



ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΖΙΖΑΝΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΑΥΞΗΜΕΝΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΧΡΩΜΙΟΥ ΚΑΙ ΚΑΔΜΙΟΥ ΣΤΟ
ΕΛΑΦΟΣ: ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΚΑΙ ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ ΣΤΗ ΡΙΓΑΝΗ

ΖΑΧΑΡΙΑΔΑΚΗΣ ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Βόλος, 2024

ΑΥΞΗΜΕΝΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΧΡΩΜΙΟΥ ΚΑΙ ΚΑΔΜΙΟΥ ΣΤΟ ΕΔΑΦΟΣ :
ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΚΑΙ ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ ΣΤΗ ΡΙΓΑΝΗ

INCREASED CHROMIUM AND CADMIUM CONCENTRATION IN SOIL
EFFECTS AND ACCUMULATION IN OREGANO

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή :

Λεβίζου Ευθυμία (Επιβλέπουσα): Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας Φυτών, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Αντωνιάδης Βασίλειος (Μέλος): Καθηγητής Εφαρμοσμένης Εδαφολογίας, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Γιαννούλης Κυριάκος (Μέλος): Επίκουρος Καθηγητής Αρωματικών και Φαρμακευτικών Φυτών, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

«Βεβαιώνω ότι είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής εργασίας, η οποία εκπονήθηκε σύμφωνα με τον Κανονισμό Εκπόνησης Πτυχιακής Εργασίας του ΤΓΦΠΑΠ»

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Εισαγωγή.....	6
1.1 Βαρέα μέταλλα στο έδαφος	6
1.1.1 Κάδμιο στο έδαφος.....	9
1.1.2 Χρώμιο στο έδαφος	10
1.2 Επίδραση του ρυπασμένου εδάφους με ΒΜ στην ανάπτυξη των φυτών	10
1.2.1 Η επίδραση της τοξικότητας του καδμίου στην ανάπτυξη του φυτού	13
1.2.2 Επίδραση της τοξικότητας του χρωμίου στην ανάπτυξη του φυτού	13
1.3 Φυτοαποκατάσταση	14
1.4 Σκοπός της εργασίας.....	15
Κεφάλαιο 2 Πειραματικό μέρος	16
2.1 Πειραματική διαδικασία.....	16
2.1.1 Προετοιμασία εδάφους.....	16
2.1.2 Πειραματικός σχεδιασμός	16
2.2 Μετρήσεις και εξαγωγή δεικτών	17
2.2.1 Μέτρηση βιομάζας φυτού	17
2.2.2 Μέτρηση συγκέντρωσης ολικών φαινολικών	17
2.3 Στατιστική ανάλυση	20
Κεφάλαιο 3 Αποτελέσματα-Συζήτηση	21
3.1 Βιομάζα	21
3.2 Συγκέντρωση αζώτου στα φύλλα του φυτού ρίγανης	22
3.3 Συντελεστής αποδοτικότητας χρήσης αζώτου NUE	23
3.4 Προσδιορισμός Ολικών Φαινολικών Συστατικών	24
3.5 Συγκέντρωση Cr(VI) στο υπέργειο και υπόγειο τμήμα των φυτών ρίγανης	25
3.6 Συντελεστής μετατόπισης TF Cr(VI) από τη ρίζα στο υπέργειο μέρος του φυτού	27
3.7 Συντελεστής μεταφοράς TC Cr(VI) μεταξύ εδάφους και ρίζας.....	28
3.8 Συντελεστής μεταφοράς TC Cr(VI) μεταξύ υπέργειου τμήματος και εδάφους	29
3.9 Συζήτηση	31
Συμπεράσματα.....	35
Βιβλιογραφία	37

Περίληψη

Η ρίγανη θεωρείται ένα ανθεκτικό στις καταπονήσεις φυτό του Μεσογειακού οικοσυστήματος. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν οι αποκρίσεις της στην ταυτόχρονη παρουσία Cd και Cr(VI) στο έδαφος, με την προσθήκη ή όχι επιπλέον αζώτου. Η ρύπανση του εδάφους με βαρέα μέταλλα (BM) έγινε σε δύο επίπεδα, τα 30ppm Cd/50ppm Cr που αποτελούν τα ανώτερα επιτρεπόμενα όρια σε αγροτικό έδαφος και την τριπλάσια αυτής συγκέντρωση 90ppm Cd/150ppm Cr, με μάρτυρα φυτά που αναπτύσσονται σε έδαφος που δεν έχει υποστεί ρύπανση με BM. Μελετήθηκε η αναπτυξιακή απόκριση του φυτού, η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών των φύλλων, ως ένδειξη της ενεργοποίησης του αντιοξειδωτικού δυναμικού τους στην ενδεχόμενη καταπόνηση, τα πρότυπα συσσώρευσης Cr(VI) στα διάφορα φυτικά μέρη και οι σχετικοί συντελεστές που περιγράφουν την μεταφορά του BM από το έδαφος στο φυτό. Το πείραμα διεξήχθη σε γλάστρες σε εξωτερικό χώρο. Η υψηλότερη συγκέντρωση BM που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα, 90ppm Cd/150ppm Cr, οδήγησε στον πρόωρο θάνατο των φυτών, τον οποίο δεν απέτρεψε η προσθήκη N. Τα φυτά των μεταχειρίσεων με 30ppm Cd/50ppm Cr επιβίωσαν μέχρι το τέλος του πειράματος, με σημαντικές όμως μειώσεις της βιομάζας τους σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Και εδώ η προσθήκη N δεν βελτίωσε την ανάπτυξη των φυτών. Η συγκέντρωση N στα φύλλα ήταν υψηλότερη στις μεταχειρίσεις BM σε σύγκριση με τον μάρτυρα, ανεξαρτήτως όμως προσθήκης N. Η συσσώρευση Cr(VI) τόσο στο υπέργειο τμήμα, όσο και στη ρίζα ήταν σημαντικά μεγαλύτερη στα υψηλότερα επίπεδα BM σε σύγκριση με τα 30ppm Cd/50ppm Cr. Η προσθήκη N επέδρασε διαφορετικά στη συσσώρευση Cr(VI) στα χαμηλά και υψηλά επίπεδα BM στο υπέργειο τμήμα. Στα χαμηλά επίπεδα αύξησε την [Cr(VI)] και στα υψηλά την μείωσε. Αντίθετα, στο υπόγειο τμήμα προσθήκη N στα χαμηλά επίπεδα BM μείωσε την [Cr(VI)] και στα υψηλά δεν την επηρέασε. Η προσθήκη N ευνόησε την μετατόπισή του Cr(VI) από την ρίζα στο υπέργειο (TF) μόνο στα χαμηλά επίπεδα BM, ενώ στα υψηλότερα δεν την επηρέασε. Οι συντελεστές μεταφοράς (TC) του Cr(VI) από το έδαφος στη ρίζα και από το έδαφος στο υπέργειο εμφάνισαν σημαντικά μεγαλύτερες τιμές στα χαμηλά επίπεδα BM σε σχέση με τα υψηλότερα. Συμπερασματικά, η ρίγανη φάνηκε μη ανθεκτική στο συνδυασμό και τις συγκεκριμένες συγκεντρώσεις BM του παρόντος πειράματος και η προσθήκη N δεν βελτίωσε την ανθεκτικότητα και ανάπτυξή της.

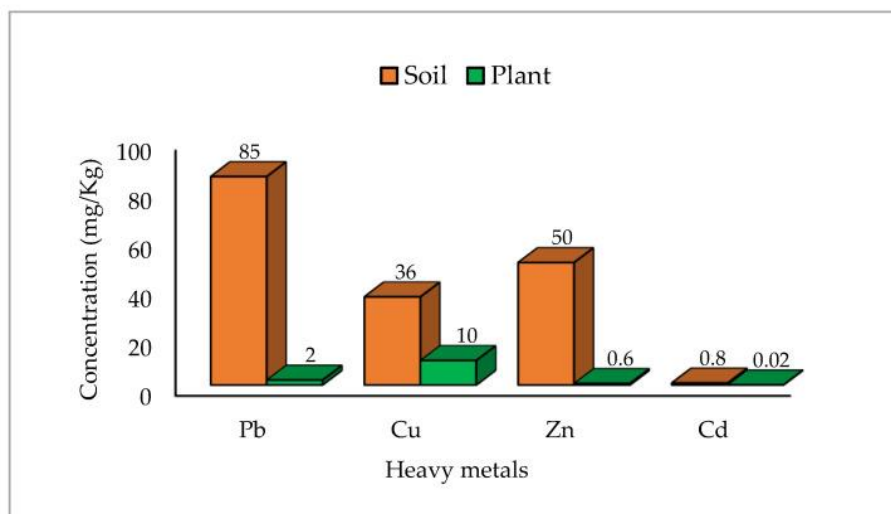
1. Εισαγωγή

1.1 Βαρέα μέταλλα στο έδαφος

Λόγω της μεγάλης οικονομικής ανάπτυξης και της ταχείας ανάπτυξης σε πολλούς τομείς, όπως η γεωργία και η βιομηχανία, το περιβάλλον γίνεται όλο και πιο ρυπασμένο. Οι περιβαλλοντικοί ρύποι είναι τοξικές ουσίες που προέρχονται τόσο από ανθρωπογενείς όσο και από φυσικές πηγές. Οι ρύποι μπορεί να περιλαμβάνουν βαρέα μέταλλα (BM) και φυτοφάρμακα και απειλούν ολόκληρο το οικοσύστημα, προκαλώντας σοβαρά προβλήματα στη λειτουργία και στη δομή του (An, 2004).

Τα BM είναι στοιχεία με υψηλό ατομικό βάρος και πυκνότητα μεγαλύτερη από 5 g/cm^3 και παρουσιάζουν μεταλλικές ιδιότητες όπως ολκιμότητα, ελατότητα, αγωγιμότητα, και σταθερότητα κατιόντων (Tchounwou et al., 2012). Ορισμένα BM όπως Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, V και Zn απαιτούνται σε μικρές ποσότητες από τους οργανισμούς. Ωστόσο, οι υπερβολικές ποσότητες αυτών των στοιχείων μπορεί να γίνουν επιβλαβείς για τους οργανισμούς. Άλλα BM όπως το Pb, το Cd, το Hg και το As (μεταλλοειδές αλλά γενικά αναφέρεται ως βαρύ μέταλλο) δεν έχουν καμία ευεργετική επίδραση στους οργανισμούς και επομένως θεωρούνται ως οι «κυριότερες απειλές», καθώς είναι πολύ επιβλαβή για φυτά και ζώα.

Το υψηλό επίπεδο συγκεντρώσεων BM επηρεάζει τόσο το έδαφος όσο και το φυτό. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας έχει θέσει τα επιτρεπτά όρια των συγκεντρώσεών τους ($\text{mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$) στο έδαφος και στα φυτά όπως αποτυπώνεται στην Εικόνα 1 (World Health Organization, 1996). Στο έδαφος, τα επιτρεπτά όρια του Pb είναι τα υψηλότερα, ακολουθούν ο Zn και ο Cu, ενώ τα επιτρεπτά όρια του Cd είναι τα χαμηλότερα. Αυτές οι οριακές τιμές σημαίνουν ότι η συσσώρευση Cd στο έδαφος, ακόμη και σε χαμηλότερη συγκέντρωση, είναι πιο τοξική από τους Cu, Zn και Pb. Ενώ στα φυτά, το όριο του Cu είναι το υψηλότερο, ακολουθούμενο από Pb, Zn και Cd. Αντίθετα από το έδαφος, το Cu έχει τα ασφαλέστερα όρια, ακολουθούμενο από Pb και Zn, ενώ η συσσώρευση Cd στα φυτά είναι η πιο σοβαρή.



Εικόνα 1 Επιτρεπόμενα όρια για τις συγκεντρώσεις BM στο έδαφος και στα φυτά (World Health Organization, 1996)

Οι ιδιότητες του εδάφους επηρεάζουν τη διαθεσιμότητα των BM με διάφορους τρόπους, με το pH του εδάφους είναι ο κύριος παράγοντας. Η διαθεσιμότητα Cd και Zn στις ρίζες του *Thlaspi caerulescens* μειώθηκε με την αύξηση του pH του εδάφους (Wang et al., 2006). Η οργανική ύλη και το ένυδρο οξείδιο του σιδήρου έχει αποδειχθεί ότι μειώνουν τη διαθεσιμότητα BM μέσω της ακινητοποίησης αυτών των μετάλλων (Pastor, 2003). Σημαντικές θετικές συσχετίσεις έχουν επίσης καταγραφεί μεταξύ των BM και ορισμένων φυσικών ιδιοτήτων του εδάφους, όπως η περιεκτικότητα σε υγρασία και η ικανότητα συγκράτησης νερού (Zhang et al., 2021).

Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν τη διαθεσιμότητα μετάλλων στο έδαφος περιλαμβάνουν την πυκνότητα και τον τύπο του φορτίου στα κολλοειδή του εδάφους, τον βαθμό συμπλοκοποίησης και τη σχετική επιφάνεια του εδάφους (Adebiyi & Ayeni, 2022). Η μεγάλη διεπαφή και οι συγκεκριμένες επιφάνειες που παρέχονται από τα κολλοειδή του εδάφους βοηθούν στον έλεγχο της συγκέντρωσης BM στα φυσικά εδάφη. Επιπλέον, ο αερισμός του εδάφους, η μικροβιακή δραστηριότητα και η σύνθεση ορυκτών έχουν επίσης αποδειχθεί ότι επηρεάζουν τη διαθεσιμότητα BM στα εδάφη (Liu et al., 2016). Μια ολοκληρωμένη μελέτη έγινε από τους Sutkowska et al. (2020), ο οποίος αξιολόγησε την περιεκτικότητα σε BM και την κατακόρυφη

κατανομή τους στη βιομηχανική περιοχή της Άνω Σιλεσίας, στη Νότια Πολωνία. Χρησιμοποίησαν διαφορετικούς ανεπτυγμένους δείκτες ρύπανσης για να καθορίσουν την περιεκτικότητα σε BM σε διάφορα στρώματα εδάφους. Τα αποτελέσματά τους ανέφεραν ότι η συγκέντρωση BM ήταν με την ακόλουθη σειρά από την υψηλότερη προς τη χαμηλότερη: $Pb > Cd > Zn$ στα ρηχά στρώματα. Ενώ στα βαθιά στρώματα, ήταν $Zn > Cd > Pb$. Η συγκέντρωση όλων των μετάλλων ξεπέρασε τα επίπεδα γεωχημικού υποβάθρου, υποδηλώνοντας την υψηλή τοξικότητα της περιοχής που μελετήθηκε.

Τα BM μπορούν να τροποποιήσουν τις ιδιότητες του εδάφους, ιδιαίτερα τις βιολογικές ιδιότητες του. Επηρεάζουν τον αριθμό, την ποικιλότητα και τις δραστηριότητες των μικροοργανισμών του εδάφους. Η τοξικότητα αυτών των μετάλλων στους μικροοργανισμούς εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως η θερμοκρασία του εδάφους, το pH, τα ορυκτά αργίλου, η οργανική ύλη, τα ανόργανα ανιόντα και κατιόντα και οι χημικές μορφές του μετάλλου (Zhang et al., 2021). Υπάρχουν συχνά αποκλίσεις στις μελέτες που αξιολογούν την επίδραση των BM στις βιολογικές ιδιότητες του εδάφους. Ενώ ορισμένοι ερευνητές έχουν καταγράψει αρνητική επίδραση, άλλοι δεν έχουν αναφέρει καμία σχέση μεταξύ των υψηλών συγκεντρώσεων BM και ορισμένων (μικρο)βιολογικών ιδιοτήτων του εδάφους (Jarosławiecka & Piotrowska-Seget, 2022). Ορισμένες από τις ασυνέπειες μπορεί να προκύψουν επειδή ορισμένες από αυτές τις μελέτες διεξήχθησαν σε εργαστηριακές συνθήκες χρησιμοποιώντας τεχνητά ρυπασμένα εδάφη, ενώ άλλες πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας εδάφη από περιοχές που είναι πραγματικά ρυπασμένες στο χωράφι. Ανεξάρτητα από την προέλευση των εδαφών που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτά τα πειράματα, το γεγονός ότι η επίδραση των BM στις βιολογικές ιδιότητες του εδάφους πρέπει να μελετηθεί λεπτομερέστερα προκειμένου να κατανοηθεί πλήρως η επίδραση αυτών των μετάλλων στο εδαφικό οικοσύστημα παραμένει. Επιπλέον, είναι σκόπιμο να χρησιμοποιείται ένα ευρύ φάσμα μεθόδων (όπως μικροβιακή βιομάζα, ανοργανοποίηση C και N, αναπνοή και ενζυμικές δραστηριότητες) κατά τη μελέτη της επίδρασης των μετάλλων στις βιολογικές ιδιότητες του εδάφους αντί να εστιάσουμε σε μία μόνο μέθοδο, καθώς τα αποτελέσματα προέρχονται από τη χρήση διαφορετικών μεθόδων θα ήταν πιο ολοκληρωμένες και πειστικές (Hofman et al., 2004). Η παρακολούθηση αλλαγών στις μικροβιακές και βιοχημικές ιδιότητες του εδάφους μετά τη ρύπανση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση της έντασης της ρύπανσης του εδάφους, επειδή αυτές οι μέθοδοι είναι πιο ευαίσθητες και τα αποτελέσματα μπορούν να ληφθούν με

ταχύτερο ρυθμό σε σύγκριση με την παρακολούθηση των φυσικών και χημικών ιδιοτήτων του εδάφους (Lefrancq et al., 2013).

Η χαμηλή διαθεσιμότητα μακροθρεπτικών συστατικών και η οξύτητα του εδάφους είναι από τα κύρια προβλήματα που σχετίζονται με τη συσσώρευτική τοξικότητα των ΒΜ (Egeric et al., 2019). Επίσης, η παρουσία ενός βαρέος μετάλλου μπορεί να επηρεάσει τη διαθεσιμότητα ενός άλλου στο έδαφος και ως εκ τούτου στο φυτό. Με άλλα λόγια, υπάρχουν ανταγωνιστικές και συνεργιστικές συμπεριφορές μεταξύ των ΒΜ. Οι Kim et al. (2017) ανέφεραν ότι η ανασταλτική επίδραση του Mn στη συνολική ποσότητα ανοργανοποιημένου C ανταγωνιζόταν την παρουσία του Cd. Ομοίως, ο Cu και ο Zn καθώς και το Ni και το Cd έχουν αναφερθεί ότι ανταγωνίζονται για τους ίδιους φορείς μεμβράνης στα φυτά (Singh et al., 2016). Αντίθετα, ο Cu αναφέρθηκε ότι αυξάνει την τοξικότητα του Zn στο ανοιξιάτικο κριθάρι (Mandzhieva et al., 2022). Αυτό σημαίνει ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ των ΒΜ είναι αρκετά περίπλοκη, άρα χρειάζεται περισσότερη έρευνα σε αυτόν τον τομέα.

1.1.1 Κάδμιο στο έδαφος

Η συσσώρευση Cd στο έδαφος είναι ένα πρόβλημα που αφορά πολλές περιοχές του πλανήτη. Το pH του εδάφους και η περιεκτικότητα σε οργανική ύλη είναι οι κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν τη συσσώρευση Cd. Με τη μείωση του pH του εδάφους, η βιοδιαθεσιμότητα του Cd αυξήθηκε, υποδηλώνοντας ελάττωμα στις ιδιότητες του εδάφους. Το 2015 μελετήθηκε η συσσώρευση ΒΜ σε τρεις γεωργικές περιοχές της επαρχίας Χουνάν, Κίνα (YI & XIANG, 2016). Η μελέτη διερεύνησε την περιεκτικότητα σε ΒΜ σε κάθε περιοχή. Τα αποτελέσματα ανέφεραν ότι το Cd και το Hg κατέγραψαν τις υψηλότερες μέσες τιμές μεταξύ τριών ελεγχόμενων περιοχών (1,40 και 14,9 mg·Kg⁻¹ αντίστοιχα), οι οποίες υπερέβαιναν τα κινεζικά πρότυπα περιβαλλοντικής ποιότητας για το έδαφος. Σε μία άλλη μελέτη που έγινε για την επίδραση διαφόρων επιπέδων Cd στις ιδιότητες του εδάφους ορυζώνα χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά μοντέλα κινητικής και σιγμοειδούς δόσης-απόκρισης (M. Xu et al., 2022). Τα αποτελέσματά τους ανέφεραν ότι το Cd προκάλεσε ανασταλτικές επιδράσεις στη μικροβιακή δραστηριότητα του εδάφους. Άλλη μελέτη μελέτησε επίσης τις συνδυαστικές συνέπειες του Cd και της αλατότητας στους μικροοργανισμούς του εδάφους και στην ενζυμική δραστηριότητα. Τα ευρήματά τους ανέφεραν τη συνεργική αρνητική επίδραση του Cd και της αλατότητας στις ιδιότητες του εδάφους (Azadi & Raiesi, 2021).

Επιπλέον, η συνδυασμένη τους δράση προκάλεσε μείωση της μικροβιακής αναπνοής και της μικροβιακής βιομάζας στο έδαφος. Οι An (2004) επιβεβαίωσαν ότι το Cd είναι πολύ ευκίνητο στο έδαφος και κατά συνέπεια οδήγησε σε υψηλή τοξικότητα που επηρέασε τους βασικούς μικροοργανισμούς, ανέστειλε τη μικροβιακή δραστηριότητα και τροποποίησε κάποια φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του εδάφους.

1.1.2 Χρώμιο στο έδαφος

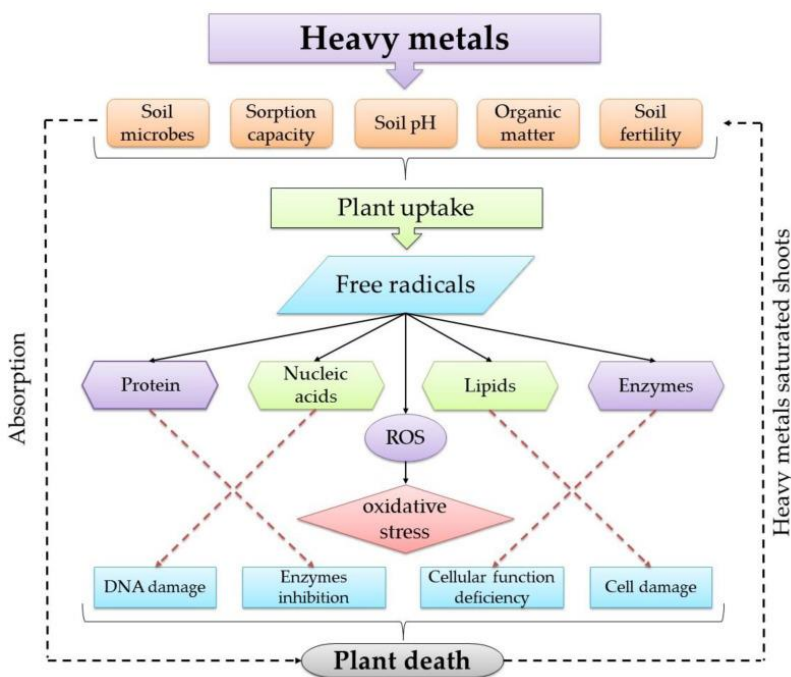
Η μέση συγκέντρωση Cr στο έδαφος είναι περίπου 40 mg kg^{-1} (Rys et al., 2022). Το φυσικό Cr υπάρχει στα περισσότερα εδάφη ως σχετικά αδρανής μορφή Cr(III). Τα οξείδια του μαγγανίου (Mn) που υπάρχουν στα εδάφη θα οξειδώσουν το Cr(III) σε Cr(VI), αλλά μια μικρή αναλογία του Cr(III) στα εδάφη βρίσκεται συνήθως σε οξειδώσιμες μορφές. Μέσα στο έδαφος το Cr είναι συνδεδεμένο με οργανικά υλικά σε οξείδια και υδροξείδια Fe και Mn (Balamurugan et al., 2014). Η διαταραχή της κατάστασης ισορροπίας μεταξύ των ειδών επηρεάζεται σημαντικά από διάφορα χημικά γεγονότα που μπορεί να προκαλέσουν τη μετατροπή του Cr στα εδάφη, συμπεριλαμβανομένης της υδρόλυσης, της οξείδωσης, της καθίζησης και της αναγωγής. Το pH του εδάφους, η ικανότητα ανταλλαγής κατιόντων (CEC) και τα ανταγωνιστικά κατιόντα έχουν σημαντικό αντίκτυπο σε αυτές τις πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις. Η μείωση του pH του εδάφους προκαλεί την κινητοποίηση και την απελευθέρωση του Cr(III), ενώ η αύξηση του pH του εδάφους ευνοεί τον σχηματισμό του Cr(VI) στο έδαφος (H. Xu et al., 2013). Τα γεωργικά εδάφη με υψηλά επίπεδα ρύπανσης με Cr επηρεάζουν δυσμενώς την απόδοση της καλλιέργειας.

1.2 Επίδραση του ρυπασμένου εδάφους με BM στην ανάπτυξη των φυτών

Τα BM που είναι διαθέσιμα για πρόσληψη από τα φυτά είναι αυτά που υπάρχουν ως διαλυτά συστατικά στο εδαφικό διάλυμα ή αυτά που διαλυτοποιούνται εύκολα από τα εκκρίματα της ρίζας. Αν και τα φυτά απαιτούν ορισμένα BM για την ανάπτυξη και τη διατήρησή τους, υπερβολικές ποσότητες αυτών των μετάλλων μπορεί να γίνουν τοξικές για τα φυτά. Η ικανότητα των φυτών να συσσωρεύουν απαραίτητα μέταλλα τους επιτρέπει εξίσου να απορροφούν και άλλα, μη απαραίτητα μέταλλα (Sutkowska et al., 2020). Καθώς τα μέταλλα δεν μπορούν να

διασπαστούν, όταν οι συγκεντρώσεις εντός του φυτού υπερβαίνουν τα βέλτιστα επίπεδα, επηρεάζουν αρνητικά το φυτό τόσο άμεσα όσο και έμμεσα.

Ορισμένες από τις άμεσες τοξικές επιδράσεις που προκαλούνται από την υψηλή συγκέντρωση μετάλλων περιλαμβάνουν την αναστολή των κυτταροπλασματικών ενζύμων και τη βλάβη στις κυτταρικές δομές λόγω της οξειδωτικής καταπόνησης. Η οδός και ο μηχανισμός δράσης των ΒΜ, ξεκινώντας από τη συσσώρευση στο έδαφος περνώντας από την πρόσληψη του φυτού φτάνοντας σε διαφορετικά μέρη του φυτού, φαίνονται στο Σχήμα 6. Η επίδραση των ΒΜ στα φυτά ξεκινά από τη ριζόσφαιρα, όπου τα μέταλλα αλληλοεπιδρούν με τα εκκρίματα των ριζών (Cabala & Teper (2007). Επιπλέον, η αρνητική επίδραση που έχουν τα ΒΜ στην ανάπτυξη και τις δραστηριότητες των μικροοργανισμών του εδάφους μπορεί επίσης να επηρεάσει έμμεσα την ανάπτυξη των φυτών. Για παράδειγμα, μια μείωση του αριθμού των ωφέλιμων μικροοργανισμών του εδάφους λόγω της υψηλής συγκέντρωσης μετάλλων μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της αποσύνθεσης της οργανικής ύλης που οδηγεί σε μείωση των θρεπτικών στοιχείων του εδάφους. Οι ενζυμικές δραστηριότητες που είναι χρήσιμες για το μεταβολισμό των φυτών μπορεί επίσης να παρεμποδιστούν λόγω της παρεμβολής των ΒΜ στις δραστηριότητες των μικροοργανισμών του εδάφους. Αυτές οι τοξικές επιδράσεις (τόσο άμεσες όσο και έμμεσες) οδηγούν σε μείωση της ανάπτυξης των φυτών που μερικές φορές οδηγεί στο θάνατο του φυτού (He et al., 2005).



Εικόνα 2 Οδός και ο μηχανισμός δράσης των BM (Ahmed Alegenbawy et al 2021)

Τα BM προκαλούν την παραγωγή ελεύθερων ριζών (ROS), προκαλώντας οξειδωτική καταπόνηση που προκαλεί βλάβη στα βιολογικά μόρια (π.χ. πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα, λιπίδια και ένζυμα). Η αυξημένη παρουσία ROS οδηγεί σε αποδιάταξη του DNA, καταστροφή μεμβρανών και αναστολή της ενζυμικής δραστηριότητας και μπορεί τελικά να οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο (Wu et al., 2016).

Η επίδραση της τοξικότητας των BM στην ανάπτυξη των φυτών ποικίλλει ανάλογα με το συγκεκριμένο στοιχείο που εμπλέκεται και το είδος του φυτού. Για μέταλλα όπως Pb, Cd, Hg και As που δεν παίζουν κανένα ευεργετικό ρόλο στην ανάπτυξη των φυτών, έχουν καταγραφεί δυσμενείς επιπτώσεις σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις στο μέσο ανάπτυξης. Ο Tang et al. (2018) κατέγραψε σημαντική μείωση στο ύψος των φυτών ρυζιού που αναπτύσσονται σε έδαφος ρυπασμένο με 1 mgHg/kg. Για το Cd, μείωση της ανάπτυξης των βλαστών και των ριζών στα φυτά σιταριού σημειώθηκε όταν το Cd στο εδαφικό διάλυμα ήταν χαμηλό, στα 5 mg/L. Η μείωση των παραμέτρων ανάπτυξης των φυτών που αναπτύσσονται σε ρυπασμένα εδάφη μπορεί να αποδοθεί σε μειωμένες φωτοσυνθετικές δραστηριότητες, συγκεντρώσεις ιχνοστοιχείων και δραστηριότητα ορισμένων ενζύμων (Ahmad et al., 2012).

Αξίζει να σημειωθεί ότι, στις περισσότερες πραγματικές καταστάσεις όπου το έδαφος μπορεί να ρυπανθεί με περισσότερα από ένα BM, τόσο οι ανταγωνιστικές όσο και οι συνεργιστικές σχέσεις μεταξύ των BM μπορεί να επηρεάσουν την τοξικότητα μετάλλων στα φυτά. Οι Chibuike & Obiora (2014) ανέφεραν ότι ο συνδυασμός Pb και Cu τόσο σε υψηλή συγκέντρωση (1000 mg/kg το καθένα) όσο και σε χαμηλή συγκέντρωση (500 mg/kg) είχε ως αποτέλεσμα τον σύντομο θάνατο του *Lythrum salicaria*. Οι συγγραφείς ανέφεραν ότι δεν υπήρχε συνεργιστική αλληλεπίδραση μεταξύ αυτών των BM πιθανώς επειδή οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα ήταν πολύ υψηλές για να παρατηρηθεί αλληλεπιδραστική σχέση μεταξύ των μετάλλων. Μια άλλη μελέτη εξέτασε την επίδραση 6 BM (Cd, Cr, Co, Mn και Pb) στην ανάπτυξη του αραβοσίτου (Sofy et al., 2020). Η παρουσία αυτών των μετάλλων στο έδαφος μείωσε την ανάπτυξη και την περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη του αραβοσίτου. Η τοξικότητα αυτών των μετάλλων εμφανίστηκε με την ακόλουθη σειρά: Cd > Co > Hg > Mn > Pb > Cr. Παρατηρήθηκε επίσης σε αυτή τη μελέτη ότι η συνδυασμένη επίδραση 2 ή περισσότερων BM ήταν τόσο επιβλαβής όσο η επίδραση του πιο

τοξικού βαρέος μετάλλου, κάτι που αποδίδθηκε στην ανταγωνιστική σχέση που υπάρχει μεταξύ των ΒΜ.

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι ορισμένα φυτά είναι ανθεκτικά σε υψηλή συγκέντρωση ΒΜ στο περιβάλλον τους. Ο Baker (1981) ανέφερε ότι η ανθεκτικότητα στηρίζεται είτε στον αποκλεισμό, δηλαδή τον περιορισμό της απορρόφησης μετάλλων και διατήρηση σταθερής συγκέντρωσης μετάλλου στο βλαστό σε ένα ευρύ φάσμα συγκεντρώσεων στο έδαφος, ή στην δυνατότητα βιοσυσσώρευσης, δηλαδή την πλήρη φυτική λειτουργία ακόμη και με συσσώρευση μετάλλων στο βλαστό και στις ρίζες των φυτών. Σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις ενεργοποιούνται συγκεκριμένοι βιοχημικοί μηχανισμοί ανθεκτικότητας και προστασίας των ευαίσθητων φυτικών ιστών.

1.2.1 Η επίδραση της τοξικότητας του καδμίου στην ανάπτυξη του φυτού

Το Cd θεωρείται ως ένα μη απαραίτητο και επικίνδυνο βαρύ μέταλλο, καθώς βρίσκεται στο περιβάλλον μέσω ορισμένων ανθρωπογενών πηγών (Jibril et al., 2017). Το Cd εισέρχεται στα φυτικά κύτταρα μέσω μεταφορέων όπως τα κανάλια ασβεστίου (Ca) και συσσωρεύεται σε ρίζες, βλαστούς και εδώδιμα μέρη. Μια υψηλή συγκέντρωση Cd στα φυτά προκαλεί πολλές φυσιολογικές και βιοχημικές αλλαγές, προκαλώντας προβλήματα σε βασικές φυτικές λειτουργίες όπως η φωτοσύνθεση και πρόσληψη θρεπτικών από το έδαφος. Επιπλέον, μπορεί να αναστείλει τη μεταφορά του Fe στους βλαστούς των φυτών. Το Cd έχει αρνητική επίδραση σε αναπτυξιακά χαρακτηριστικά όπως μείωση της βιομάζας των φυτών και του μήκους των ριζών και των βλαστών, όπως ανέφεραν οι Gratao et al. (2009), αλλά και βιοχημικά χαρακτηριστικά, όπως π.χ. μείωση της περιεκτικότητας σε χλωροφύλλη. Πρόσφατα, μια μελέτη που έγινε από τους Vardhan et al. (2019) διερεύνησε την επίδραση των ιόντων Cd στους σπόρους *Lactuca sativa*, όπου φάνηκε ότι το Cd (II) ανέστειλε τη βλάστηση των σπόρων, μείωσε τη βιομάζα και εμπόδισε την ανάπτυξη των ριζών. Επιπλέον, το Cd (II) είχε αρνητικό αντίκτυπο στη μικροβιακή ανάπτυξη.

1.2.2 Επίδραση της τοξικότητας του χρωμίου στην ανάπτυξη του φυτού

Το Cr μπορεί να ενισχύσει την ανάπτυξη των φυτών σε χαμηλές συγκεντρώσεις και να εμποδίσει την ανάπτυξη των φυτών σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, σύμφωνα με ορισμένες έρευνες, παρόλο που δεν υπάρχει συγκεκριμένη απόδειξη που να τεκμηριώνει τη θετική του συμμετοχή στο μεταβολισμό των φυτών (Ao et al., 2022). Στα φυτά, η υψηλότερη συγκέντρωση

Cr επηρεάζει σημαντικά διάφορες βιοχημικές και μορφολογικές παραμέτρους, προκαλώντας π.χ., μείωση της βλάστησης των σπόρων, της φυτικής βιομάζας, της φωτοσυνθετικής ταχύτητας και γενικά καθυστερημένη ανάπτυξη του φυτού. Οι υπερβολικές ποσότητες Cr μπορεί να προκαλέσουν και θάνατο των φυτών. Η αλληλεπίδραση των βασικών θρεπτικών συστατικών και του Cr μπορεί να διαταράξει το πρότυπο πρόσληψης διαφόρων βασικών θρεπτικών συστατικών ασβεστίου (Ca^{2+}) και μαγνησίου (Mg^{2+}) στο φυτό. Να σημειωθεί εδώ ότι τα φυτά είναι ευαίσθητα στην τοξικότητα του Cr καθ' όλη τη διάρκεια του κύκλου ανάπτυξης τους.

Το Cr(III) είναι λιγότερο τοξικό για τα φυτά, λόγω της τάσης αυτής της μορφής να δεσμεύεται στα κυτταρικά τοιχώματα, παρεμποδίζοντας με αυτόν τον τρόπο τη μεταφορά του Cr εντός των ευαίσθητων φυτικών ιστών (Prado et al., 2013). Τα φαινολικά συστατικά των φύλλων δρουν προστατευτικά στη φυσιολογική απόδοση και την ανάπτυξη του φυτού. Έτσι, η αύξηση των φαινολικών είναι ένας από τους μηχανισμούς που ενεργοποιούνται από το φυτό για την εξουδετέρωση της τοξικότητας του Cr. Σε πειράματα φάνηκε ότι η υψηλή συγκέντρωση Cr επηρέασε σοβαρά την περιεκτικότητα σε φαινολικές ουσίες των φυτών. Η βιοσυσσώρευση του Cr(VI) σε επίπεδα Cr του εδάφους πάνω από 100 mg kg^{-1} κατέστειλε το αντιοξειδωτικό δυναμικό των φυτών και αυτό το εξασθενημένο αμυντικό σύστημα συσχετίστηκε άμεσα με μειωμένη ανάπτυξη. Η μείωση των ολικών φαινολικών συστατικών λόγω της τοξικότητας από το Cr έχει αναφερθεί για το *Salvinia minima* και έχει αποδοθεί σε φαινολικό πολυμερισμό παρά σε μειωμένη σύνθεση. Μια εναλλακτική εξήγηση δόθηκε από τους Islam et al. (2016) αποδίδοντας τη μείωση της περιεκτικότητας σε φαινολικά συστατικά στη δυσλειτουργία βασικών ενζύμων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση αυτών των ενώσεων.

1.3 Φυτοαποκατάσταση

Η συσσώρευση BM είναι ένα εντεινόμενο πρόβλημα τόσο σε φυσικά οικοσυστήματα, όσο και σε αγρο-οικοσυστήματα. Οι ρίζες των φυτών είναι το πρώτο σημείο επαφής για τα ιόντα BM που απορροφούνται από το έδαφος. Τείνουν να σταθεροποιούν και να δεσμεύουν τους ρύπους στο έδαφος, μειώνοντας επομένως τη βιοδιαθεσιμότητά τους. Αυτή τους η ιδιότητα χρησιμοποιείται στις μεθόδους φυτοαποκατάστασης ή φυτοεξυγίανσης που έχουν αναπτυχθεί και περιλαμβάνουν τις παρακάτω κύριες κατηγορίες (Antoniadis et al. 2017):

- (i) φυτοεξαγωγή: τα φυτά απορροφούν και ανεβάζουν στο υπέργειο μέρος τα ΒΜ και επομένως απομακρύνουν τα επικίνδυνα συστατικά από ρυπασμένο έδαφος,
- (ii) φυτοσταθεροποίηση: στηρίζεται στην ικανότητα κάποιων να ακινητοποιούν ή να μειώνουν την κινητικότητα των ΒΜ στο έδαφος μέσω φυσικοχημικών και βιολογικών διεργασιών που συμβαίνουν στις ρίζες.

Υπάρχουν και άλλες μέθοδοι αποκατάστασης των ρυπασμένων με ΒΜ εδαφών που χρησιμοποιούν φυσικές και χημικές μεθόδους (Michael-Igolima et al., 2022). Οι περισσότερες φυσικές και χημικές μέθοδοι (όπως η ενθυλάκωση, η στερεοποίηση, η σταθεροποίηση, η ηλεκτροκινητική, η υαλοποίηση, η εξαγωγή ατμών και το πλύσιμο και έκπλυση του εδάφους) είναι ακριβές και δεν καθιστούν το έδαφος κατάλληλο για την ανάπτυξη των φυτών (Hao et al., 2011). Η βιολογική προσέγγιση (βιοαποκατάσταση ή φυτοποκατάσταση) από την άλλη είναι μια φιλική προς το περιβάλλον προσέγγιση γιατί επιτυγχάνεται με φυσικές διαδικασίες. Η φυτοαποκατάσταση είναι επίσης μια οικονομική τεχνική αποκατάστασης σε σύγκριση με άλλες τεχνικές αποκατάστασης.

1.4 Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης που έχει η αυξημένη συγκέντρωση χρωμίου και καδμίου στο έδαφος στην συσσώρευση βιομάζας, την συγκέντρωση των φαινολικών ουσιών και τα χαρακτηριστικά της συσσώρευσης των βαρέων μετάλλων στα φυτά ρίγανης. Εξετάστηκε επίσης εάν η προσθήκη αζώτου βελτιώνει τις μετρηθείσες παραμέτρους των φυτών, αμβλύνοντας τις επιπτώσεις και τη συσσώρευση των ΒΜ.

Κεφάλαιο 2 Πειραματικό μέρος

2.1 Πειραματική διαδικασία

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε την άνοιξη-καλοκαίρι του 2018 σε υπαίθριο χώρο του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και αγροτικού περιβάλλοντος στη Ν. Ιωνία Βόλου.

2.1.1 Προετοιμασία εδάφους

Πραγματοποιήθηκε συλλογή 700 kg εδάφους από τη περιοχή του Ερευνητικού Αγροκτήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο Βελεστίνο Μαγνησίας. Το έδαφος παρέμεινε σε θερμοκήπιο για 5 ημέρες προκειμένου να αεροξηρανθεί και ακολούθησε το κοσκίνισμα με χρήση ειδικού κόσκινου διαμέτρου 1 cm. Συλλέχθηκαν 350 Kg από το κοσκινισμένο έδαφος και ακολούθησε η προσθήκη και ανάμιξη με περλίτη σε αναλογία όγκου 1:1. Ακολούθησε η τοποθέτησή του στις ήδη αριθμημένες και προετοιμασμένες γλάστρες του 1 Kg (300 σε αριθμό) όπου είχε τοποθετηθεί στον πάτο διηθητικό χαρτί.

2.1.2 Πειραματικός σχεδιασμός

Χρησιμοποιήθηκαν δύο επίπεδα Cd και Cr, με ταυτόχρονη εφαρμογή δύο επιπέδων αζώτου. Έτσι προέκυψαν οι μεταχειρίσεις που παρουσιάζονται στη συνέχεια:

Μάρτυρας χωρίς άζωτο: μάρτυρας όπου και δεν έγινε καμία προσθήκη αζώτου και BM,

Μάρτυρας με άζωτο: μάρτυρας όπου και δεν έγινε καμία προσθήκη BM, αλλά έγινε προσθήκη αζώτου (90 λιπαντικές μονάδες)

30ppm Cd/50ppm Cr χωρίς άζωτο: καμία προσθήκη αζώτου και ρύπανση του εδάφους με 30 ppm Cd και 50 ppm Cr—τα ανώτερα επιτρεπτά όρια για εδάφη αγρού,

30ppm Cd/50ppm Cr με άζωτο: προσθήκη αζώτου (90 λιπαντικές μονάδες) και ρύπανση του εδάφους με 30 ppm Cd και 50 ppm Cr

90ppm Cd/150ppm Cr χωρίς άζωτο: καμία προσθήκη αζώτου και ρύπανση του εδάφους με 90 ppm Cd και 150 ppm Cr,

90ppm Cd/150ppm Cr με άζωτο: προσθήκη αζώτου (90 λιπαντικές μονάδες) και ρύπανση του εδάφους με 90 ppm Cd και 150 ppm Cr , δηλαδή τα τριπλάσια από τα επιτρεπτά όρια.

Η προσθήκη Cd και Cr στο παραπάνω έδαφος έγινε με νιτρικό κάδμιο (5.5g/l) και διχρωμικό κάλιο ($K_2Cr_2O_7$, 9.18g/l) σε αραιώσεις ώστε να επιτευχθούν οι επιθυμητές συγκεντρώσεις τους στη γλάστρα. Η εφαρμογή έγινε φορώντας ειδικό εξοπλισμό (γάντια, μάσκα, ποδιά εργαστηρίου). Συνολικά χρειάστηκαν 4L $K_2Cr_2O_7$ και 2,3L Cd για την ολοκλήρωση των παρεμβάσεων. Αξίζει να σημειωθεί ότι η προσθήκη του διαλύματος Cd στις γλάστρες προκάλεσε αφρισμό στο μείγμα εδάφους.

Κάθε μεταχείριση εφαρμόστηκε σε 50 γλάστρες του 1l. Τα φυτά ρίγανης (*Origanum vulgare subs. Hirtum*) αγοράστηκαν από τοπικό φυτώριο και ήταν ηλικίας 4 εβδομάδων και μέσου ύψους περίπου 7 cm. Μετά την ετοιμασία των γλαστρών έγινε η επιλογή των καλύτερων φυτών ρίγανης από άποψη μεγέθους και φυλλώματος και μεταφυτευθήκαν στις γλάστρες με τυχαιοποιημένο τρόπο ως προς την κατανομή τους στις διάφορες μεταχειρίσεις.

2.2 Μετρήσεις και εξαγωγή δεικτών

2.2.1 Μέτρηση βιομάζας φυτού

Μετά από δύο μήνες πειράματος πραγματοποιήθηκε η τελική συγκομιδή των φυτών. Αρχικά το υπέργειο μέρος απομακρύνθηκε με κοπή σύριζα στο έδαφος. Οι ρίζες καθαρίστηκαν από το έδαφος και πλύθηκαν. Τα υπόγεια και υπέργεια τμήματα των φυτών που συλλέχθηκαν τοποθετήθηκαν σε χάρτινα σακουλάκια και μεταφέρθηκαν σε φούρνο στους 80 °C, όπου και παρέμειναν 3 ημέρες. Στη συνέχεια καταγράφηκε η ξηρή βιομάζα του φυτού.

2.2.2 Μέτρηση συγκέντρωσης ολικών φαινολικών

Πραγματοποιήθηκε μέτρηση των φαινολικών στα φύλλα της ρίγανης με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu (Waterman & Mole, 1994). Χρειάστηκε διάλυμα μεθανόλης 50% (6 ml / δείγμα), αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (0.25 ml / δείγμα) και διάλυμα το οποίο περιέχει 20g Na_2CO_3 σε 100 ml νερού (0,75 ml / δείγμα). Για την εκχύλιση χρησιμοποιήθηκαν 50 g κονιορτοποιημένου ξηρού δείγματος, που τοποθετήθηκε σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες, όπου προστέθηκαν 6 ml μεθανόλης 50% και τα δείγματα επώαστηκαν σε υδατόλουτρο για μία ώρα στους 40 C° υπό ήπια ανάδευση. Στη συνέχεια περάστηκαν από χάρτινο φίλτρο με τη βοήθεια χωνιού και το εξερχόμενο διαυγές διάλυμα τοποθετήθηκε σε νέους δοκιμαστικούς σωλήνες. Για την αντίδραση

σε δοκιμαστικούς σωλήνες προστέθηκαν 3,95 ml απιονισμένου νερού, 0,05 ml από το εκχύλισμα και 0,25 ml αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu. Μετά από Vortex και σε χρόνο περίπου 8 λεπτών προστέθηκε 0,75 ml Na_2CO_3 . Ακολούθησαν και άλλες αναδεύσεις κατά την διάρκεια των δύο ωρών που τα δείγματα παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος μετρήθηκε η απορρόφηση με τη χρήση φασματοφωτόμετρου στα 760 nm. Να σημειωθεί πως δημιουργήθηκε και ένα τυφλό διάλυμα, όπου προστέθηκε 0.05 ml μεθανόλης 50% ως αντικατάσταση του φυτικού εκχυλίσματος.

2.2.3 Μέτρηση εξασθενούς χρωμίου

Για τη μέτρηση του χρωμίου, τα κονιοποιημένα μέρη του φυτού, υπέργειο και υπόγειο (3 επαναλήψεις από το καθένα) μεταφέρθηκαν σε ξεχωριστές κάψες και τοποθετήθηκαν για 1 ώρα στους 420 C°. Αφού τελείωσε η διαδικασία παραλήφθηκε η τέφρα με HCl 20% και έγινε αραίωση των διαλυμάτων με απιονισμένο νερό, 5 και 10 φορές. Στη συνέχεια 8ml εκχυλίσματος και 1 ml της χρωστικής διφαινυλοκαρμπαζίδιο αναμείχθηκαν καλά και αφέθηκαν για την ανάπτυξη χρώματος (για 1 ώρα). Μετά πραγματοποιήθηκε η μέτρηση σε φωτόμετρο για το χρώμο σε μήκος κύματος $\lambda = 540\text{nm}$. Η συγκέντρωση του χρωμίου υπολογίστηκε με βάση την παρακάτω εξίσωση:

$$\text{Cr(VI)} (\text{mg kg}^{-1} \text{ φυτικού ιστού}) = A * N * V / B$$

Όπου, A είναι η συγκέντρωση του χρωμίου (σε mg L^{-1}) που προκύπτει από την μετατροπή της απορρόφησης στα 540nm σε συγκέντρωση βάσει της καμπύλης βαθμονόμησης, το N είναι η αραίωση του διαλύματος, το V ο όγκος του διαλύματος εκχύλισης (mL) και το B είναι το βάρος (g) του κονιορτοποιημένου φυτικού ιστού που εκχυλίστηκε.

2.2.4 Μέτρηση αζώτου στα φύλλα

Το ολικό N στα φύλλα μετρήθηκε με τη μέθοδο Kjeldahl (3 επαναλήψεις/μεταχείριση). Το πρώτο βήμα ήταν η πέψη του ξηρού δείγματος φύλλων με πυκνό H_2SO_4 (20 mL), με την προσθήκη δύο ταμπλετών σεληνίου Kjeltab και μίας ταμπλέτας antifoam σε ειδικούς σωλήνες των 500 mL. Το δεύτερο βήμα ήταν η απόσταξη του παραπάνω διαλύματος με NaOH και 4% βορικό οξύ (H_3BO_3) σε κωνικές των 250 mL. Κατά το τρίτο βήμα που είναι η ογκομέτρηση, στο περιεχόμενο της κωνικής φιάλης προστέθηκαν 5 σταγόνες μικτού δείκτη bromocresol green και methyl red (σε

αναλογία 1:1). Το απόσταγμα με την προσθήκη του δείκτη έγινε πράσινο. Ακολούθησε η ογκομέτρηση με 0,1103 N H₂SO₄, στο τέλος της οποίας το διάλυμα έγινε ροζ. Αντίστοιχη διαδικασία ακολουθήθηκε για ένα δείγμα-μάρτυρα που δεν περιλάμβανε απόσταγμα φυτικού ιστού.

Η συγκέντρωση N στον φυτικό ιστό προκύπτει από τον παρακάτω τύπο:

$$N\% = [1.401 * N_A * (V_A - V_B)] / B$$

όπου V_A = ο όγκος του H₂SO₄ που καταναλώθηκε κατά την ογκομέτρηση του φυτικού δείγματος,

V_B = ο όγκος του H₂SO₄ που καταναλώθηκε κατά την ογκομέτρηση του δείγματος-μάρτυρα,

N_A = η κανονικότητα του διαλύματος ογκομέτρησης (εδώ 0,1103)

B = το βάρος (g) του δείγματος που προστέθηκε στους σωλήνες πέψης.

2.2.5 Εξαγωγή δεικτών

Με βάση τα αποτελέσματα των αναλύσεων του φυτικού ιστού σε Cr και N, προέκυψαν οι παρακάτω λειτουργικοί δείκτες/συντελεστές:

1) Συντελεστής αποδοτικότητας χρήσης αζώτου, Nitrogen Use Efficiency (NUE) που υπολογίστηκε σύμφωνα με τον τύπο:

NUE= συγκέντρωση αζώτου στο φυτό/συγκέντρωση αζώτου που χορηγήθηκε στο έδαφος

2) Συντελεστής μετατόπισης ρίζα-υπέργειο, Translocation factor (TF) που περιγράφει το ποσό του Cr(VI) που μετατοπίστηκε από τη ρίζα στο υπέργειο μέρος του φυτού. Ο τύπος που χρησιμοποιήθηκε ήταν:

$$TF = [Cr(VI)]_{υπέργειο} / [Cr(VI)]_{ρίζα}$$

3) Συντελεστής μεταφοράς μεταξύ εδάφους και ρίζας, Transfer coefficient (TC). Υπολογίζεται ως ο λόγος της συγκέντρωσης Cr(VI) στη ρίζα προς τη συγκέντρωση Cr(VI) στο έδαφος. Ο τύπος που χρησιμοποιήθηκε ήταν:

$$TC = [Cr(VI)]_{ρίζα} / [Cr(VI)]_{έδαφος}$$

9) Συντελεστής μεταφοράς μεταξύ εδάφους και υπέργειου μέρους φυτού, Transfer coefficient (TC). Υπολογίζεται ως ο λόγος της συγκέντρωσης Cr(VI) στο υπέργειο προς τη συγκέντρωση Cr(VI) στο έδαφος. Ο τύπος που χρησιμοποιήθηκε ήταν:

$$TC = [\text{Cr(VI)}]_{\text{υπέργειο}} / [\text{Cr(VI)}]_{\text{έδαφος}}$$

2.3 Στατιστική ανάλυση

Ο έλεγχος της σημαντικότητας των διαφορών μεταξύ των μεταχειρίσεων των παραμέτρων που μετρήθηκαν πραγματοποιήθηκε με two-way ANOVA, ακολουθούμενη από το post-hoc test Tukey's, με τη βοήθεια του στατιστικού πακέτου JASP v. 0.18.1.0. Οι παράγοντες που ελέγχθηκαν ήταν η παρουσία βαρέων μετάλλων (Cd και Cr) και η παρουσία N καθώς και ο συνδυασμός/αλληλεπίδραση αυτών. Οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές καταγράφηκαν σε επίπεδο σημαντικότητας $p \leq 0.05$. Στις περιπτώσεις των δεικτών, όπου δεν υπάρχει κανονικότητα άρα δεν ισχύουν οι προϋποθέσεις της ANOVA, έγινε το μη παραμετρικό Kruskal-Wallis test και το post-hoc Dunn's test.

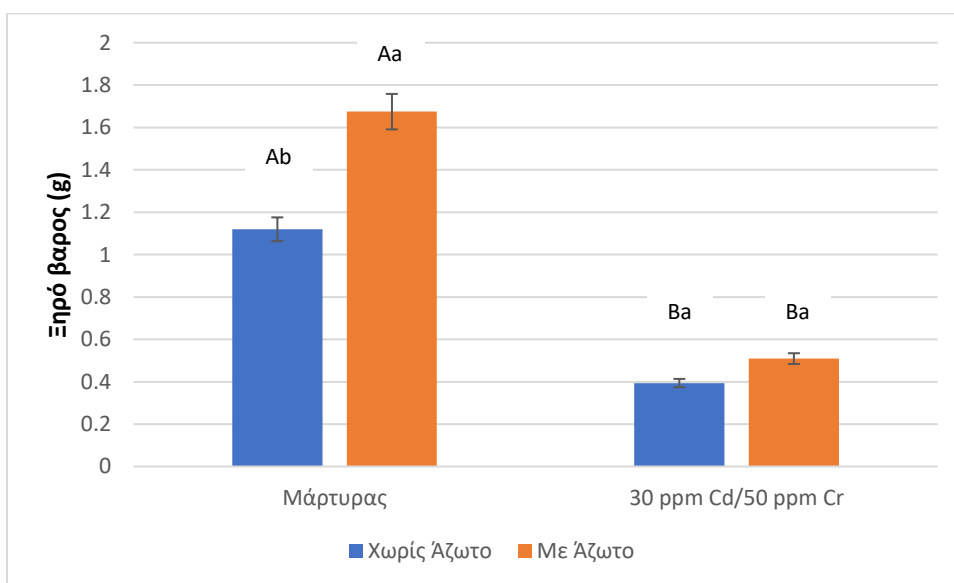
Κεφάλαιο 3 Αποτελέσματα-Συζήτηση

Ακολουθούν τα αποτελέσματα του πειράματος. Να σημειωθεί εδώ ότι τα φυτά των μεταχειρίσεων 90 ppm Cd/150 ppm Cr, με και χωρίς άζωτο ξεράθηκαν πριν το τέλος του πειράματος, επομένως δεν υπάρχει καταγραφή της βιομάζας τους και του δείκτη NUE που στηρίζεται σε αυτή. Για όλες τις υπόλοιπες παραμέτρους χρησιμοποιήθηκαν τα ξηρά δείγματα των φυτών προκειμένου να υπάρχει καταγραφή των συγκεντρώσεων Cr(VI) σε υπέργειο και υπόγειο μέρος και να είναι δυνατή η εξαγωγή των σχετικών δεικτών.

3.1 Βιομάζα

Οι τιμές της βιομάζας των δειγμάτων των υπέργειων τμημάτων των φυτών ρίγανης που καλλιεργήθηκαν στις διάφορες μεταχειρίσεις κυμάνθηκαν μεταξύ 0,102-1,72 g (Γράφημα 1). Το ξηρό βάρος ήταν μεγαλύτερο στους Μάρτυρες, με στατιστικώς σημαντικές διαφορές τόσο με την απουσία, όσο και με την προσθήκη αζώτου. Καταγράφηκε ως στατιστικά σημαντική η παρουσία BM και N και η αλληλεπίδρασή τους.

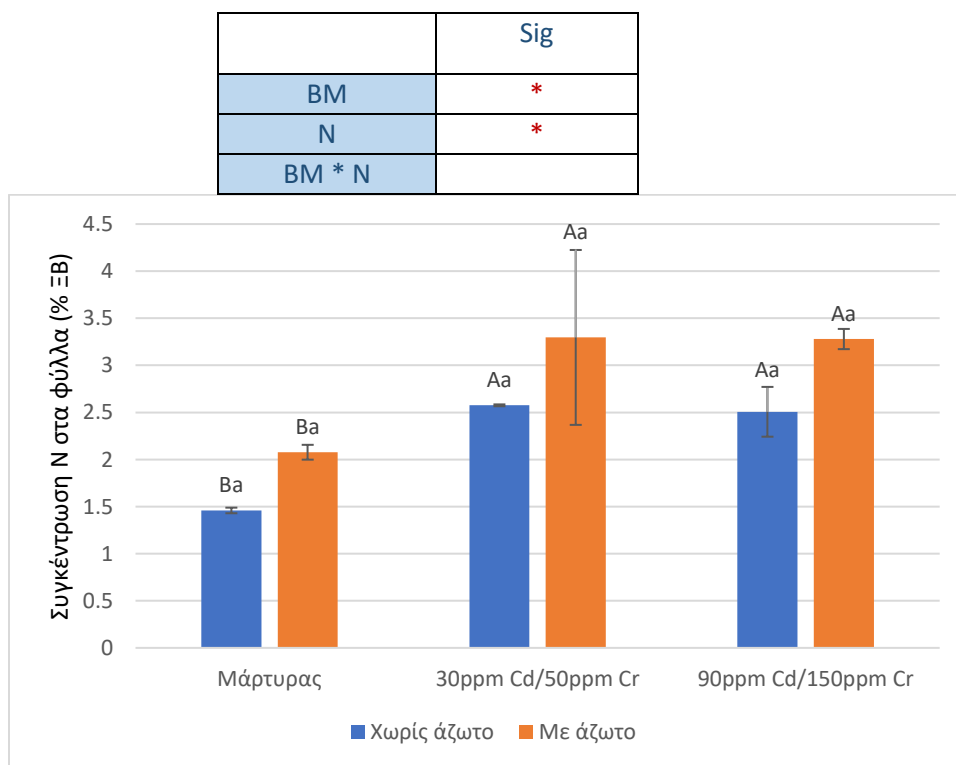
	Sig
BM	*
N	*
BM * N	*



Γράφημα 1. Ξηρό βάρος του υπέργειου τμήματος των φυτών ρίγανης που καλλιεργήθηκαν σε διαφορετικά εδάφη ρυπασμένα με BM. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές που οφείλονται σε κάθε ένα πειραματικό παράγοντα αλλά και στην αλληλεπίδραση τους φαίνονται στο υπερκείμενο πινακάκι και αναφέρονται σε επίπεδο $p \leq 0,05$. Τα γράμματα στο Γράφημα υποδεικνύουν τις στατιστικώς σημαντικές διαφορές ως εξής: τα κεφαλαία αφορούν τις διαφορές μεταξύ μεταχειρίσεων BM στο ίδιο επίπεδο N, ενώ τα μικρά τις διαφορές μεταξύ των δύο επιπέδων N στην ίδια μεταχείριση.

3.2 Συγκέντρωση αζώτου στα φύλλα του φυτού ρίγανης

Οι τιμές της συγκέντρωσης αζώτου στα φύλλα των δειγμάτων των υπέργειων τμημάτων των φυτών ρίγανης που καλλιεργήθηκαν σε διαφορετικά εδάφη ρυπασμένα με BM κυμάνθηκαν μεταξύ 1,44-4,33 % (Γράφημα 2). Πιο συγκεκριμένα τα φυτά που καλλιεργήθηκαν σε έδαφος με προσθήκη αζώτου και ρύπανση με 30 ppm Cd /50 ppm Cr και 90 ppm Cd /150 ppm Cr, εμφάνισαν την μεγαλύτερη συγκέντρωση αζώτου με στατιστικά σημαντική διαφορά από τον αντίστοιχο μάρτυρα. Αντίθετα, η παρουσία αζώτου στις παραπάνω μεταχειρίσεις BM δεν προκάλεσε διαφορές. Οι μάρτυρες είχαν τα χαμηλότερα επίπεδα αζώτου από τις άλλες μεταχειρίσεις και δεν διέφεραν μεταξύ τους.

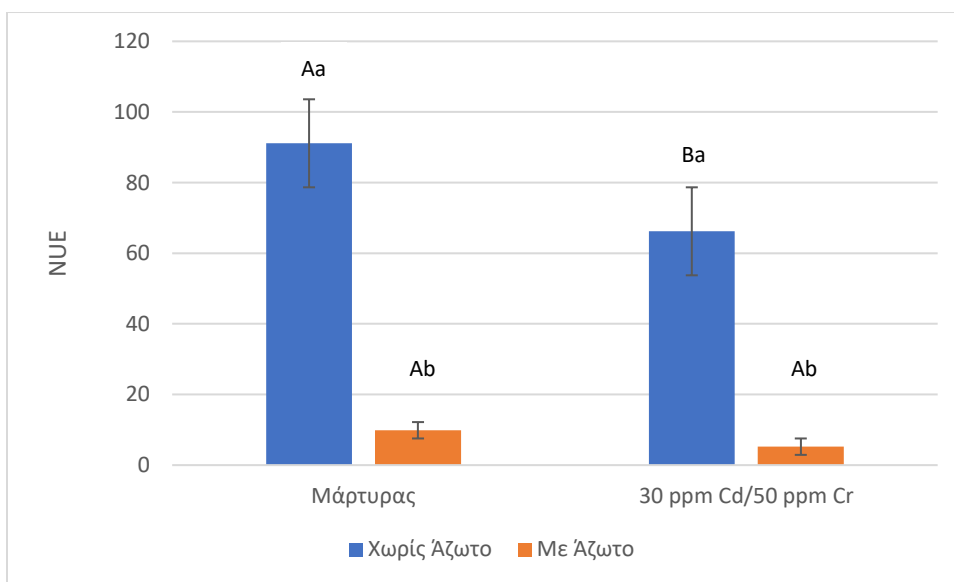


Γράφημα 2. Συγκέντρωση αζώτου στα φύλλα των φυτών ρίγανης, ως ποσοστό επί τοις εκατό του ξηρού τους βάρους. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές που οφείλονται σε κάθε ένα πειραματικό παράγοντα αλλά και στην αλληλεπίδραση τους φαίνονται στο υπερκείμενο πινακάκι και αναφέρονται σε επίπεδο $p \leq 0,05$. Τα γράμματα στο Γράφημα υποδεικνύουν τις στατιστικώς σημαντικές διαφορές ως εξής: τα κεφαλαία αφορούν τις διαφορές μεταξύ μεταχειρίσεων BM στο ίδιο επίπεδο N, ενώ τα μικρά τις διαφορές μεταξύ των δύο επιπέδων N στην ίδια μεταχείριση.

3.3 Συντελεστής αποδοτικότητας χρήσης αζώτου NUE

Οι τιμές του συντελεστή αποδοτικότητας της χρήσης αζώτου, NUE, στα δείγματα των φυτών ρίγανης που καλλιεργήθηκαν σε διαφορετικά εδάφη ρυπασμένα με BM κυμάνθηκαν μεταξύ 2,92-99,2 (Γράφημα 3). Οι μεγαλύτερες τιμές του συντελεστή εμφανίστηκαν στις μεταχειρίσεις που δεν έλαβαν άζωτο, είτε στο μάρτυρα είτε στο 30ppm Cd/50ppm Cr, με στατιστικά σημαντικές διαφορές από τις αντίστοιχες μεταχειρίσεις όπου δεν έγινε προσθήκη αζώτου. Επίσης, όταν δεν υπήρχε προσθήκη αζώτου ο μάρτυρας είχε σημαντικά υψηλότερο NUE από τη μεταχείριση των BM.

	Sig
BM	*
N	*



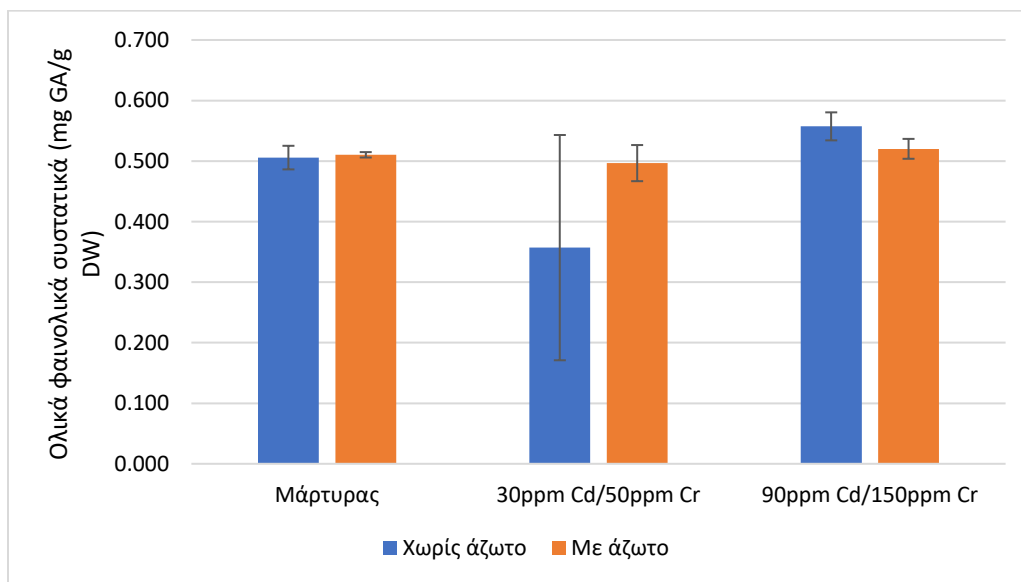
Γράφημα 3. Οι τιμές του συντελεστή αποδοτικότητας χρήσης αζώτου, NUE, στα δείγματα των φυτών ρίγανης. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές που οφείλονται σε κάθε ένα πειραματικό

παράγοντα φαίνονται στο υπερκείμενο πινακάκι και αναφέρονται σε επίπεδο $p \leq 0,05$. Η στατιστική ανάλυση έγινε με μη παραμετρικό τεστ για αυτό δεν υπάρχει ένδειξη για αλληλεπίδραση. Τα γράμματα στο Γράφημα υποδεικνύουν τις στατιστικώς σημαντικές διαφορές ως εξής: τα κεφαλαία αφορούν τις διαφορές μεταξύ μεταχειρίσεων BM στο ίδιο επίπεδο N, ενώ τα μικρά τις διαφορές μεταξύ των δύο επιπέδων N στην ίδια μεταχείριση.

3.4 Προσδιορισμός Ολικών Φαινολικών Συστατικών

Οι τιμές των ολικών φαινολικών συστατικών στα δείγματα των φυτών ρίγανης που καλλιεργήθηκαν σε διαφορετικά εδάφη ρυπασμένα με BM κυμάνθηκαν μεταξύ 0,190-0,580 mg GA/g DW. Στατιστικά φάνηκε ότι οι διαφορετικές επεμβάσεις με ή χωρίς προσθήκη αζώτου ή και ρύπανση με BM δεν επηρέασαν σημαντικά το περιεχόμενο των ολικών φαινολικών συστατικών των φυτών ρίγανης (Γράφημα 4).

	Sig
BM	
N	
BM * N	

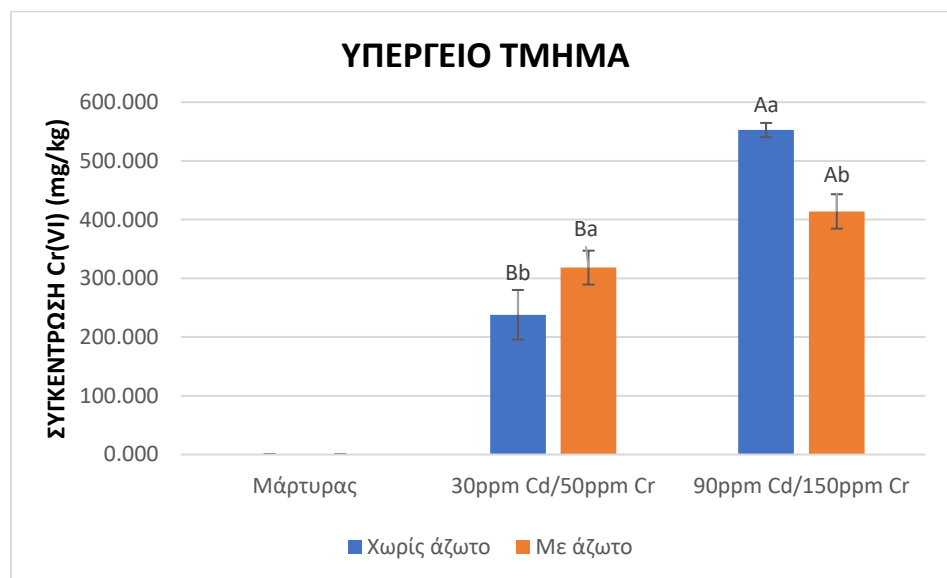


Γράφημα 4. Οι συγκεντρώσεις των ολικών φαινολικών συστατικών στα δείγματα των φυτών ρίγανης. Δεν υπάρχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές, όπως αποτυπώνεται από την απουσία σημάτων στο υπερκείμενο πινακάκι και στο γράφημα ($p \leq 0,05$).

3.5 Συγκέντρωση Cr(VI) στο υπέργειο και υπόγειο τμήμα των φυτών ρίγανης

Οι τιμές της συγκέντρωσης Cr(VI) στο υπέργειο τμήμα των δειγμάτων των φυτών ρίγανης που καλλιεργήθηκαν σε διαφορετικά εδάφη ρυπασμένα με BM κυμάνθηκαν μεταξύ 195,1-565,5 ppm (Γράφημα 5). Πιο συγκεκριμένα τα φυτά που καλλιεργήθηκαν σε έδαφος χωρίς προσθήκη αζώτου και ρύπανση με BM σε τριπλάσια δόση από τα επιτρεπόμενα όρια εμφάνισαν τη μεγαλύτερη τιμή της συγκέντρωσης Cr(VI) στο υπέργειο τμήμα και ακολούθησαν τα φυτά των αντίστοιχων επιπέδων BM με προσθήκη αζώτου. Αντίθετο πρότυπο εμφανίστηκε στα χαμηλότερα επίπεδα BM, με την προσθήκη αζώτου να αυξάνει τη συγκέντρωση Cr(VI) στο υπέργειο τμήμα.

	Sig
BM	*
N	

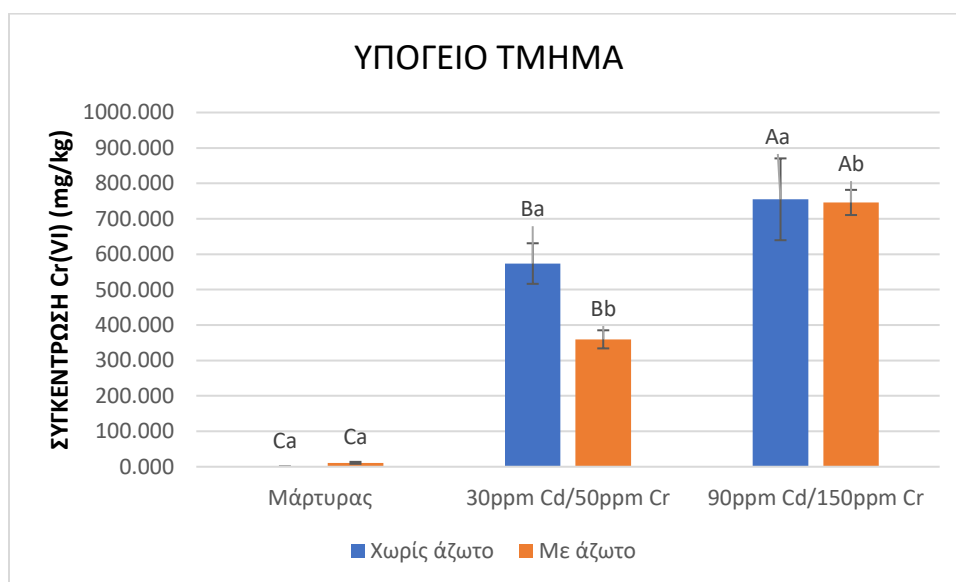


Γράφημα 5. Οι τιμές της συγκέντρωσης Cr(VI) στο υπέργειο τμήμα των δειγμάτων των φυτών ρίγανης που καλλιεργήθηκαν σε διαφορετικά εδάφη ρυπασμένα με BM. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές που οφείλονται σε κάθε ένα πειραματικό παράγοντα φαίνονται στο υπερκείμενο πινακάκι και αναφέρονται σε επίπεδο $p \leq 0,05$. Η στατιστική ανάλυση έγινε με μη παραμετρικό

τεστ για αυτό δεν υπάρχει ένδειξη για αλληλεπίδραση. Τα γράμματα στο Γράφημα υποδεικνύουν τις στατιστικώς σημαντικές διαφορές ως εξής: τα κεφαλαία αφορούν τις διαφορές μεταξύ μεταχειρίσεων BM στο ίδιο επίπεδο N, ενώ τα μικρά τις διαφορές μεταξύ των δύο επιπέδων N στην ίδια μεταχείριση.

Οι τιμές της συγκέντρωσης Cr(VI) στο υπόγειο τμήμα των δειγμάτων των φυτών ρίγανης κυμάνθηκαν μεταξύ 334,5-885,2 ppm (Γράφημα 6). Οι μεταχειρίσεις με τα υψηλότερα επίπεδα BM, ανεξαρτήτως προσθήκης αζώτου είχαν σημαντικά αυξημένες συγκεντρώσεις Cr(VI) στη ρίζα τους σε σχέση με τις μεταχειρίσεις των χαμηλότερων επιπέδων BM. Στις τελευταίες η προσθήκη αζώτου μείωσε σημαντικά τα επίπεδα χρωμίου στη ρίζα.

	Sig
BM	*
N	

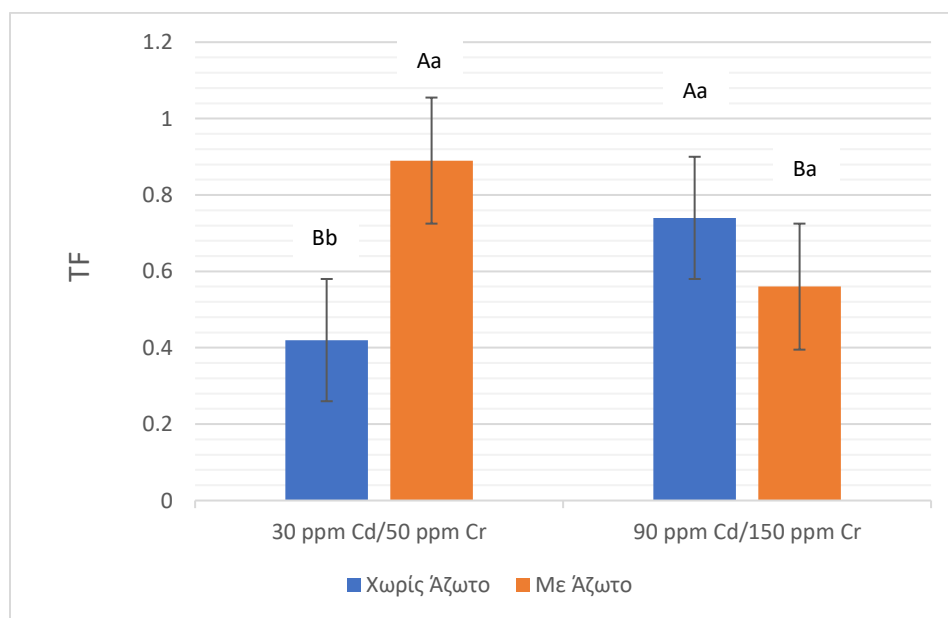


Γράφημα 6. Οι τιμές της συγκέντρωσης Cr(VI) στο υπόγειο τμήμα των δειγμάτων των φυτών ρίγανης που καλλιεργήθηκαν σε διαφορετικά εδάφη επιρυσπασμένα με BM. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές που οφείλονται σε κάθε ένα πειραματικό παράγοντα φαίνονται στο υπερκείμενο πινακάκι και αναφέρονται σε επίπεδο $p \leq 0,05$. Η στατιστική ανάλυση έγινε με μη παραμετρικό τεστ για αυτό δεν υπάρχει ένδειξη για αλληλεπίδραση. Τα γράμματα στο Γράφημα υποδεικνύουν τις στατιστικώς σημαντικές διαφορές ως εξής: τα κεφαλαία αφορούν τις διαφορές μεταξύ μεταχειρίσεων BM στο ίδιο επίπεδο N, ενώ τα μικρά τις διαφορές μεταξύ των δύο επιπέδων N στην ίδια μεταχείριση.

3.6 Συντελεστής μετατόπισης TF Cr(VI) από τη ρίζα στο υπέργειο μέρος του φυτού

Οι τιμές του συντελεστή μετατόπισης TF Cr(VI) από τη ρίζα στο υπέργειο μέρος των φυτών ρίγανης που καλλιεργήθηκαν σε διαφορετικά εδάφη ρυπασμένα με BM κυμάνθηκαν μεταξύ 0,31-0,98 (Γράφημα 7). Η προσθήκη αζώτου είχε διαφορετικό αποτέλεσμα στις δύο μεταχειρίσεις BM. Στην 30ppm Cd/50ppm Cr οδήγησε σε αύξηση το TF, ενώ στην 90ppm Cd/150ppm Cr το μείωσε ελαφρά, χωρίς στατιστική διαφορά. Χωρίς προσθήκη αζώτου η μεταχείριση 30ppm Cd/50ppm Cr είχε στατιστικά σημαντική μείωση του συντελεστή μεταφοράς σε σχέση με την μεταχείριση υψηλότερων επιπέδων BM. Επίσης, καταγράφηκε σημαντική αλληλεπίδραση των παραγόντων BM και N.

	Sig
BM	*
N	*
BM * N	*

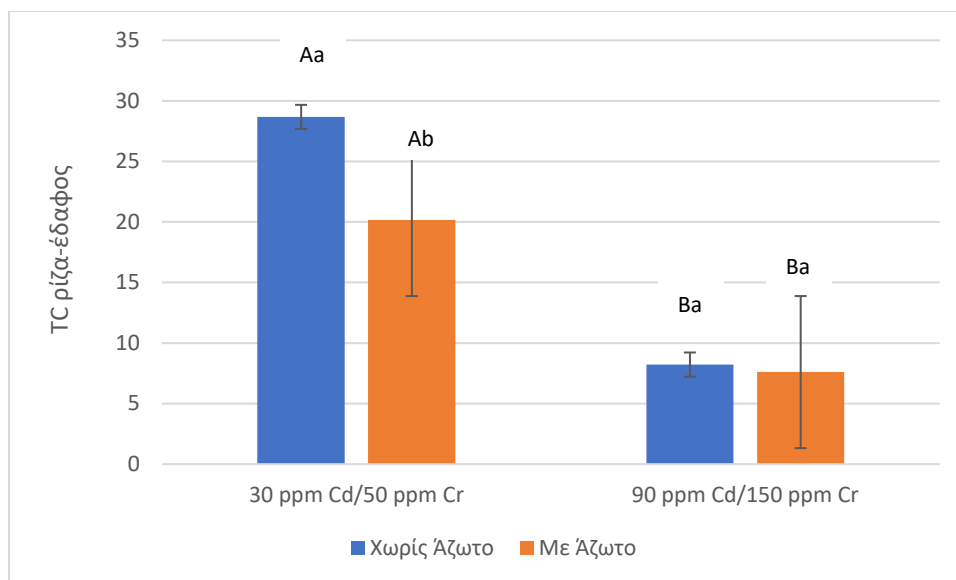


Γράφημα 7. Οι τιμές του συντελεστή μετατόπισης TF Cr(VI) από τη ρίζα στο υπέργειο μέρος των φυτών ρίγανης που καλλιεργήθηκαν σε διαφορετικά εδάφη ρυπασμένα με BM. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές που οφείλονται σε κάθε ένα πειραματικό παράγοντα καθώς και στην αλληλεπίδραση τους φαίνονται στο υπερκείμενο πινακάκι και αναφέρονται σε επίπεδο $p \leq 0,05$. Τα γράμματα στο Γράφημα υποδεικνύουν τις στατιστικώς σημαντικές διαφορές ως εξής: τα κεφαλαία αφορούν τις διαφορές μεταξύ μεταχειρίσεων BM στο ίδιο επίπεδο N, ενώ τα μικρά τις διαφορές μεταξύ των δύο επιπέδων N στην ίδια μεταχείριση.

3.7 Συντελεστής μεταφοράς TC Cr(VI) μεταξύ εδάφους και ρίζας

Οι τιμές του συντελεστή μεταφοράς του Cr(VI) μεταξύ εδάφους και ρίζας των φυτών ρίγανης (TC) που καλλιεργήθηκαν σε διαφορετικά εδάφη ρυπασμένα με BM κυμάνθηκαν μεταξύ 7,25- -31,27 (Γράφημα 8). Οι μεταχειρίσεις με 30ppm Cd/50ppm Cr με προσθήκη ή όχι αζώτου εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές αυξήσεις του TC, σε σύγκριση με τις αντίστοιχες των 90ppm Cd/150ppm Cr. Στις τελευταίες δύο η προσθήκη αζώτου δεν προκάλεσε διαφορές. Ενώ στα χαμηλότερα επίπεδα BM η προσθήκη αζώτου μείωσε σημαντικά τον συντελεστή.

	Sig
BM	*
N	



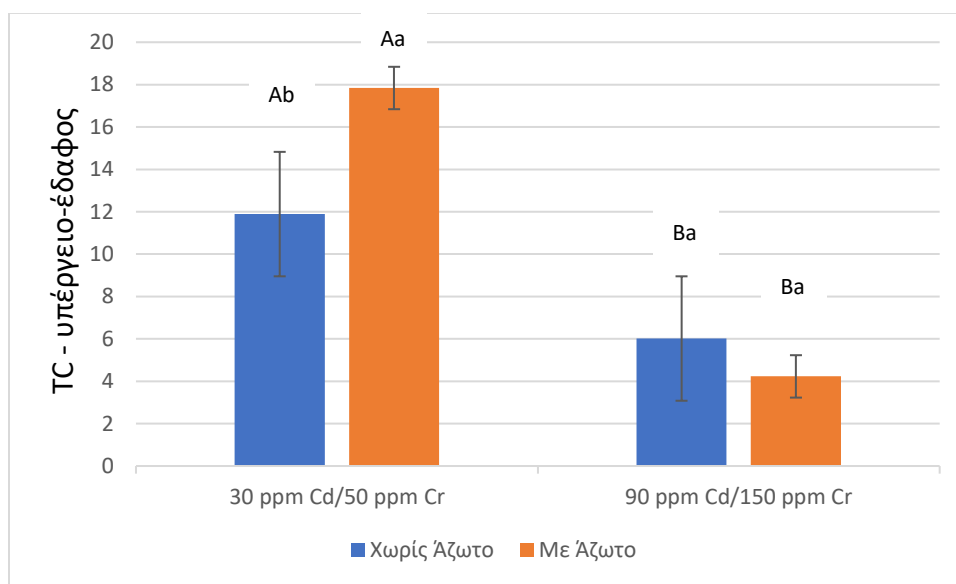
Γράφημα 8. Οι τιμές του συντελεστή μετατόπισης TC Cr(VI) μεταξύ εδάφους και ρίζας των φυτών ρίγανης που καλλιεργήθηκαν σε διαφορετικά εδάφη ρυπασμένα με BM. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές που οφείλονται σε κάθε ένα πειραματικό παράγοντα φαίνονται στο υπερκείμενο πινακάκι και αναφέρονται σε επίπεδο $p \leq 0,05$. Η στατιστική ανάλυση έγινε με μη παραμετρικό τεστ για αυτό δεν υπάρχει ένδειξη για αλληλεπίδραση. Τα γράμματα στο Γράφημα υποδεικνύουν τις στατιστικώς σημαντικές διαφορές ως εξής: τα κεφαλαία αφορούν τις διαφορές μεταξύ μεταχειρίσεων BM στο ίδιο επίπεδο N, ενώ τα μικρά τις διαφορές μεταξύ των δύο επιπέδων N στην ίδια μεταχείριση.

3.8 Συντελεστής μεταφοράς TC Cr(VI) μεταξύ υπέργειου τμήματος και εδάφους

Οι τιμές του συντελεστή μετατόπισης TC Cr(VI) μεταξύ εδάφους και υπέργειου τμήματος των φυτών ρίγανης που καλλιεργήθηκαν σε διαφορετικά εδάφη ρυπασμένα με BM κυμάνθηκαν μεταξύ 3,98-19,15 (Γράφημα 9). Και εδώ η εικόνα είναι παρόμοια με τον TC μεταξύ εδάφους και ρίζας, με την εξής σημαντική όμως διαφορά: στα χαμηλότερα επίπεδα BM η προσθήκη αζώτου αύξησε σημαντικά τον συντελεστή. Αντίστοιχα με τον TC της ρίζας, οι μεταχειρίσεις με 30ppm Cd/50ppm Cr με προσθήκη ή όχι αζώτου εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές αυξήσεις του TC, σε

σύγκριση με τις αντίστοιχες των 90ppm Cd/150ppm Cr. Στις τελευταίες δύο η προσθήκη αζώτου δεν προκάλεσε διαφορές.

	Sig
BM	*
N	*



Γράφημα 9. Οι τιμές του συντελεστή μετατόπισης TC Cr(VI) μεταξύ υπέργειου τμήματος/ ρίζας των φυτών ρίγανης που καλλιεργήθηκαν σε διαφορετικά εδάφη επιρρυπασμένα με BM. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές που οφείλονται σε κάθε ένα πειραματικό παράγοντα φαίνονται στο υπερκείμενο πινακάκι και αναφέρονται σε επίπεδο $p \leq 0,05$. Η στατιστική ανάλυση έγινε με μη παραμετρικό τεστ για αυτό δεν υπάρχει ένδειξη για αλληλεπίδραση. Τα γράμματα στο Γράφημα υποδεικνύουν τις στατιστικώς σημαντικές διαφορές ως εξής: τα κεφαλαία αφορούν τις διαφορές μεταξύ μεταχειρίσεων BM στο ίδιο επίπεδο N, ενώ τα μικρά τις διαφορές μεταξύ των δύο επιπέδων N στην ίδια μεταχείριση.

3.9 Συζήτηση

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία μελετήθηκε το πρότυπο συσσώρευσης του Cr(VI) στα φυτικά μέρη της ρίγανης, η επίδραση αυτού στη βιομάζα και στη συγκέντρωση αμυντικών ουσιών του φυτού και εξήχθησαν συντελεστές που περιγράφουν τόσο την αποδοτικότητα χρήσης του αζώτου, όσο και την μεταφορά/κατανομή του Cr(VI) από το έδαφος στα φυτικά μέρη και μεταξύ των φυτικών μερών.

Η προσθήκη αζώτου οδήγησε σε μία αύξηση της βιομάζας στον Μάρτυρα αλλά όχι στην μεταχείριση των 30 ppm Cd /50 ppm Cr. Αυτό οφειλόταν σε μία αυξημένη μεν χωρίς στατιστικές διαφορές δε συγκέντρωση αζώτου στα φύλλα της ρίγανης. Επομένως, παρότι προστέθηκαν 90 λιπαντικές μονάδες στις αντίστοιχες μεταχειρίσεις αυτό δεν αποτυπώθηκε στα επίπεδα αζώτου στα φύλλα. Ο συντελεστής αποδοτικότητας της χρήσης του αζώτου που σχετίζεται με τα παραπάνω εμφάνισε μεγαλύτερες τιμές στις μεταχειρίσεις που δεν έλαβαν άζωτο, είτε στο μάρτυρα είτε στο 30ppm Cd/50ppm Cr, με στατιστικά σημαντικές διαφορές από τις αντίστοιχες μεταχειρίσεις όπου δεν έγινε προσθήκη αζώτου. Επίσης, όταν δεν υπήρχε προσθήκη αζώτου ο μάρτυρας είχε σημαντικά υψηλότερο NUE από τη μεταχείριση των BM. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία το Cr επηρεάζει αρνητικά την ανάπτυξη των φυτών μειώνοντας τις βασικές μεταβολικές διεργασίες τους. Οι τοξικές επιδράσεις του Cr συσχετίζονται με τη δημιουργία αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (ROS), που προκαλούν οξειδωτικό στρες στα φυτά. Η μελέτη των Sharma et al. (2020) επιχειρώντας να εξετάσει τις συνιστώσες της τοξικότητας του Cr στα φυτά, ανέφερε ότι πρώτα επηρεάζονται σημαντικές μεταβολικές διεργασίες των φυτών, όπως η βιοσύνθεση χλωροφύλλης και η φωτοσύνθεση, ενεργοποιώντας το αμυντικό σύστημα των φυτών.

Η συγκέντρωση των φαινολικών δεν παρουσίασε διαφορές μεταξύ μεταχειρίσεων και δεν επηρεάστηκε από την προσθήκη αζώτου. Επομένως, στην περίπτωση της ρίγανης του πειράματος αυτού δεν υπήρξε ενεργοποίηση αυτή της αμυντικής γραμμής των φυτών. Πιθανά άλλες αμυντικές ουσίες να αυξήθηκαν για να προστατεύσουν το φυτό που δεν μετρήθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας. Στην εργασία των Kulbat-Warycha et al. (2020) στη ρίγανη όπου μελετήθηκαν οι επιδράσεις τριών BM (Ni, Cu, Zn) στην άμυνα του φυτού. Τα φυτά που αναπτύχθηκαν σε έδαφος ρυπασμένο με Zn, υπήρξε σημαντικός περιορισμός της ανάπτυξης σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις Zn, ενώ οι συγκεντρώσεις Ni και Cu που χρησιμοποιήθηκαν δεν

επηρέασαν σημαντικά την ανάπτυξη τη ρίγανης. Όλα τα εξετασθέντα μέταλλα προκάλεσαν μια δοσο-εξαρτώμενη μείωση στις φωτοσυνθετικές χρωστικές, ειδικά στην περιεκτικότητα σε ολική χλωροφύλλη. Τα υψηλότερα επίπεδα κυτταρικής βλάβης παρατηρήθηκαν σε φυτά που αναπτύχθηκαν με Cu και Zn. Η αυξανόμενη συγκέντρωση αυτών των μετάλλων (ιδιαίτερα του Zn) προκάλεσε περαιτέρω αύξηση της κυτταρικής βλάβης. Τα 3000 ppm Zn προκάλεσαν τη μεγαλύτερη αύξηση στη συγκέντρωση της προλίνης σε σύγκριση με τα φυτά ελέγχου, υποδηλώνοντας οσμωτική καταπόνηση. Η αύξηση των συγκεντρώσεων Cu και Zn οδήγησε σε μείωση της συγκέντρωσης των φαινολικών ενώσεων και της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας.

Σε μία άλλη μελέτη για το φυτό ρίγανη, μελετήθηκαν οι επιδράσεις των αυξανόμενων συγκεντρώσεων χαλκού του εδάφους σε μια σειρά από δομικές παραμέτρους των φύλλων σε φυτά ρίγανης για να προσδιοριστεί η επίδραση της τοξικότητας του χαλκού (Panou-Filothou, 2001). Τα φύλλα που είχαν καταπονηθεί με χαλκό ήταν μικρά και χλωρωτικά και υπέστησαν πάχυνση του ελάσματός τους, κυρίως λόγω της αύξησης του αριθμού και του όγκου των κυττάρων στο μεσόφυλλο. Ο αριθμός των στομάτων και των αδενικών και μη αδενικών τριχών αυξήθηκε σημαντικά. Οι χλωροπλάστες μειώθηκαν δραματικά σε αριθμό και όγκο. Οι επιδράσεις της τοξικότητας του χαλκού στα φύλλα της ρίγανης περιελάμβαναν σημαντικές δομικές αλλοιώσεις.

Σε ότι αφορά τη συσσώρευση του Cr(VI) στο φυτό εμφανίστηκαν διαφορετικά πρότυπα σε υπέργειο και υπόγειο φυτικό μέρος. Αυτό κυρίως αναφέρεται στην επίδραση της προσθήκης αζώτου στη συσσώρευση του Cr(VI). Και στις δύο περιπτώσεις τα αυξημένα επίπεδα Cr(VI) στο έδαφος οδήγησαν σε στατιστικά σημαντικές αυξήσεις της συγκέντρωσης του μέσα στο φυτό, ανεξαρτήτως προσθήκης αζώτου. Ενδιαφέρον όμως είχαν οι επιδράσεις της προσθήκης αζώτου στο κάθε επίπεδο BM. Στο υπέργειο μέρος η προσθήκη N αύξησε την συγκέντρωση Cr(VI) στα 30 ppm Cd /50 ppm Cr, ενώ την μείωσε στα 90 ppm Cd /150 ppm Cr. Στη ρίζα εμφανίστηκε το αντίθετο αποτέλεσμα: στα 30 ppm Cd /50 ppm Cr η προσθήκη N μείωσε τη συγκέντρωση Cr(VI), ενώ στα υψηλότερα επίπεδα BM δεν την επηρέασε. Στη μελέτη των Levizou et al. (2019) χρησιμοποιήθηκαν ποικίλες συγκεντρώσεις Cr(VI) στο έδαφος για τη διερεύνηση των ορίων ανοχής και της δυνατότητας φυτοαποκατάστασης της ελληνικής ρίγανης (*Origanum vulgare*), σε πείραμα σε γλάστρα που διεξήχθη σε εξωτερικούς χώρους. Η ρίγανη επέδειξε μια μάλλον εξαιρετική ικανότητα βιοσυσσώρευσης Cr τόσο στο υπέργειο μέρος (έως 1200 mg ολικού Cr kg⁻¹

¹ DM) όσο και στο υπόγειο μέρος του φυτού (4300 mg kg⁻¹ DM). Αυτό επιβεβαιώθηκε και στην παρούσα εργασία που η παρουσία του Cr(VI) ήταν εμφανής και συσχετίστηκε θετικά και στα δύο μέρη (υπέργειο και υπόγειο τμήμα) των φυτών ρίγανης που καλλιεργήθηκαν σε διαφορετικά επίπεδα BM. Στους Levizou et al. (2019) οι αποκρίσεις των φυτών έδειξαν ότι υπήρχε ένα όριο περίπου στα 100 mg Cr(VI) kg⁻¹ στο έδαφος, πάνω από το οποίο καταγράφηκαν τα ακόλουθα αποτελέσματα: (i) περιορισμός της μετατόπισης του Cr από το υπόγειο προς το πάνω μέρος του φυτού, ii) μια αύξηση της μεταφοράς Cr από έδαφος στη ρίζα και (iii) η αύξηση του Cr(III) από τη μείωση του Cr(VI) επιβραδύνθηκε σημαντικά στη ρίζα και επιταχύνθηκε στο εναέριο τμήμα. Η [Cr] στο έδαφος που ξεπέρασε αυτό το όριο προκάλεσε προβλήματα στα φυτά ρίγανης, με αποτέλεσμα μια δοσο-εξαρτώμενη μείωση της ανάπτυξης και της συγκέντρωσης φαινολικών στα φύλλα.

Οι δείκτες ρύπανσης των φυτών ποσοτικοποιούν τις αποκρίσεις των φυτών στην καταπόνηση λόγω της παρουσίας BM στο έδαφος όσον αφορά την πρόσληψη αυτών, την ικανότητα συσσώρευσης τους στα διάφορα φυτικά μέρη και την ανθεκτικότητα των φυτών (Antoniadis et al., 2017). Ο συντελεστής μετατόπισης TF Cr(VI) από τη ρίζα στο υπέργειο μέρος των φυτών ρίγανης ήταν μεγαλύτερος στη χαμηλότερη συγκέντρωση BM με προσθήκη N. Γενικά, η προσθήκη αζώτου είχε διαφορετικό αποτέλεσμα στις δύο μεταχειρίσεις BM. Στην 30ppm Cd/50ppm Cr οδήγησε σε αύξηση το TF, ενώ στην 90ppm Cd/150ppm Cr το μείωσε ελαφρά, χωρίς στατιστική διαφορά. Όπως ήταν αναμενόμενο τα υψηλότερα επίπεδα BM αύξησαν το TF, όταν δε προστέθηκε N. Ο συντελεστής μεταφοράς Cr(VI) από το έδαφος στο υπέργειο (TC) παρουσίασε μείωση στις μεταχειρίσεις 90 ppm Cd /150 ppm Cr συγκριτικά με τις αντίστοιχες των 30 ppm Cd /50 ppm Cr και στα δύο επίπεδα N. Και εδώ η προσθήκη N αύξησε το TC μόνο στα χαμηλότερα επίπεδα BM. Παρόμοιο ήταν το πρότυπο διαφορών στον συντελεστή μεταφοράς Cr(VI) μεταξύ εδάφους-ρίζας, με μία σημαντική όμως διαφορά: στα χαμηλότερα επίπεδα BM η προσθήκη αζώτου μείωσε σημαντικά τον TC. Ο συντελεστής μεταφοράς, TC, καταγράφει την ικανότητα πρόσληψης ενός φυτικού είδους σε σχέση με τη συγκεκριμένη συγκέντρωση του BM που προστίθεται στο έδαφος, απεικονίζοντας την κινητικότητα στοιχείου μεταξύ εδάφους και φυτού. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, υπάρχει μια αρνητική σχέση του TC με την αύξηση του [Cr] (Antoniadis et al., 2017), κάτι που επιβεβαιώθηκε και στα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης.

Η συγκέντρωση του ΒΜ στον φυτικό ιστό δεν μπορεί να είναι ανάλογη με την αυξανόμενη συγκέντρωση του εδάφους πάνω από ένα ορισμένο όριο, κυρίως λόγω της αντίδρασης του φυτού, της στρατηγικής πρόσληψης και της ενεργοποίησης των αμυντικών μηχανισμών. Κατά συνέπεια, η περαιτέρω προσθήκη ενός δεδομένου στοιχείου στο έδαφος αναμένεται να μειώσει την TC. Παρόμοιες τάσεις της TC κατά την αύξηση του [Cr] αναφέρθηκαν για το *Spartina argentinensis*, στο οποίο η μέγιστη TC καταγράφηκε σε ενδιάμεσες συγκεντρώσεις Cr (Ao et al. 2022).

Συμπεράσματα

- Η υψηλότερη συγκέντρωση BM που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα, 90ppm Cd/150ppm Cr, οδήγησε στον πρόωρο θάνατο των φυτών, τον οποίο δεν απέτρεψε η προσθήκη N.
- Τα φυτά των μεταχειρίσεων με 30ppm Cd/50ppm Cr επιβίωσαν μέχρι το τέλος του πειράματος, με σημαντικές όμως μειώσεις της βιομάζας τους σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Και εδώ η προσθήκη N δεν βελτίωσε την ανάπτυξη των φυτών.
- Η συγκέντρωση N στα φύλλα ήταν υψηλότερη στις μεταχειρίσεις BM σε σύγκριση με τον Μάρτυρα, ανεξαρτήτως όμως προσθήκης N.
- Η αποδοτικότητα χρήσης αζώτου ήταν σημαντικά υψηλότερη στις μεταχειρίσεις που δεν προστέθηκε N, τόσο στον μάρτυρα, όσο και στα 30ppm Cd/50ppm Cr.
- Η συσσώρευση Cr(VI) τόσο στο υπέργειο τμήμα, όσο και στη ρίζα ήταν σημαντικά μεγαλύτερη στα υψηλότερα επίπεδα BM σε σύγκριση με τα 30ppm Cd/50ppm Cr.
- Η προσθήκη N επέδρασε διαφορετικά στη συσσώρευση Cr(VI) στα χαμηλά και υψηλά επίπεδα BM στο υπέργειο τμήμα. Στα χαμηλά επίπεδα αύξησε την [Cr(VI)] και στα υψηλά την μείωσε.
- Η προσθήκη N επέδρασε διαφορετικά στη συσσώρευση Cr(VI) στα χαμηλά και υψηλά επίπεδα BM και στο υπόγειο τμήμα, με διαφορετική κατεύθυνση από το υπέργειο: στα χαμηλά επίπεδα μείωσε την [Cr(VI)] και στα υψηλά δεν την επηρέασε.
- Η προσθήκη N ευνόησε την μετατόπισή του Cr(VI) από την ρίζα στο υπέργειο (TF) μόνο στα χαμηλά επίπεδα BM, ενώ στα υψηλότερα δεν την επηρέασε.
- Οι συντελεστές μεταφοράς (TC) του Cr(VI) από το έδαφος στη ρίζα και από το έδαφος στο υπέργειο εμφάνισαν σημαντικά μεγαλύτερες τιμές στα χαμηλά επίπεδα BM σε σχέση με τα υψηλότερα. Η προσθήκη N μείωσε σημαντικά τον TC μεταξύ εδάφους-ρίζας, ενώ τον αύξησε μεταξύ εδάφους-υπέργειου.

- Συνολικά η ρίγανη φάνηκε μη ανθεκτική στο συνδυασμό και τις συγκεκριμένες συγκεντρώσεις BM του παρόντος πειράματος και η προσθήκη N δεν βελτίωσε την ανθεκτικότητα και ανάπτυξή της.

Βιβλιογραφία

- Adebiyi, F. M., & Ayeni, D. A. (2022). Chemical speciation, bioavailability and risk assessment of potentially toxic metals in soils around petroleum product marketing company as environmental degradation indicators. *Petroleum Research*, 7(2), 286–296. <https://doi.org/10.1016/j.ptlrs.2021.08.006>
- Ahmad, I., Akhtar, M. J., Zahir, Z. A., & Jamil, A. (2012). Effect of cadmium on seed germination and seedling growth of four wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Pak. J. Bot*, 44(5), 1569–1574.
- An, Y.-J. (2004). Soil ecotoxicity assessment using cadmium sensitive plants. *Environmental Pollution*, 127(1), 21–26. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(03\)00263-X](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(03)00263-X)
- Antoniadis, V., Levizou, E., Shaheen, S. M., Ok, Y. S., Sebastian, A., Baum, C., Prasad, M. N. V., Wenzel, W. W., & Rinklebe, J. (2017). Trace elements in the soil-plant interface: Phytoavailability, translocation, and phytoremediation—A review. *Earth-Science Reviews*, 171, 621–645. <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2017.06.005>
- Ao, M., Chen, X., Deng, T., Sun, S., Tang, Y., Morel, J. L., Qiu, R., & Wang, S. (2022). Chromium biogeochemical behaviour in soil-plant systems and remediation strategies: A critical review. *Journal of Hazardous Materials*, 424, 127233. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127233>
- Azadi, N., & Raiesi, F. (2021). Salinity-induced changes in cadmium availability affect soil microbial and biochemical functions: Mitigating role of biochar. *Chemosphere*, 274, 129924. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129924>
- Baker, A. J. M. (1981). Accumulators and excluders -strategies in the response of plants to heavy metals. *Journal of Plant Nutrition*, 3(1–4), 643–654. <https://doi.org/10.1080/01904168109362867>
- Cabala, J., & Teper, L. (2007). Metalliferous Constituents of Rhizosphere Soils Contaminated by Zn–Pb Mining in Southern Poland. *Water, Air, and Soil Pollution*, 178(1–4), 351–362. <https://doi.org/10.1007/s11270-006-9203-1>

- Chibuike, G. U., & Obiora, S. C. (2014). Heavy Metal Polluted Soils: Effect on Plants and Bioremediation Methods. *Applied and Environmental Soil Science*, 2014, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2014/752708>
- Balamurugan D., Udayasooriyan C., Kumar K.V., Jayabalakrishnan R.M., & Natesan R. (2014). Removal of Hexavalent Chromium [Cr (VI)] from Spiked Soil Using Na Y (Nano Sodium) Zeolite Supported Zero Valent Iron Nanoparticles. *Environment and Ecology Research*, 2(8), 291–300. <https://doi.org/10.13189/eer.2014.020802>
- Egerić, M., Smičiklas, I., Dojčinović, B., Sikirić, B., Jović, M., Šljivić-Ivanović, M., & Čakmak, D. (2019). Interactions of acidic soil near copper mining and smelting complex and waste-derived alkaline additives. *Geoderma*, 352, 241–250. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2019.06.015>
- Gratão, P. L., Monteiro, C. C., Rossi, M. L., Martinelli, A. P., Peres, L. E. P., Medici, L. O., Lea, P. J., & Azevedo, R. A. (2009). Differential ultrastructural changes in tomato hormonal mutants exposed to cadmium. *Environmental and Experimental Botany*, 67(2), 387–394. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.06.017>
- Hao, H., Chen, T., Jin, M., Lei, M., Liu, C., Zu, W., & Huang, L. (2011). [Recent advance in solidification/stabilization technology for the remediation of heavy metals-contaminated soil]. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao = The Journal of Applied Ecology*, 22(3), 816–824.
- He, Z. L., Yang, X. E., & Stoffella, P. J. (2005). Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 19(2–3), 125–140. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2005.02.010>
- Hofman, J., Dušek, L., Klánová, J., Bezchlebová, J., & Holoubek, I. (2004). Monitoring microbial biomass and respiration in different soils from the Czech Republic—a summary of results. *Environment International*, 30(1), 19–30. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(03\)00142-9](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(03)00142-9)
- Islam, F., Yasmeen, T., Arif, M. S., Riaz, M., Shahzad, S. M., Imran, Q., & Ali, I. (2016). Combined ability of chromium (Cr) tolerant plant growth promoting bacteria (PGPB) and salicylic acid (SA) in attenuation of chromium stress in maize plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 108, 456–467. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.08.014>

- Jarosławiecka, A. K., & Piotrowska-Seget, Z. (2022). The Effect of Heavy Metals on Microbial Communities in Industrial Soil in the Area of Piekary Śląskie and Bukowno (Poland). *Microbiology Research*, 13(3), 626–642. <https://doi.org/10.3390/microbiolres13030045>
- Jibril, S. A., Hassan, S. A., Ishak, C. F., & Megat Wahab, P. E. (2017). Cadmium Toxicity Affects Phytochemicals and Nutrient Elements Composition of Lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Advances in Agriculture*, 2017, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2017/1236830>
- Kim, K.-H., Kabir, E., & Jahan, S. A. (2017). Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Science of The Total Environment*, 575, 525–535. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.009>
- Kulbat-Warycha, K., Georgiadou, E. C., Mańkowska, D., Smolińska, B., Fotopoulos, V., & Leszczyńska, J. (2020). Response to stress and allergen production caused by metal ions (Ni, Cu and Zn) in oregano (*Origanum vulgare* L.) plants. *Journal of Biotechnology*, 324, 171–182. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.10.025>
- Lefrancq, M., Imfeld, G., Payraudeau, S., & Millet, M. (2013). Kresoxim methyl deposition, drift and runoff in a vineyard catchment. *Science of The Total Environment*, 442, 503–508. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.09.082>
- Levizou, E., Zanni, A. A., & Antoniadis, V. (2019). Varying concentrations of soil chromium (VI) for the exploration of tolerance thresholds and phytoremediation potential of the oregano (*Origanum vulgare*). *Environmental Science and Pollution Research*, 26(1), 14–23. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2658-y>
- Liu, Y., Li, S., Ni, Z., Qu, M., Zhong, D., Ye, C., & Tang, F. (2016). Pesticides in persimmons, jujubes and soil from China: Residue levels, risk assessment and relationship between fruits and soils. *Science of The Total Environment*, 542, 620–628. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.10.148>
- Mandzhieva, S., Chaplygin, V., Chernikova, N., Fedorenko, A., Voloshina, M., Minkina, T., Rajput, V. D., Elinson, M., & Wong, M. H. (2022). Responses of Spring Barley to Zn- and Cd-Induced Stress: Morphometric Analysis and Cytotoxicity Assay. *Plants*, 11(23), 3332. <https://doi.org/10.3390/plants11233332>

- Michael-Igolima, U., Abbey, S. J., & Ifelebuegu, A. O. (2022). A systematic review on the effectiveness of remediation methods for oil contaminated soils. *Environmental Advances*, 9, 100319. <https://doi.org/10.1016/j.envadv.2022.100319>
- Panou-Filothou, H. (2001). Effects of Copper Toxicity on Leaves of Oregano (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*). *Annals of Botany*, 88(2), 207–214. <https://doi.org/10.1006/anbo.2001.1441>
- Pastor, S. (2003). Biomonitoring of four European populations occupationally exposed to pesticides: use of micronuclei as biomarkers. *Mutagenesis*, 18(3), 249–258. <https://doi.org/10.1093/mutage/18.3.249>
- Prado, C., Rosa, M., Pagano, E., & Prado, F. (2013). Metabolic interconnectivity among alternative respiration, residual respiration, carbohydrates and phenolics in leaves of *Salvinia minima* exposed to Cr(VI). *Environmental and Experimental Botany*, 87, 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2012.10.005>
- Rys, M., Saja-Garbarz, D., & Skoczowski, A. (2022). Phytotoxic Effects of Selected Herbal Extracts on the Germination, Growth and Metabolism of Mustard and Oilseed Rape. *Agronomy*, 12(1), 110. <https://doi.org/10.3390/agronomy12010110>
- Sharma, A., Kapoor, D., Wang, J., Shahzad, B., Kumar, V., Bali, A. S., Jasrotia, S., Zheng, B., Yuan, H., & Yan, D. (2020). Chromium Bioaccumulation and Its Impacts on Plants: An Overview. *Plants*, 9(1), 100. <https://doi.org/10.3390/plants9010100>
- Singh, S., Parihar, P., Singh, R., Singh, V. P., & Prasad, S. M. (2016). Heavy Metal Tolerance in Plants: Role of Transcriptomics, Proteomics, Metabolomics, and Ionomics. *Frontiers in Plant Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01143>
- Sofy, M. R., Seleiman, M. F., Alhammad, B. A., Alharbi, B. M., & Mohamed, H. I. (2020). Minimizing Adverse Effects of Pb on Maize Plants by Combined Treatment with Jasmonic, Salicylic Acids and Proline. *Agronomy*, 10(5), 699. <https://doi.org/10.3390/agronomy10050699>
- Sutkowska, K., Teper, L., Czech, T., Hulok, T., Olszak, M., & Zogala, J. (2020). Quality of Peri-Urban Soil Developed from Ore-Bearing Carbonates: Heavy Metal Levels and Source Apportionment Assessed Using Pollution Indices. *Minerals*, 10(12), 1140.

<https://doi.org/10.3390/min10121140>

- Tang, Z., Fan, F., Wang, X., Shi, X., Deng, S., & Wang, D. (2018). Mercury in rice (*Oryza sativa* L.) and rice-paddy soils under long-term fertilizer and organic amendment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 150, 116–122. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.12.021>
- Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K., & Sutton, D. J. (2012). *Heavy Metal Toxicity and the Environment* (pp. 133–164). https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4_6
- Vardhan, K. H., Kumar, P. S., & Panda, R. C. (2019). A review on heavy metal pollution, toxicity and remedial measures: Current trends and future perspectives. *Journal of Molecular Liquids*, 290, 111197. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111197>
- Wang, A. S., Angle, J. S., Chaney, R. L., Delorme, T. A., & Reeves, R. D. (2006). Soil pH Effects on Uptake of Cd and Zn by *Thlaspi caerulescens*. *Plant and Soil*, 281(1–2), 325–337. <https://doi.org/10.1007/s11104-005-4642-9>
- World Health Organization. (1996). *Permissible Limits of Heavy Metals in Soil and Plants*. World Health Organization; Geneva, Switzerland.
- Wu, X., Cobbina, S. J., Mao, G., Xu, H., Zhang, Z., & Yang, L. (2016). A review of toxicity and mechanisms of individual and mixtures of heavy metals in the environment. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(9), 8244–8259. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6333-x>
- Xu, H., Chen, Y., Huang, H., Liu, Y., & Yang, Z. (2013). Removal of lead (II) and cadmium (II) from aqueous solutions using spent *Agaricus bisporus*. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 91(3), 421–431. <https://doi.org/10.1002/cjce.21671>
- Xu, M., Dai, W., Zhao, Z., Zheng, J., Huang, F., Mei, C., Huang, S., Liu, C., Wang, P., & Xiao, R. (2022). Effect of rice straw biochar on three different levels of Cd-contaminated soils: Cd availability, soil properties, and microbial communities. *Chemosphere*, 301, 134551. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134551>
- YI, T., & XIANG, P. (2016). Emergy analysis of paddy farming in Hunan Province, China: A new perspective on sustainable development of agriculture. *Journal of Integrative Agriculture*, 15(10), 2426–2436. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(16\)61375-8](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(16)61375-8)

Zhang, N., Yan, J., & Liu, P. (2021). Effect of Bacterial Manure on the Properties of Complex Soil and Growth of Ryegrass. *Agronomy*, 11(3), 568. <https://doi.org/10.3390/agronomy11030568>