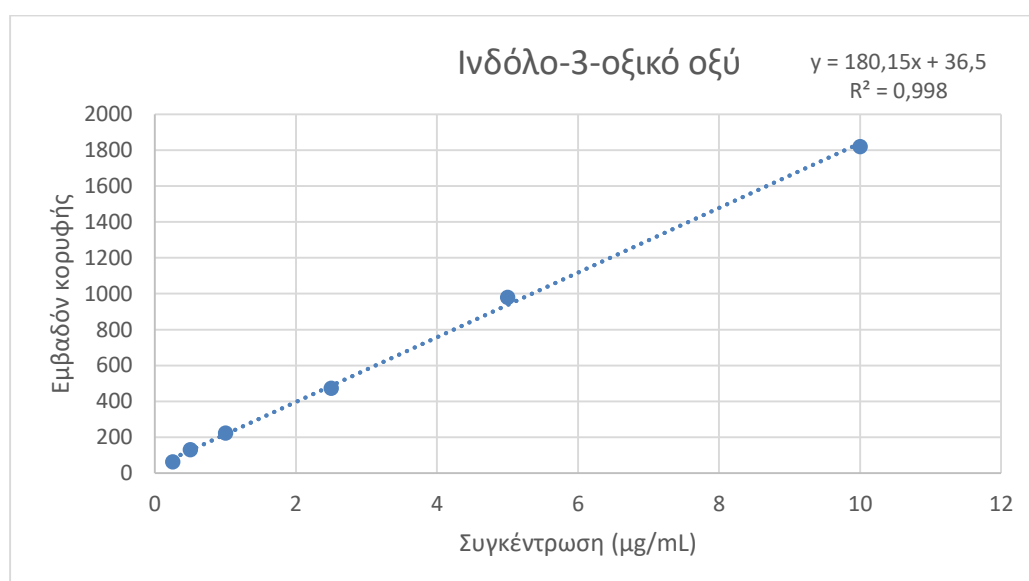
Δοκιμή 2^η- Κατασκευή καμπύλης αναφοράς προτύπων με κινητή φάση υδατικό διάλυμα 30 mM NaH₂PO₄·2H₂O (pH = 4) : ακετονιτρίλιο

Δοκιμάστηκε η κινητή φάση σε 74% ρυθμιστικό διάλυμα 30 mM NaH₂PO₄·2H₂O, με ρύθμιση του pH στο 4 με προσθήκη H₃PO₄, και 26% ακετονιτρίλιο όπως αναφέρεται στο άρθρο των M.Kennel et al (13) , ώστε να βελτιωθεί η απορρόφηση της GA3. Από την μέτρηση των προτύπων προέκυψε μεγαλύτερη απορρόφηση της GA3. Παράλληλα προέκυψε μεγάλη διαφορά στους χρόνους έκλουσης με GA3 $t_R=3,223$ και IAA $t_R=8,775$, που οφείλεται στην χρήση περισσότερο πολικής κινητής φάσης με αποτέλεσμα η IAA να κατακρατείται περισσότερο από την μη πολική στήλη C-18.

Η διάλυση των προτύπων έγινε σε μεθανόλη όπως και ανασύσταση των δειγμάτων στο τελευταίο στάδιο έγινε με μεθανόλη.



Εικόνα 8 : καμπύλη αναφοράς προτύπων GA3 με κινητή φάση υδατικό διάλυμα 30 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (pH = 4) : ακετονιτρίλιο σε αναλογία 74:26, με διάλυση των προτύπων σε μεθανόλη.



Εικόνα 9 :καμπύλη αναφοράς προτύπων IAA με κινητή φάση υδατικό διάλυμα 30 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (pH = 4) : ακετονιτρίλιο με αναλογία 74:26, με διάλυση των προτύπων σε μεθανόλη.

Από τους συντελεστές συσχέτισης προκύπτει ότι και οι 2 καμπύλες είναι γραμμικές. Επίσης φαίνεται η υψηλότερη απορρόφηση της GA3 καθώς η κλίση της ευθείας με την κινητή φάση ρυθμιστικό διάλυμα-ακετονιτρίλιο είναι μεγαλύτερη από την κλίση ευθείας της κινητής φάσης μεθανόλη : νερό.

Δοκιμή 3^η – Βελτιστοποίηση της προκατεργασίας

Για την προκατεργασία του δείγματος ακολουθήθηκε η προκατεργασία που περιγράφεται για τον προσδιορισμό των IAA, GA3 και PAA σε δείγμα compost από τους Kilmas et al (14) με κάποιες τροποποιήσεις. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε προσαρμογή στις προτεινόμενες ποσότητες, (ζυγίστηκε η μισή ποσότητα) αλλά διατηρήθηκε η αναλογία στον όγκο του εκχυλιστικού. Επιπλέον έγινε φυγοκέντρηση του δείγματος πριν την εξάτμιση του διαλύτη στο rotary evaporator. Στη συνέχεια έγινε μέτρηση του δείγματος, όπου στο χρωματογράφημα φάνηκε η συνέκλωση του GA3 με τα συστατικά της μήτρας. Δοκιμάστηκαν αλλαγές στην σύσταση της κινητής φάσης κάνοντας την λιγότερο πολική, με αύξηση του ποσοστού του ακετονιτριλίου (βαθμιδωτή έκλωση), για να αυξηθεί ο χρόνος έκλωσης της GA3 αλλά δεν επετεύχθη ο διαχωρισμός από την μήτρα.

Λόγω της έντονης επίδρασης της μήτρας δημιουργήθηκε η ανάγκη για περαιτέρω καθαρισμού του δείγματος με την χρήση στηλών στερεάς εκχύλισης. Επιλέχθηκε η χρήση των φυσιγγίων υδροφίλων λιπόφιλων αλληλεπιδράσεων OASIS HLB (Hydrophilic Lipophilic Balanced Copolymer) για τον καθαρισμό και την προσυγκέντρωση του δείγματος, από το άρθρο των Sienje et al(15).

5.3.2 Βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες

Οι συνθήκες στον υγροχρωματογράφο είναι οι ακόλουθες:

- Χρωματογραφική στήλη: Luna C18 (διαμέτρου 4,6 mm, μήκους 150 mm και διαμέτρου σωματιδίων πλήρωσης 5 μm)
- Ροή κινητής φάσης: 0,8 mL/min
- Εισαγόμενος όγκος : 20 μL
- Μήκος κύματος ανιχνευτή : 208 nm
- Θερμοκρασία στήλης : 27°C ± 2 °C
- Κινητή φάση: **A** : Υδατικό διάλυμα 30 mM NaH₂PO₄·2H₂O (pH=4) **B** : Ακετονιτρίλιο

Το πρόγραμμα ισοκρατικής έκλωσης είναι το:

Πίνακας 3 : πρόγραμμα ισοκρατικής έκλωσης χρωματογραφίας

Χρόνος(min)	%A	%B
0	74	26
10	74	26

Εισαγόμενος όγκος : 20 μL

5.4 Προκατεργασία των δειγμάτων.

Η διαδικασία προκατεργασίας των δειγμάτων μέχρι τον υγρό χρωματογραφικό προσδιορισμό τους περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

5.4.1 Εκχύλιση

1. Τέσσερις ζυγίσεις 2 g αποξηραμένου δείγματος (Ekotron) σε ποτήρια ζέσεως όπου γίνεται εμβολιασμός των τριών εξ αυτών (spike) με πρότυπα διαλύματα (1000 ppm) των φυτορμονών
2. Τα δείγματα εκχυλίζονται με 20 mL διαλύματος Ισοπροπανόλης- νερού σε αναλογία 4:1 με 1 % του συνολικού όγκου του διαλύματος οξικό οξύ.
3. Τοποθετήθηκε σε οριζόντιο αναδευτήρα για 15 min.
4. Τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων για μία ώρα στους 35 °C .
5. Φυγοκέντρωση για 10 min, 4000 rpm.
6. Συλλογή 17 mL από το υπερκείμενο υγρό και εξάτμιση του διαλύτη μέχρι ξηρού με χρήση του rotary evaporator .
7. Ακολούθησε ανασύσταση με την προσθήκη με 20 mL H₂O οξινισμένο με υδροχλωρικό οξύ (pH=3)

5.4.2 Καθαρισμός εκχυλίματος

1. Για τον καθαρισμό και την προσυγκέντρωση των αναλυτών του δείγματος χρησιμοποιήθηκαν φυσίγγια (OASIS HLB) τα οποία καθαρίστηκαν με 6 mL MeOH, και εξισορροπήθηκαν με 6 mL H₂O (pH=3)
2. Φόρτωση του δείγματος στη στήλη, έκπλυση με 4 mL H₂O και έκλουση με 4 mL MeOH.
3. Εξάτμιση της MeOH μέχρι ξηρού, υπό κενό με ροή αζώτου και θερμοκρασία 35 °C με χρήση του nitrogen evaporator
4. Ανασύσταση του στερεού υπολείμματος με προσθήκη 300 μL ρυθμιστικού-ακετονιτρίλιο (κινητή φάση)
5. Φιλτράρισμα από φίλτρα σύριγγας αναγεννημένης κυτταρίνης 0,20 μm.

5.4.3 Παρασκευή εμβολιασμένων δειγμάτων

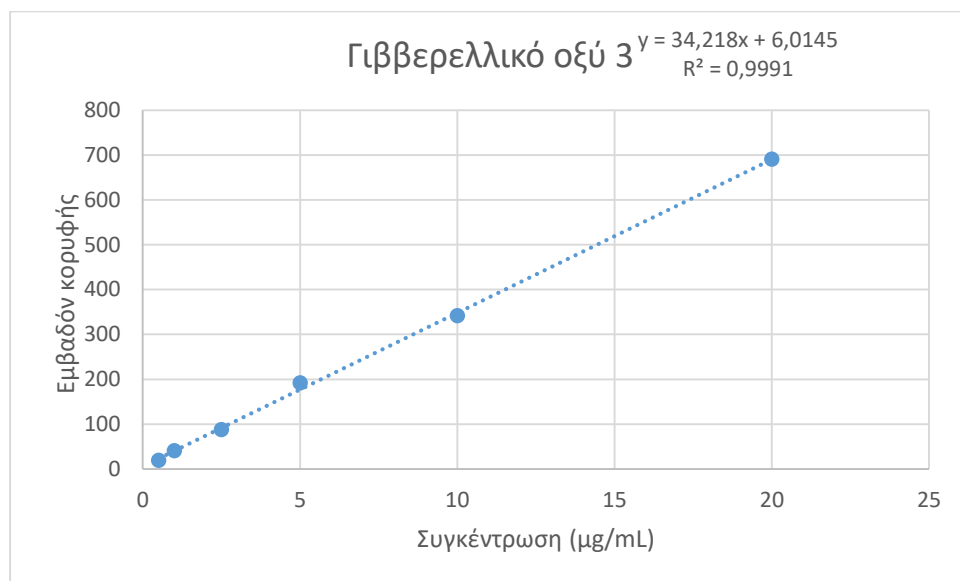
Πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων με σκοπό την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση των αναλυτών και τον υπολογισμό του ποσοστού της ανάκτησης για τον κάθε αναλύτη. Από τα πρότυπα διαλύματα των 100 μg/mL εμβολιάστηκαν 3 δείγματα των 2 g EKOTRON.

Πίνακας 4 : Επίπεδα συγκεντρώσεων για το GA3 και το IAA στα εμβολιασμένα δείγματα

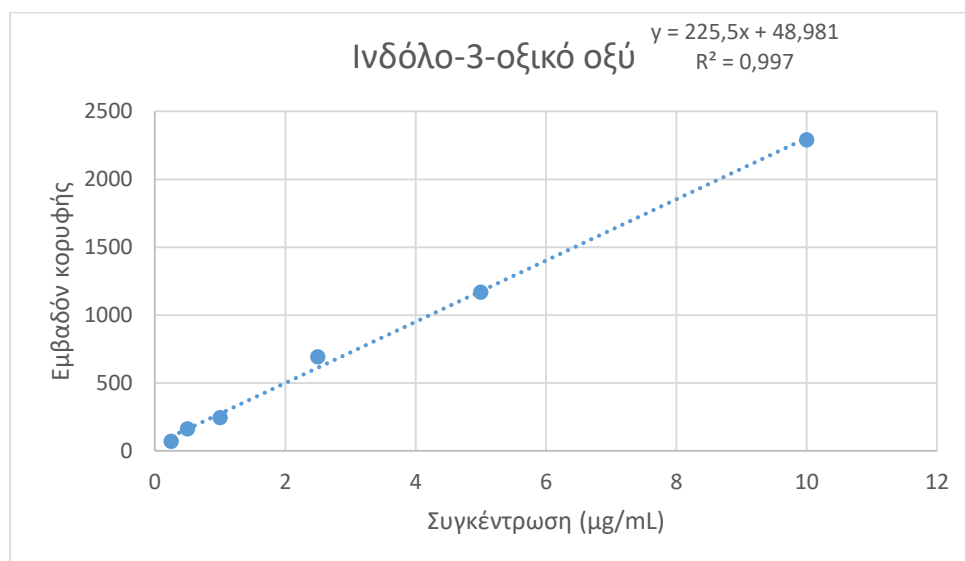
Επίπεδο συγκέντρωσης	Γιββερελλικό οξύ 3 (μg/g)	Ινδόλο-3-οξικό οξύ (μg/g)
Χαμηλό (Spike 1)	10	2,5
Μέσο (Spike 2)	20	5
Υψηλό (Spike 3)	30	10

5.5 Γραμμικότητα

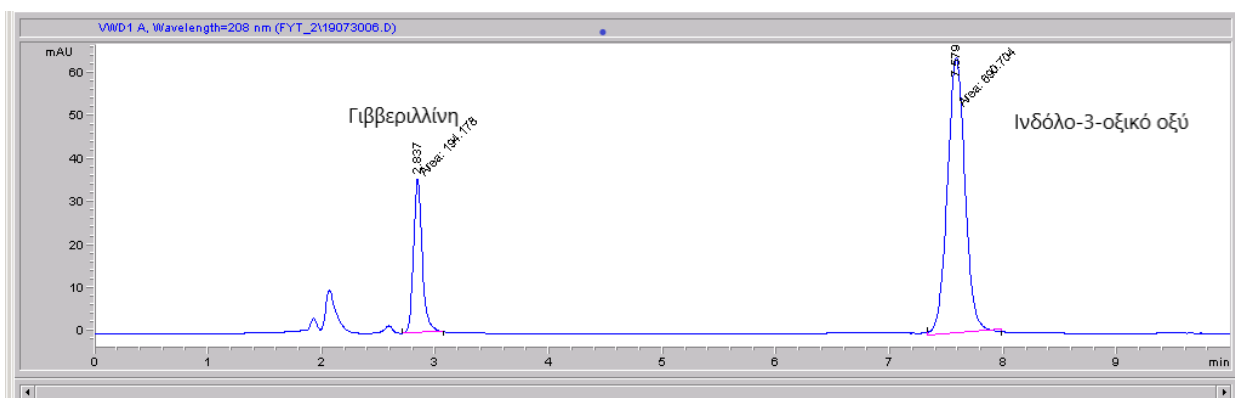
Για να ελεγχθεί η γραμμικότητα των αναλυτών αναλύθηκαν 5 πρότυπα διαλύματα γιββερελλικού οξέος 3 και ινδόλο-3-οξικό οξύ, και κατασκευαστήκαν καμπύλες προτύπων. Η κατασκευή τους έγινε πριν την μέτρηση με την διάλυση των προτύπων στο διάλυμα της κινητής φάσης (ρυθμιστικό-ακετονιτρίλιο) για τον εντοπισμό του χρόνου έκλουσης αλλά και για επιβεβαίωση της διατηρησιμότητας των προτύπων. Από το πείραμα αυτό φάνηκε ότι επιτυγχάνονται υψηλότερες κορυφές σε σχέση με τη διάλυση τους σε μεθανόλη.



Εικόνα 10 : καμπύλη αναφοράς προτύπων GA3 με κινητή φάση υδατικό διάλυμα 30 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (pH = 4) : ακετονιτρίλιο με αναλογία 74:26 ,πριν τη μέτρηση με διάλυση των προτύπων στο διάλυμα της κινητής φάσης.



Εικόνα 11 : καμπύλη αναφοράς προτύπων GA3 με κινητή φάση υδατικό διάλυμα 30 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (pH = 4) : ακετονιτρίλιο με αναλογία 74:26 , πριν την μέτρηση με διάλυση των προτύπων στο διάλυμα της κινητής φάσης.

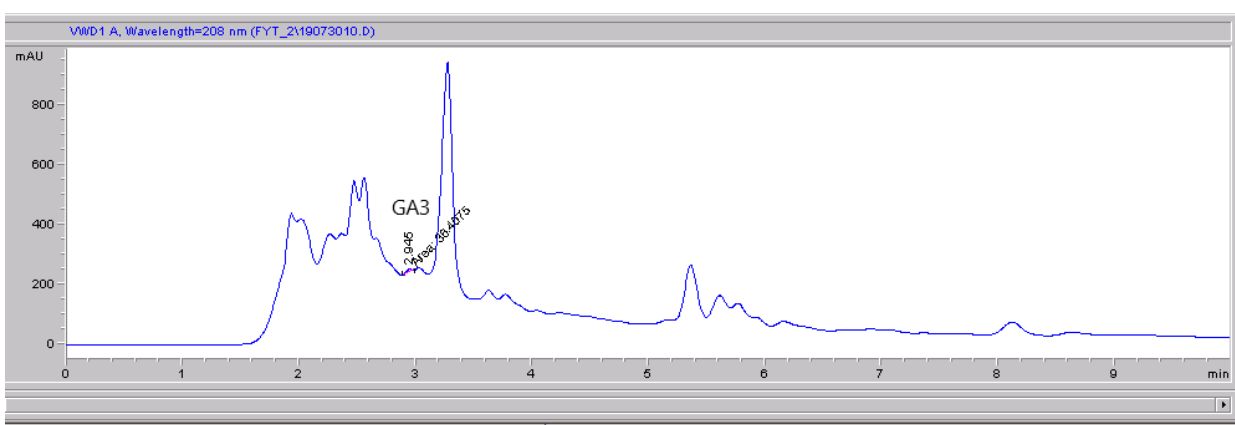


Εικόνα 12 χρωματογράφημα προτύπων GA3 10 µg/mL και IAA 2,5 µg/mL με κινητή φάση υδατικό διάλυμα 30 mM NaH₂PO₄·2H₂O (pH = 4) με προσθήκη H₃PO₄ : ακετονιτρίλιο με αναλογία 74:26, πριν την μέτρηση με διάλυση των προτύπων στο διάλυμα της κινητής φάσης.

Από τις μετρήσεις των προτύπων προέκυψαν και οι μέσοι χρόνοι έκλουσης : Γιββερελλικό οξύ $t_{r(\mu\epsilon\sigma\sigma)}=2,813$, Ινδόλο-3-οξικό οξύ $t_{r(\mu\epsilon\sigma\sigma)}=7,566$.

5.6 Αποτελέσματα

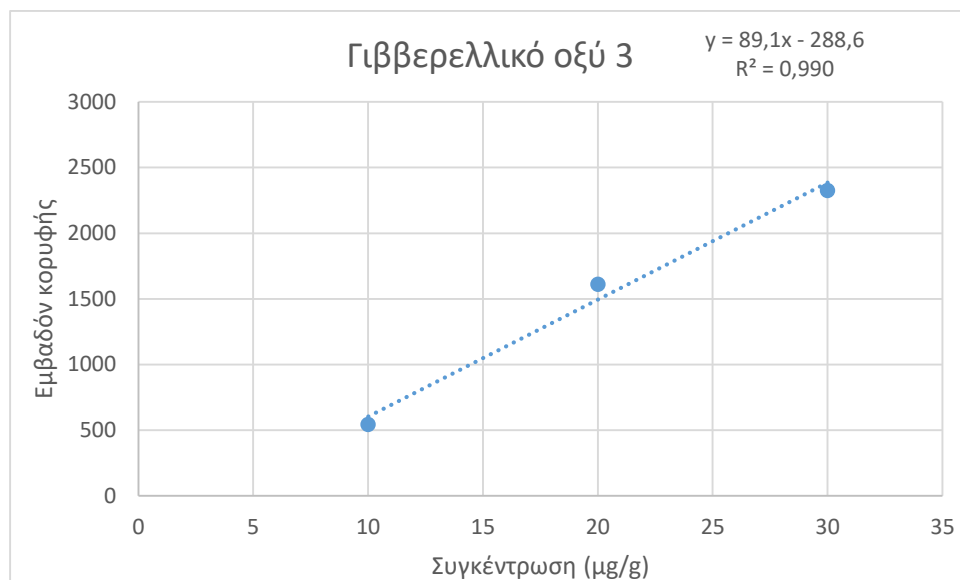
Το γιββερελλικό οξύ εμφάνισε χρωματογραφική κορυφή στο δείγμα η οποία επιβεβαιώθηκε μέσω των εμβολιασμένων δειγμάτων. Επειδή είναι μικρής έντασης και εκλύεται στον ίδιο χρόνο με τα συστατικά της μήτρας δεν μπορεί να ποσοτικοποιηθεί με ακρίβεια (κοντά στο όριο ανίχνευσης), η συγκέντρωση του γιββερελλικού οξέος 3 που προέκυψε είναι 3,4 µg/g. Το Ινδόλο-3-οξικό οξύ δεν εμφάνισε κορυφή στο δείγμα, συνεπώς είναι χαμηλότερο από το όριο ανίχνευση της μεθόδου. Οι ανακτήσεις για το GA3 ήταν 29% και για το IAA 33% , αντίστοιχα, οι οποίες κρίνονται χαμηλές και για αυτό λόγο η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε βάσει των εμβολιασμένων δειγμάτων και μέσω αυτής προέκυψε ενδεικτικά όρια ανίχνευσης 2,95 µg/g για το γιββερελλικό οξύ 3 και 0,01 µg/g για το Ινδόλο-3-οξικό οξύ.



Εικόνα 13 χρωματογράφημα του δείγματος ,όπου φαίνεται η σύνεγκλουση του GA3 με συστατικά της μήτρας καθιστώντας αδύνατη την ποσοτικοποίησή του.

5.6.1 Ποσοτικοποίηση με τα εμβολιασμένα δείγματα

Με συσχέτιση της συγκέντρωσης των φυτορμονών που προέκυψε από τον εμβολιασμό στα αρχικά 2gμε την απορρόφηση (εμβαδόν_{εμβολιασμένου} - εμβαδόν_{δείγματος}), υπολογίζεται η συγκέντρωση των φυτορμονών στο δείγμα από την απορρόφηση του.



Εικόνα 14 : καμπύλη προσθήκης του Γιββερελλικού οξέος 3

$$C \left(\frac{\mu g}{g} \right) = \frac{\text{εμβαδόν} + 288,6}{89,1}$$

5.6.2 Ποσοτικοποίηση με το ποσοστό ανάκτησης

Υπολογίζονται μέσω της εξίσωσης των προτύπων του γιββερελλικού οξέος 3 τα μg/mL στα 300 μL του προσυγκεντρωμένου δείγματος

$$C \left(\frac{\mu g}{mL} \right) = \frac{\text{εμβαδόν} + 6,0145}{34,238}$$

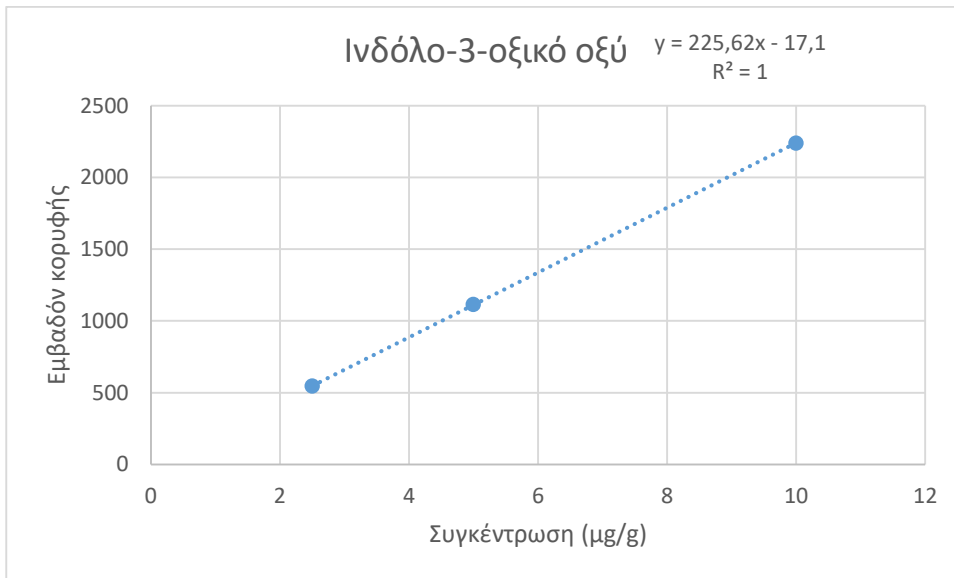
Η συγκέντρωση στα 2g δείγματος υπολογίζεται μέσω της ανάκτησης:

$$C \left(\frac{\mu g}{g} \right) = \frac{C(\mu g/mL)_{\text{προσυγκεντρωμένο δείγμα}} \times \frac{1}{\text{ανάκτηση}}}{5,66}$$

η ανάκτηση είναι ο λόγος: $\frac{C(\mu g/mL)_{\text{πειραματικό εμβολιασμένο}} - C(\mu g/mL)_{\text{δείγμα}}}{C \left(\frac{\mu g}{mL} \right)_{\text{θεωρητικά εμβολιασμένο}}}$

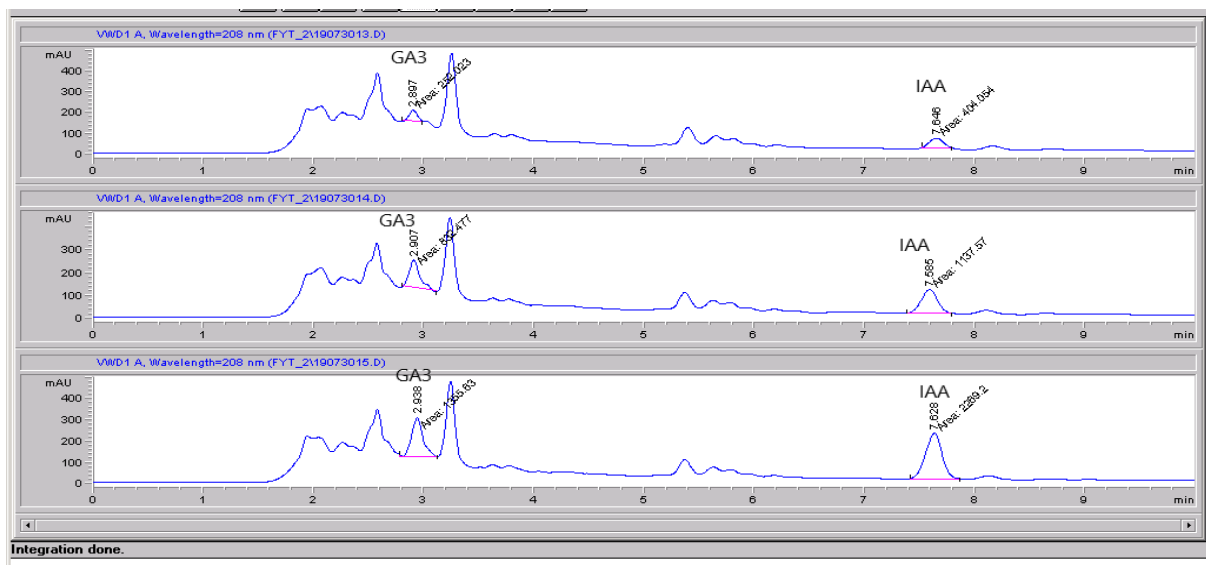
ο όρος $C \left(\frac{\mu g}{mL} \right)_{\text{θεωρητικό εμβολιασμένο}}$ αναφέρεται στην συγκέντρωση που θα εμφάνιζε το εμβολιασμένο δείγμα αν η ανάκτηση ήταν 100% (συγκέντρωση εμβολιασμού επί τον συντελεστή προσυγκέντρωσης). Ο συντελεστής προσυγκέντρωσης έχει μονάδες g/mL.

Ινδόλο-3-οξικό οξύ



Εικόνα 15 :καμπύλη προσθήκης Ινδόλο-3-οξικού οξέος

Ο συντελεστής συσχέτισης $R^2=1$, δείχνει ότι οι επιλεγμένες χρωματογραφικές συνθήκες είναι κατάλληλες για την μέτρηση του Ινδόλο-3-οξικού οξέος.



Εικόνα 16 : χρωματογράφημα των εμβολιασμένων δειγμάτων , φαίνονται οι κορυφές των γιββερελλικό οξύ 3 και ινδόλο-3-οξικό οξύ και πως αυτές αυξάνονται γραμμικά από το χαμηλό στον υψηλό εμβολιασμό. Το 1^ο χρωματογράφημα αντιστοιχεί στο χαμηλό (spike 1) , το 2^ο στο μέσο (spike 2) και το 3^ο στο υψηλό (spike 3).

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Έγινε εκτενής βιβλιογραφική έρευνα και διαπιστώθηκε ότι η παρουσία ελεύθερων φυτορμονών στα κόμποστ - εδαφοβελτιωτικά δεν έχει τεκμηριωθεί.
2. Γνωρίζοντας την αυξητική δράση των χουμικών επιλέχθηκε δείγμα με μεγάλη περιεκτικότητα σε χουμικά αυξάνοντας έτσι τις πιθανότητες ευρέσεως φυτορμονών
3. Στο δείγμα εντοπίστηκε απορρόφηση του γιββερελλικού οξέος η οποία επιβεβαιώθηκε από τα εμβολιασμένα δείγματα, συνεπώς υπάρχει η ουσία στο δείγμα.
4. Το ινδόλο-3-οξικό οξύ δεν υπάρχει στο δείγμα σε τιμή πάνω από 0,1 μg/g
5. Η εκχύλιση του γιββερελλικού οξέος 3 και του ινδόλο-3-οξικού οξέος επετεύχθη αλλά με χαμηλά ποσοστά ανάκτησης.
6. Δεν ήταν ικανοποιητικός ο καθαρισμός από τα συστατικά της μήτρας, και καθώς η χρωματογραφική κορυφή του γιββερελλικού οξέος είναι μικρής έντασης και εκλούεται στον ίδιο χρόνο με τα συστατικά της μήτρας έτσι δεν μπορεί να ποσοτικοποιηθεί με ακρίβεια. Η τιμή της συγκέντρωσης του υπολογίστηκε 3,4 μg/g
7. Με αλλαγή του ανιχνευτή από ορατού-υπεριώδους (UV-Vis) σε φασματοσκοπίας μάζας (MS) πιθανώς θα καταστεί εφικτή η ποσοτικοποίηση με τη συγκεκριμένη μέθοδο, καθώς η ύπαρξη των συστατικών της μήτρας δεν εμποδίζει την ποσοτική ανάλυση.
8. Προτείνεται η συνέχεια της έρευνας και των μετρήσεων και σε άλλα προϊόντα ώστε να επιβεβαιωθεί και να ποσοτικοποιηθεί η παρουσία των φυτορμονών στα κόμποστ-εδαφοβελτιωτικά.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Davies G. and Ghabbour E.A. (1998). <<Humic Substances Structures Properties and Uses>>, The Royal Society of Chemistry, pages 227-233
2. Ravindran B, Wong JW, Selvam A, Sekaran G.<<Influence of microbial diversity and plant growth hormones in compost and vermicompost from fermented tannery waste>>, *Bioresource Technology*,Vol 217, pages 200-204
3. Gupta V., Kumar M., Brahmabhatt H., Reddy C., Seth A. and Jha B. (2011).<<Simultaneous determination of different endogenous plant growth regulators in common green seaweeds using dispersive liquid-liquid microextraction method>>, *Plant physiology and Biochemistry*, Vol 49, pages 1259-1263
4. Bris Le M. (2003). << Hormones in Growth and Development>>, In *Encyclopedia of Rose Science*, Roberts A, Elsevier, pages 364-369
5. Santner A., Calderon L. and Estelle M. (2009). << Plant Hormones are versatile chemical regulators of plant growth>>, *Nature Chemical Biology*, Vol. 5, pages 301-307
6. Estelle M. (2001). <<Plant Hormones>>, In *Encyclopedia of genetics*, Brenner S., Miller J., Academic Press, pages 1480-1481
7. Binenbaum J., Weinstain R. and Shani E. (2018). <<Gibberellin Localization and Transport in Plants>>, *Trends in Plant Science*, Vol 23, pages 410-421
8. Daviere G. and Achard P. (2018). <<Gibberellin signaling in plants>>, *Development*, Vol. 140, pages 1147-1151.
9. Vlysidis G. A., Bouranis D., Loizidou M. and Karvouni G. (1996).<<Study of a demonstration plant for co-composting of olive oil processing wastewater and solid residue>>, *Bioresource Technology*, Vol. 56, pages 187 – 193
10. ΠΡΑΞΕ 2005-2008 Παραγωγή, προώθηση και διάθεση ειδικών οργανικών, οργανοανόργανων λιπασμάτων και υποστρωμάτων ελεγχόμενης διαθεσιμότητας θρεπτικών στοιχείων Φορέας ALCHEMA ΕΠΕ (όμιλος ΣΠΥΡΟΥ ΑΕΒΕ))
11. Miezah, K., Ofosu-Anim, J., Budu, Enu-Kwesi, L.Cofie, Olufunke. (2008). <<Isolation and identification of some plant growth promoting substances in compost and co-compost>>, *International Journal of Virology*, Vol. 4, pages 30-40
12. Kazamias G., Roulia M., Kapsimali I. and Chassapis K. (2016). << Innovative biocatalytic production of substrate from green waste compost as a sustainable peat substitute>>, *Journal of Environmental Management*, Vol. 203, pages 670-678
13. Kelen M., Demiralay E., Sen S., Ozkan G. (2004). <<Separation of Abscisic Acid, Indole-3-Acetic Acid, Gibberellic Acid in 99 R and Rose oil by Reversed Phase Liquid Chromatography>>. *Tubitak*, Vol. 28, pages 603-610
14. Klimas E., Szymanska A. (2016).<<Presence of plant hormones in compost made from organic fraction of municipal solid waste>>,*Journal of Elementology*, Vol. 21, pages 1043-1053
15. Shengje H., Jiang Z., Mingyu D. and Guohua L. (2008).<<Simultaneous determination of gibberellic acid, Indole-3-Acetic acid and abscisic acid in wheat extracts by solid phase extraction and liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry>>,*Talanta*, Vol. 76, pages 798-802

Ιστοσελίδες

I) Pubchem Indole-3-acetic acid

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Indole-3-acetic-acid>

II) Gibberellic acid an overview

<https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/gibberellic-acid>

III) University of Hertfordshire Gibberellic acid 3

https://sitem.herts.ac.uk/aeru/bpdb/Reports/371.htm?fbclid=IwAR2oCyDiUPQTcAkeuBHncbU_E7yZrS4vo4ug_f5WdyenEwPAIQpqKgzR_wc

IV) Pubchem Gibberellic acid 3

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Gibberellic-acid>

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ :Πίνακας με τις αναλυτικές μεθόδους από τα άρθρα των (παρατίθενται κατά σειρά εμφάνισης στον πίνακα) Gurta et al (3), Klimas et al (14), Kellen et al (13) και Shengje et al (15)

Δείγμα	Πρότυπα (C,διατήρηση)	Προετοιμασία δείγματος	Εκχύλιση στερεάς φάσης	Συνθήκες χρωματογραφίας	Όρια ανίχνευσης	Αποτελέσματα
compost	-	1) 50 g δείγματος εκχυλίζονται σε 200 mL. 2) Ανάμειξη με υπερήχους για 3 ώρες. 3) εξάτμιση της μεθανόλης με χρήση rotary evaporator. 4) Ζύγιση 0,1 g από το στερεό υπόλειμα και διάλυση σε 10 mL μεθανόλης 5) πέρασμα από νάυλον φίλτρο με διάμετρο πόρου 45 μm.		Luna C-18 - όγκος εισόδου 20 mL- ροή κινητής φάσης 1 ml/min- Μήκη κύματος 208, 254 και 280 nm.		αναφέρεται στο άθροισμα της ποσότητας των φυτοορμονών GA3, IAA και PAA, ανάλογα με την ωρίμανση του compost κυμαίνεται από 5,105-23,20 ppm
φύκια : U. fasciata, U. lactuca, U. taeniata , U. linza	1 mg/mL σε διάλυμα μεθανόλης	1) 200 mg δείγματος λειοτριβονται παρουσία υγρού αζώτου ώστε να γίνουν σκόνη. 2) Προστίθεται 2 mL μείγματος μεθανόλης,νερού και μεθανικό οξύσε αναλογία 15:4:1 ανακατεύεται και αφήνεται σε ηρεμία για όλο το βράδυ στους -20 οC. 3)Φυγοκέντριση σε 5000 rpm και συλλέγεται το υπερκείμενο.	Ακολουθείτε η διαδικασία DILME για καθαρισμό και συμπύκνωση	στήλη Luna-C18 αντίστροφης φάσης (5.0 mm, 4.6 * 150 mm, Phenomenex, USA) -ογκός εισόδου 50 μL - κινητη φάση μεθανολή με υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 0,6 % (60:40 % κατ' όγκον) με ροή 1 mL/min και θερμοκρασία 35 οC. Η απορρόφηση UV μετρήθηκε στα μήκη κύματος 208,254 και 265 nm	Κατώτατο όριο IAA :1 μg /mL Κατώτατο όριο : GA3 1 mg / mL	
σταφύλια Vitis berlandieri x Vitis rupestris και εκχύλισμα τραντάφυλλου Rosa damascena Mill.	1 mg/mL με διαλύτη το διάλυμα της κινητής φάσης	1) 10 g δείγματος διαλύονται σε μεθανόλη 70%-νερό 30% και αναμυγνείονται όλη τη νύχτα στους 4 οC. 2) Το μείγμα περνά από φίλτρο Whatman και η μεθανόλη εξατμίζεται υπο κενό 3) Το pH της υδατικής φάσης ρυθμίζεται στο 8.5 με ποσότητας διαλύματος φωσφορικού άλατος 0.1 M, και γίνεται 3 φορές εκχύλιση με αιθανικό οξύ όπου οι φυτοορμόνες παραμένουν στην υδατική φασή. 4) Προσαρμόζεται το pH της υδατικής φάσης στο 2.5 με την προσθήκη HCl. 5) Γίνεται 3 φορές εκχύλιση με διαιθυλεστέρα και η οργανική φάση,που περιέχει της φυτοορμόνες, συλλέγεται και περνά απο στηλή ανύδρου θειικού νατρίου. 6) Γίνεται απομάκρυνση του διαιθυλεστέρα υπο κενό και το στερεό υπόλειμα διαλύεται σε 2 mL μεθανόλης.		στήλη Luna-C18 θερμοκρασία 25 οC - όγκος εισόδου 10 mL- κινητή φάση ακετονιτριλιο-νερό χρήση δύο αναλογίων (26:74, 30:70) με ροή 0,8 mL/min . Μήκη κύματος μετρήθηκαν διαφορετικό για κάθε ουσία στα 208, 280 για το GA3 και IAA αντίστοιχα.	Κατώτατο όριο IAA :0,01 ppm Κατώτατο όριο : GA3 0,01 ppm	rosa damascena GA3 : 15,54 ppm IAA : 2,57ppm Vitis berlandieri x Vitis rupestris GA3 : 9,42ppm IAA : 2,96ppm
φύλλα σιτού	1 g/L 20% μεθανόλη 0.1 % μεθανικό οξύ - 4 οC	1) μηχανικά μέχρι να γίνει σκόνη παρουσία υγρού αζώτου 2) 2 g δείγματος- 20 ml μεθανόλης 80% 3) προσθήκη 100 μg βενζοϊκού οξέος 4) φυγοκέντριση 3000 rpm, 15 min 4 οC 5) εξάτμιση διαλύτη 25 οC και συμπλήρωση νερού έως συνολικό όγκο 20 ml	1) έκλυση της στήλης OASIS HLB με 1 ml μεθανόλης 20 %- 0.1 % μεθανικό οξύ 2) 20 ml δείγματος εισέρχονται στη στήλη 3) Έκλυση των φυτοορμονών με 1 ml μεθανόλης 80 %	στήλη HiQ sil C18 (250 mm * 4.6 mm i. d. *5 μm) - κινητή φάση διάλυμα μεθανόλη 50 %, 0.2 % μεθανικό οξύ με ροή 1ml / min	IAA 5-200 ppm GA3 0.005-10 ppm	IAA 2.2 ppm GA3 0.005 ppm