

ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΖΙΖΑΝΙΟΛΟΓΙΑΣ



UNIVERSITY OF
THESSALY

**«Φυσιολογικές αποκρίσεις της ρίγανης (*Origanum vulgare*) σε
αυξημένα επίπεδα μολύβδου στο έδαφος»**

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Λεβίζου Ευθυμία

Παπανικολόπουλος Αθανάσιος

Πτυχιακή Εργασία

Βόλος, Φεβρουάριος 2019

**Φυσιολογικές αποκρίσεις της ρίγανης (*Origanum vulgare*) σε αυξημένα
επίπεδα μολύβδου στο έδαφος**

Παπανικολόπουλος Αθανάσιος

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Ευθυμία Λεβίζου

Επίκουρη Καθηγήτρια Φυσιολογίας Φυτών, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής
Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Αντωνιάδης Βασίλειος

Επίκουρος Καθηγητής Εφαρμοσμένη Εδαφολογίας, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής
Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Δαναλάτος Νικόλαος

Καθηγητής Γεωργίας-Οικολογίας Φυτών Μεγάλης Καλλιέργειας, Τμήμα
Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Ευχαριστώ θερμά την καθηγήτρια μου κα Λεβίζου Ευθυμία για την ανάθεση του θέματος και την υπομονή που έκανε κατά τη διάρκεια της υλοποίησης της πτυχιακής εργασίας, καθώς και για την καθοδήγησή της και την πολύτιμη βοήθεια της καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης του πειράματος αλλά και κατά τη συγγραφή της πτυχιακής εργασίας.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον κ. Αντωνιάδη Βασίλειο, για την καθοδήγηση του, και τις συμβουλές που παρείχε κατά τη διάρκεια του πειράματος.

Ευχαριστώ τον κ. Δαναλάτο Νικόλαο για τη συμμετοχή του στην περάτωση της εργασίας αυτής και τη συμμετοχή του στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή.

Στην ομαλή διεκπεραίωση αυτής της πτυχιακής εργασίας συνετέλεσαν επίσης κάποια άτομα, στα οποία θέλω να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ, στην Εύα Τσουμαλάκου και στον Στράτο Κωστάκο.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια μου για την μόνιμη στήριξη της όλα αυτά τα χρόνια φοίτησης.

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή.....	6
1.1 Γενικά για το μόλυβδο	6
1.2 Ο Μόλυβδος στο έδαφος.....	6
1.3 Προβλήματα που προκαλούνται στον άνθρωπο.....	7
1.4 Ο Μόλυβδος στο φυτό.....	8
1.4.1 Είσοδος και μεταφορά εντός του φυτού	8
1.5 Φυτοεξυγίανση	9
1.5.1 Κατηγορίες φυτών με βάση την αφομοίωση των βαρέων μετάλλων.....	10
1.6 Προβλήματα που προκαλεί στο φυτό	11
1.7 Μηχανισμοί Άμυνας του φυτού απέναντι στο μόλυβδο	13
1.8 Ρίγανη.....	14
2. Υλικά και Μέθοδοι.....	16
2.1 Γενικά	16
2.2 Πειραματικός Σχεδιασμός.....	16
2.3 Μετρήσεις-Αναλύσεις.....	18
2.3.1 Μετρήσεις επι τόπου	18
2.3.2 Αναλύσεις στο εργαστήριο.....	20
2.3.4 Μετρήσεις στο εργαστήριο	22
2.4 Στατιστική επεξεργασία των δεδομένων.....	22
3. Αποτελέσματα	24
4. Συζήτηση	37
5. Συμπεράσματα.....	39
6. Βιβλιογραφία	40

Περίληψη

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας, ήταν να εξετάσει την φυσιολογική απόκριση του φυτού ρίγανης (*Origanum vulgare*), σε εδάφη επιβαρυμένα με αυξημένες ποσότητες μολύβδου (Pb). Ο μόλυβδος αποτελεί έναν από τους πιο κοινούς ρύπους, συνάμα όμως αποτελεί και έναν από τους πιο τοξικούς. Στο έδαφος εντοπίζεται φυσιολογικά σε συγκεντρώσεις $<50\text{mg kg}^{-1}$, ωστόσο οι ανθρώπινες δραστηριότητες οδηγούν στην σημαντική συσσώρευση του στο έδαφος. Προκειμένου να μελετηθούν οι επιδράσεις αυξημένων εδαφικών συγκεντρώσεων Pb στο φυτό ρίγανης, τα φυτά διαχωρίστηκαν σε τρεις ομάδες και φυτεύτηκαν σε έδαφος που υπέστη τις εξής μεταχειρίσεις: α) καμία επιμόλυνση Pb (Control), β) Μεταχείριση M1: επιμόλυνση με 300ppm Pb, γ) Μεταχείριση M2: επιμόλυνση με 900ppm Pb. Εν συνεχεία πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις, *in situ* αλλά και στο χώρο του εργαστηρίου. Επί τόπου έγιναν μετρήσεις του φθορισμού της χλωροφύλλης *a in vivo*. Οι υπόλοιπες μετρήσεις έλαβαν χώρα στο εργαστήριο: προσδιορισμός της συγκέντρωσης των χλωροφυλλών, καροτενοειδών, ολικών φαινολικών και προλίνης, καθώς και μετρήσεις αναπτυξιακών παραμέτρων των φυτών. Τα αποτελέσματα φανερώνουν ότι η παρουσία του μολύβδου στο έδαφος δεν επηρέασε τα φυτά ρίγανης στην ανάπτυξη ή τα φυσιολογικά τους χαρακτηριστικά τους. Τα φυτά ρίγανης επέδειξαν εξαιρετική αντοχή στην παρουσία μολύβδου και δεν φάνηκε να εμφανίζουν προβλήματα τοξικότητας. Το γεγονός αυτό καταδεικνύει ότι ενδεχομένως η ρίγανη να αποτελεί κατάλληλο φυτό για φυτοεξυγίανση του εδάφους από βαρέα μέταλλα όπως ο μόλυβδος.

1. Εισαγωγή

1.1 Γενικά για το μόλυβδο

Τα φυτά αποτελούν στόχους για μεγάλο εύρος ρύπων, οι οποίοι ποικίλουν σε τοξικότητα, συγκέντρωση, προέλευση κ.ο.κ. Μεταξύ των πιο κοινών ρύπων συγκαταλέγεται ο μόλυβδος (στην αγγλική γλώσσα Lead, με χημικό σύμβολο Pb), αποτελώντας μάλιστα ένα από τους πιο τοξικούς ρύπους σε αρκετά χαμηλή συγκέντρωση (Cecchi et al. 2008). Σύμφωνα με στοιχεία της ATDSR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, USA) ο μόλυβδος κατατάσσεται ως ο δεύτερος πιο τοξικός ρύπος μετά το αρσενικό, όχι με βάση την απόλυτη τοξικότητα, αλλά με βάση συνδυασμό στοιχείων όπως η συχνότητα εμφάνισης του στο έδαφος, η τοξικότητα του και η πιθανότητα να έρθει σε επαφή ο άνθρωπος με αυτόν.

2017 Rank	Substance Name	Total Points	CAS RN
1	ARSENIC	1674	7440-38-2
2	LEAD	1531	7439-92-1
3	MERCURY	1458	7439-97-6
4	VINYL CHLORIDE	1358	75-01-4
5	POLYCHLORINATED BIPHENYLS	1345	1336-36-3

Εικόνα 1: Κατάταξη των δυνητικά επικινδυνότερων ουσιών για την υγεία του ανθρώπου με βάση τον συνδυασμό της συχνότητας, τοξικότητας και πιθανότητας ανθρώπινης έκθεσης (ATSDR 2017)

Ο μόλυβδος δεν έχει κάποια γνωστή βιολογική λειτουργία, τόσο στον τον άνθρωπο όσο και στο φυτό (Maestri et al. 2010), ωστόσο προκαλεί πληθώρα προβλημάτων και στους δύο οργανισμούς.

1.2 Ο Μόλυβδος στο έδαφος

Ο μόλυβδος εντοπίζεται κυρίως στο έδαφος, αλλά απαντάται επίσης στο νερό και την ατμόσφαιρα. Στο έδαφος φυσιολογικά βρίσκεται σε συγκεντρώσεις $<50\text{mg kg}^{-1}$ (Pourrut et al. 2011). Οι ανθρώπινες δραστηριότητες ωστόσο ανεβάζουν τη συγκέντρωση σε νούμερα αρκετά μεγαλύτερα από τα φυσιολογικά, ως αποτέλεσμα της εναπόθεσης του από ποικιλία πηγών, οι οποίες σχετίζονται με τον ανθρώπινο παράγοντα. Τέτοιες πηγές ρύπανσης είναι:

- Καυσαέρια οχημάτων
- Συστατικά ελαστικών οχημάτων και φρένων
- Αστικά απόβλητα-Προϊόντα βιολογικού καθαρισμού
- Καυσαέρια από τη βιομηχανία
- Λιπάσματα, εντομοκτόνα, φυτοφάρμακα
- Τήξη μεταλλευμάτων

- Απόβλητα από τη βιομηχανία κατασκευής μπαταριών
- Πρόσθετα σε χρωστικές και καύσιμα
- Βιομηχανίες επιμετάλλωσης
- Πυρομαχικά και εκρηκτικά

Η ρύπανση του εδάφους είναι αποτέλεσμα συσσώρευσης του μολύβδου, καθώς έχει μεγάλο χρόνο παραμονή σε αυτό. Ο προερχόμενος από ανθρώπινη δραστηριότητα μόλυβδος εντοπίζεται στα επιφανειακά στρώματα του εδάφους (Cecchi et al. 2008), λόγω του ότι δεσμεύεται από την οργανική ουσία του εδάφους σχηματίζοντας σύμπλοκες ενώσεις και ιόντα (Korittke et al. 2008) Το γεγονός αυτό τον καθιστά σχεδόν ακίνητο, με αποτέλεσμα να μην δύναται να εκπλυθεί και να μεταφερθεί στα βαθύτερα στρώματα. Η παρουσία του μολύβδου στο συγκεκριμένο τμήμα του εδάφους όμως επηρεάζει και τη λειτουργία των μικροοργανισμών. Ως εκ τούτου, στο επιφανειακό στρώμα συγκεντρώνεται ακόμα περισσότερη οργανική ουσία η οποία δεν μπορεί να αποικοδομηθεί. Αυτό που πρωτίστως καθορίζει την συγκράτηση του μολύβδου στο έδαφος και την κινητικότητα του σε βαθύτερα στρώματα, είναι η τιμή του pH (Korittke et al. 2008) καθώς και η ικανότητα ανταλλαγής κατιόντων (C.E.C) (Poungut et al. 2011). Πλην αυτών, οι βιογεωχημικοί παράγοντες που επηρεάζουν τα προαναφερθέντα είναι: είδος του εδάφους, συνθήκες οξειδοαναγωγής, ποσότητα του μολύβδου (Bi et al. 2010), το είδος των φυτών, ανταγωνιστικά επίπεδα κατιόντων. Οι παράγοντες αυτοί δρουν είτε μεμονωμένα, είτε σε συνδυασμό μεταξύ τους.

Γενικά, η συγκέντρωση του μολύβδου είναι αντιστρόφως ανάλογη με το βάθος του εδάφους (Cecchi et al. 2008). Η ισχυρή δέσμευση του μολύβδου από την οργανική ουσία και τα κolloειδή του εδάφους σημαίνει ότι ο μόλυβδος σε ένα μικρό ποσοστό του μόνο είναι διαλυτός, άρα και διαθέσιμος για αφομοίωση από τα φυτά. Αυτό βέβαια δημιουργεί και πρόβλημα στις προσπάθειες εξυγίανσης του εδάφους που στηρίζονται στην απορρόφηση του ρύπου από το φυτό, όπως θα αναλυθεί παρακάτω.

Οι πιο κοινές μορφές του μολύβδου που εντοπίζουμε στο έδαφος είναι το ελεύθερο μεταλλικό ιόν Pb^{2+} , συμπλεγμένο με ανόργανα συστατικά και προσδεμένο σε οργανικούς προσδέτες ή σε επιφάνειες σωματιδίων. Επιπρόσθετα, τα ιόντα του μολύβδου δύναται να ενσωματωθούν σε ορυκτά της αργίλου, στην οργανική ουσία του εδάφους καθώς και στα οξείδια του σιδήρου και μαγγανίου (Μήτσιος 2004). Οι πιο σταθερές μορφές του μολύβδου είναι το ελεύθερο μεταλλικό ιόν Pb^{2+} και το υδροξείδιο του μολύβδου $Pb(OH)_2$ (Gupta et al. 2013).

1.3 Προβλήματα που προκαλούνται στον άνθρωπο

Η έκθεση του ανθρώπου σε αυξημένα επίπεδα μολύβδου προκαλεί καρδιαγγειακά και αναπτυξιακά προβλήματα, ενώ έχουν καταγραφεί αρνητικές επιδράσεις στο γαστρεντερικό, μυοσκελετικό, νευρικό, ουροποιητικό και αναπαραγωγικό σύστημα (Gupta et al. 2013).

1.4 Ο Μόλυβδος στο φυτό

1.4.1 Είσοδος και μεταφορά εντός του φυτού

Η οδός εισόδου του μολύβδου στο φυτό είναι μέσω του ριζικού συστήματος και πρόκειται για παθητική διαδικασία. Έχει βρεθεί ότι ένα μικρό ποσοστό του μολύβδου μπορεί να εισέλθει και μέσω των φύλλων. Καθώς αυτό το ποσοστό είναι αμελητέο, η όποια αναφορά για την είσοδο του μολύβδου στο φυτό θα αφορά την είσοδο του μέσω της ρίζας. Ο μολύβδος προσλαμβάνεται μέσω των ριζικών τριχιδίων και δεσμεύεται από καρβοξυλικές ομάδες ή απευθείας στο κυτταρικό τοίχωμα των κυττάρων της ρίζας. Από εκεί, με μια παθητική διαδικασία διαμέσου της αποπλαστικής οδού, ακολουθώντας τη ροή νερού μεταφέρεται στο υπόλοιπο φυτό. Εναλλακτικά κινείται διαμέσου ιοντικών καναλιών ασβεστίου (Pourrut et al. 2011).

Η κατανομή του μολύβδου δεν είναι ομοιόμορφη σε όλο το ριζικό σύστημα. Παρατηρείται αυξημένη συγκέντρωση μολύβδου στην άκρη ρίζας εξαιτίας της νεαρής ηλικίας των κυττάρων που συνεπάγεται λεπτά κυτταρικά τοιχώματα (Korptike 2007). Στην περιοχή αυτή πλησίον της άκρης των ριζών το pH είναι χαμηλότερο αυξάνοντας έτσι τη διαλυτότητα του μολύβδου, κάτι που ευνοεί την απορρόφηση του από τη ρίζα.

Αύξηση της τιμής του pH του εδάφους προκαλεί μειωμένη απορρόφηση του μολύβδου από το φυτό. Συνήθης τρόπος για να επιτευχθεί αυτό το αποτέλεσμα είναι η ασβέστωση. Το ασβέστιο ωστόσο παρεμποδίζει την απορρόφηση του μολύβδου με έναν επιπλέον τρόπο, καθώς φαίνεται να ανταγωνίζεται τα κατιόντα μολύβδου στην απορρόφηση μέσω των ιοντικών καναλιών ασβεστίου (Pourrut et al. 2011). Τέλος, η χαμηλή θερμοκρασία συμβάλει στην μείωση της απορροφούμενης ποσότητας μολύβδου από τη ρίζα.

Αφότου ο μολύβδος εισέλθει στο ριζικό σύστημα, είτε θα παραμείνει εκεί είτε θα μεταφερθεί στο εναέριο τμήμα του φυτού. Ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι μόνο ένα πολύ μικρό ποσοστό του συνολικά απορροφόμενου από το φυτό μολύβδου, της τάξεως του 3-5% μεταφέρεται από τη ρίζα στο εναέριο τμήμα, με το υπόλοιπο 95-97% να παραμένει στο ριζικό σύστημα. Το πρότυπο αυτό εξηγείται από την παρουσία της ενδοδερμίδας, η οποία μέσω της κασπαρικής λωρίδας εμποδίζει την είσοδο τόσο του νερού όσο και των διαλυμένων ουσιών στο ξύλωμα αποτρέποντας τη συνέχιση της αποπλαστικής κίνησης του μολύβδου, ο οποίος πρέπει να ακολουθήσει πλέον τη συμπλαστική οδό.

Για να μεταφερθεί λοιπόν ο μολύβδος από τις ρίζες στο εναέριο τμήμα του φυτού, πρέπει να μετακινηθεί μέσω του ξυλώματος. Περνώντας μέσα από το ξύλωμα είτε σχηματίζει σύμπλοκα με αμινικά ή οργανικά οξέα, ή μεταφέρεται σε ανόργανη μορφή. Κινητήρια δύναμη για τη μεταφορά του μολύβδου μέσω του ξυλώματος είναι η διαπνοή. Τέλος μέσω των αγγείων ο μολύβδος φθάνει έως και τα φύλλα. (Pourrut et al. 2011). Η μειωμένη μεταφορά του μολύβδου στο εναέριο τμήμα του φυτού, έχει πολύ μεγάλη σημασία ώστε να περιοριστεί η ποσότητα του μολύβδου που περνάει στην τροφική αλυσίδα.

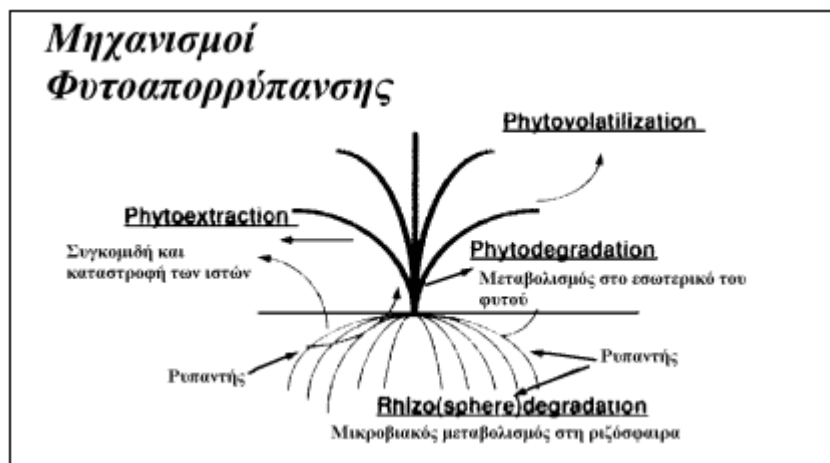
1.5 Φυτοεξυγίανση

Ο όρος Φυτοεξυγίανση (Phytoremediation), αναφέρεται στη χρήση φυτών προς την εξυγίανση ρυπασμένων εδαφών, ατμόσφαιρας και υδάτων (επιφανειακών ή υπόγειων), μέσω της απομάκρυνσης, διάσπασης και σταθεροποίησης των ρυπαντών (Mostafa 2012). Η χρήση φυτών για μείωση της συγκέντρωσης του μολύβδου στο έδαφος, αποτελεί έναν οικονομικό και βιώσιμο τρόπο εξυγίανσης του εδάφους, χωρίς καμία καταστρεπτική επίδραση στο έδαφος. Η επιλογή του κατάλληλου φυτικού είδους πρέπει να είναι προσεκτική.

Η Φυτοεξυγίανση, διακρίνεται σε δυο κύριες κατηγορίες:

A) Φυτοαπορρύπανσης (Phytodecontamination), παρουσία μηχανισμών που βοηθούν στη μείωση της συγκέντρωσης του ρυπαντή στο έδαφος σε αποδεκτά επίπεδα. Αναφορικά, οι μηχανισμοί φυτοεξυγίανσης είναι:

1. Φυτοεξαγωγή (Phytoextraction),
2. Φυτοδιάσπαση (Phytodegradation),
3. Φυτοεξαέρωση (Phytovolatilization),
4. Ριζοδιάσπαση (Rhizodegradation).

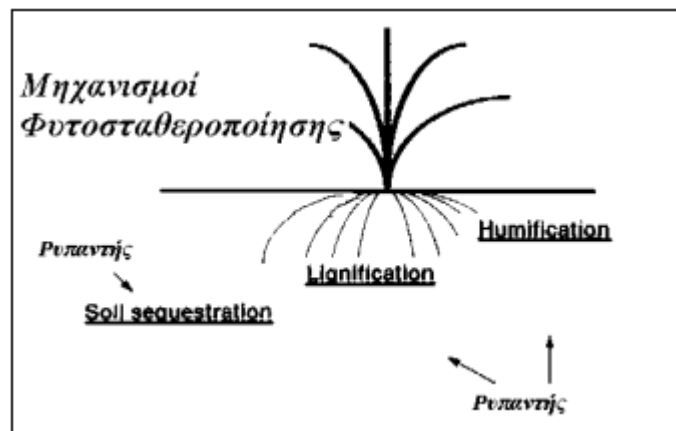


Εικόνα 2: Μηχανισμοί που εμπλέκονται στην διαδικασία της φυτοαπορρύπανσης (Α. Ζαμπετάκης 2001)

B) Φυτοσταθεροποίηση (Phytostabilization), που περιλαμβάνει μηχανισμούς οι οποίοι στοχεύουν στην αδρανοποίηση και απομόνωση του ρυπαντή ούτως ώστε, να μην μεταδοθεί από το έδαφος στην ατμόσφαιρα ή στα υπόγεια ύδατα. Βασίζεται κυρίως στην ικανότητα των ριζών να εκκρίνουν ουσίες που ευνοούν μηχανισμούς όπως η χουμοποίηση-δέσμευση του ρυπαντή στα χουμικά συστατικά του εδάφους, η λιγνιτοποίηση-δέσμευση στα κυτταρικά τοιχώματα των ριζών και δέσμευση στα εδαφικά σωματίδια.

Αναφορικά οι μηχανισμοί φυτοσταθεροποίησης είναι:

1. Χουμοποίηση (Humification), 2. Λιγνιτοποίηση (Lignification), 3. Δέσμευση του ρυπαντή στα εδαφικά σωματίδια (Soil Sequestration) (Λ. Ζαμπετάκης 2001)



Εικόνα 3: Μηχανισμοί που εμπλέκονται στην διαδικασία της φυτοσταθεροποίησης (Λ. Ζαμπετάκης 2001)

1.5.1 Κατηγορίες φυτών με βάση την αφομοίωση των βαρέων μετάλλων

Μια ομάδα φυτών, είναι ικανή να απορροφάει μεγάλες ποσότητες μολύβδου και να τις μεταφέρει στο εναέριο τμήμα τους χωρίς τοξικές επιδράσεις ή έστω με πολύ μικρή τοξικότητα. Τέτοια φυτά ονομάζονται υπερσυσσωρευτές και αποτελούν ένα πολύ καλό εργαλείο για την φυτοεξυγίανση του εδάφους με την εξαγωγή του μολύβδου από το έδαφος

Ο όρος «παράγοντας μεταφοράς» εκφράζει το ποσοστό του μολύβδου που υπάρχει στο φυτό προς ως προς το ποσοστό του μολύβδου που υπάρχει στο έδαφος (Bi et al. 2010). Με βάση αυτόν τον παράγοντα, χωρίζουμε τα φυτά σε δυο κατηγορίες:

1. Φυτά υπερσυσσωρευτές, με τιμή του παράγοντα μεταφοράς > 1
2. Φυτά μη-υπερσυσσωρευτές, με τιμή του παράγοντα μεταφοράς < 1

1.5.1.1 Φυτά Υπερσυσσωρευτές

Η σχετική έρευνα των τελευταίων χρόνων έχει αναδείξει περιπτώσεις φυτών υπερσυσσωρευτών Pb, όπως είναι τα φυτά του γένους *Pelargonium*, τα *Brassica napus* (Pourrut et al. 2011), *Buddleja asiatica* και το *Fagopyrum esculentum* (κοινώς μαυροσίταρο ή φαγόπυρο) (Gurta et al. 2013), τα οποία έχουν την δυνατότητα να προσλαμβάνουν μεγάλες ποσότητες μολύβδου από το έδαφος.

Όπως έχει προαναφερθεί, μικρό μέρος του Pb που βρίσκεται στο έδαφος είναι διαθέσιμο για απορρόφηση από το φυτό και ακόμα μικρότερη είναι η ποσότητα που εν τέλει το φυτό μπορεί να προσλάβει μέσω της ρίζας. Προκείμενου να βελτιωθεί η εξαγωγή του μολύβδου από το έδαφος καθώς και η μεταφορά του από τη ρίζα στο υπέργειο τμήμα του

φυτού, δύναται να χρησιμοποιηθούν χηλικοί παράγοντες. Ένα από τα ευρέως χρησιμοποιούμενα είναι το EDTA (αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ), το οποίο έδειξε να βελτιώνει σημαντικά τόσο την απορρόφηση όσο και τη συσσώρευση του μόλυβδου στο υπέργειο τμήμα του φυτού (Gupta et al. 2009). Πρέπει όμως να σημειωθεί ότι το EDTA εξαιτίας του ότι αυξάνει την κινητικότητα των μετάλλων και του ότι τα μέταλλα αυτά γίνονται πιο προσβάσιμα προς το φυτό, ενέχει περιβαλλοντικούς κινδύνους από την έκπλυση των μετάλλων αυτών. Έτσι έχει προταθεί η χρήση φυσικού αμινοπολυκαρβοξυλικού οξέος όπως το EDDS και NTA (νιτριλοτριοξικό οξύ) (Gupta et al. 2013).

Σημαντικότερη από την χρήση των χηλικών παραγόντων αποδεικνύεται η ύπαρξη μικροβιακών κοινοτήτων στη ριζόσφαιρα, τα οποία παράγουν αυξητικές ορμόνες όπως αυξίνη-IAA, ACC και βοηθούν το φυτό αυξάνοντας την αντοχή του στην τοξικότητα βαρέων μετάλλων (Gupta et al. 2013). Επίσης, φαίνεται ότι ευθύνονται εν μέρει για την φυτοεξυγίανση. Παράδειγμα αποτελούν ενδοσυμβιωτικοί οργανισμοί όπως το βακτήριο *Burkholderia sp.* που αυξάνει δραστικά την βιομάζα του αραβόσιτου και των φυτών τομάτας ενώ παράλληλα αυξάνει την περιεκτικότητα Pb και Cd στον φυτικό ιστό κατά 38-192%. Άλλο ένα παράδειγμα είναι οι ενδο-μυκορριζικοί μύκητες που βελτιώνουν την αντοχή στο μόλυβδο αλλά και την αφομοίωση του από τα φυτά της οικογένειας *Fabaceae* (Poutrut et al. 2011). Φαίνεται ότι οι υφές των συμβιωτικών μυκήτων διεισδύουν καλύτερα στους μικρούς εδαφικούς πόρους, έτσι οι μικροοργανισμοί αυτοί βοηθούν ώστε ο μόλυβδος να γίνει περισσότερο διαθέσιμος στο εδαφικό διάλυμα για αφομοίωση του από το φυτό.

1.5.1.2 Φυτά μη-υπερσυσσωρευτές

Τα φυτικά είδη που δεν εμπίπτουν στην κατηγορία των υπερσυσσωρευτών αντιμετωπίζουν πληθώρα προβλημάτων όταν αναπτυχθούν σε εδαφη μολυσμένα με μόλυβδο, όπως αναλύεται παρακάτω.

1.6 Προβλήματα που προκαλεί στο φυτό

Στο φυτό ο μόλυβδος δύναται να προκαλέσει μείωση ή παρεμπόδιση μιας σειράς αναπτυξιακών και φυσιολογικών διεργασιών, όπως της ανάπτυξης/επιμήκυνσης της ρίζας, της βλάστησης του σπόρου καθώς και της ανάπτυξης του αρτίβλαστου, της διαπνοής, της παραγωγής χλωροφύλλης, της δραστηριότητας κάποιων ενζύμων της απορρόφησης νερού και εν τέλει της ανάπτυξης του φυτού. Επιπρόσθετα δύναται να προκαλέσει μαύρισμα του ριζικού συστήματος και τροφοπενίες (Gupta et al. 2009; Maestri et al. 2010). Οι αρνητικές επιπτώσεις από το μόλυβδο δεν σταματούν εκεί. Επιπρόσθετα μειώνει τον λόγο του μήκους της ρίζας/υπέργειο μέρος του φυτού και τη νωπή βιομάζα, τα φύλλα αποκτούν σκούρο πράσινο χρώμα και δεν αναπτύσσονται κανονικά ενώ τα παλαιότερα μαραίνονται. Σε υψηλές συγκεντρώσεις, ο μόλυβδος προκαλεί φυτοτοξικότητα με καταστροφή των κυτταρικών μεμβρανών, ενώ εν τέλει μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο.

Το είδος και το μέγεθος των προβλημάτων που προκαλεί ο μόλυβδος εξαρτώνται από πολλούς παράγοντες, όπως το είδος του φυτού (γενότυπος και φυσιολογικά χαρακτηριστικά

του), το στάδιο ανάπτυξης του φυτού, η συγκέντρωση του Pb στο έδαφος και η διάρκεια έκθεσης του φυτού (Pourrut et al. 2011).

Ακόμα και πολύ μικρές συγκεντρώσεις μολύβδου είναι ικανές να περιορίσουν τη βλάστηση του σπόρου (Islam et al. 2007), αλλά και την ανάπτυξη του φυτού συνολικά, επιδρώντας αρνητικά τόσο στις ρίζες όσο και στο επίγειο τμήμα του φυτού (Islam et al. 2007; Korittke et al. 2007). Η επίδραση στις ρίζες φαίνεται να είναι μεγαλύτερη, αποτέλεσμα που σχετίζεται με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση του μολύβδου σε αυτές σε σύγκριση με τα υπόλοιπα τμήματα του φυτού.

Όσον αφορά το επίγειο τμήμα του φυτού, σε υψηλές συγκεντρώσεις μολύβδου μειώνεται η βιομάζα του φυτού γεγονός που οφείλεται στη μείωση του ρυθμού ανάπτυξης. Το προαναφερθέν αποτέλεσμα σχετίζεται με τις αρνητικές επιπτώσεις που έχει ο μόλυβδος στην απορρόφηση και το μεταβολισμό των θρεπτικών στοιχείων, αλλά και τη φωτοσύνθεση (Islam et al. 2008). Είναι γνωστό ότι η απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών επηρεάζεται αλλά οι λόγοι δεν είναι εύκολο να προσδιοριστούν καθώς διαφέρουν από είδος σε είδος. Πιθανώς αυτό να συμβαίνει εξαιτίας ανταγωνισμού μεταξύ των στοιχείων, όπως συμβαίνει στην περίπτωση του καλίου, όπου τα ιόντα K^+ ανταγωνίζονται τα ιόντα Pb^{2+} για την είσοδο τους από τα ίδια κανάλια καλίου. Διαφορετική είναι η περίπτωση του αζώτου όπου διαπιστώνεται μια γενική μείωση στη συγκέντρωση ανόργανου αζώτου στο φυτό, λόγω της μειωμένης δραστηριότητας της νιτρικής ρεδοκτάσης, ενός ενζύμου που μετατρέπει τα νιτρικά (NO_3^-) σε νιτρώδη (NO_2^-) και έχει κρίσιμο ρόλο στην αφομοίωση νιτρικού άλατος (Pourrut et al. 2011).

Η παρεμπόδιση της ανάπτυξης του επίγειου τμήματος του φυτού, συνεπάγεται φυσικά μειωμένη ανάπτυξη των φύλλων, δηλαδή μειωμένη φυλλική επιφάνεια κάτι που επηρεάζει τη διαπνοή του φυτού και την υδατική του κατάσταση. Αυτό δεν αποτελεί μεγάλο πρόβλημα για φυτά με μεγάλο αριθμό στομάτων, αφού μπορούν να διαχειριστούν αυτή την κατάσταση (Pourrut et al. 2011). Η μείωση όμως της πλαστικότητας των κυτταρικών τοιχωμάτων εξαιτίας του μολύβδου επηρεάζει την πίεση σπαργής, παρεμποδίζοντας το άνοιγμα και το κλείσιμο των στομάτων. Το άνοιγμα και το κλείσιμο των στομάτων ελέγχεται από μια φυτοορμόνη, το αμψισικό οξύ, το οποίο παρουσία των ιόντων μολύβδου συγκεντρώνεται στη ρίζα και στα φύλλα, οδηγώντας έτσι στο κλείσιμο των στομάτων. Σε συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης μολύβδου άρα και καταπόνησης του φυτού, επάγεται η παραγωγή οσμολυτών, ιδιαίτερα προλίνης, προκειμένου να διατηρηθεί η πίεση σπαργής στα κύτταρα και να μην κλείσουν τα στόματα (Pourrut et al. 2011; Mostafa et al. 2012).

Οι επιπτώσεις του μολύβδου στη φωτοσύνθεση είναι άμεσες και έμμεσες. Η μειωμένη πρόσληψη Mg και Fe φαίνεται να οδηγεί σε μειωμένη σύνθεση χλωροφύλλης, ενώ έχει βρεθεί αρνητική επίπτωση στη συγκέντρωση καροτενοειδών. Επιπρόσθετα, έχουν καταγραφεί μειωμένα επίπεδα πλαστοκινόνης που σχετίζεται με την παρεμπόδιση της ροής ηλεκτρονίων. Η εικόνα συμπληρώνεται από την αρνητική επίδραση του κλεισίματος των στομάτων και της επακόλουθης μειωμένης συγκέντρωσης CO_2 στη λειτουργία του κύκλου του Calvin (Islam et al. 2007; Liu D. et al. 2008, Gupta et al. 2009).

Σε συνθήκες έκθεσης του φυτικού οργανισμού σε βαρέα μέταλλα είναι γνωστό ότι προκαλείται οξειδωτικό στρες, κάτι προκαλείται και από το μόλυβδο (Liu et al. 2008; Pourrut et al. 2011). Το οξειδωτικό στρες είναι αποτέλεσμα συσσώρευσης ενεργών μορφών οξυγόνου, των γνωστών και ως ROS (Reactive Oxygen Species). Οι ενεργές μορφές οξυγόνου μπορεί να προκαλέσουν βλάβες σε νουκλεϊκά οξέα, πρωτεΐνες και λιπίδια (Pourrut et al. 2011) προκαλώντας μη αναστρέψιμες μεταβολικές δυσλειτουργίες που οδηγούν στο θάνατο του κυττάρου (Liu et al. 2008). Στην περίπτωση του μολύβδου η παραγωγή των ROS μπορεί να συμβεί είτε με άμεση αλληλεπίδραση του με το γενετικό υλικό, είτε με έμμεση.

Τέλος, ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα που προκαλεί ο μόλυβδος στα φυτά, είναι αυτό της γενοτοξικότητας. Η επίδραση του μολύβδου αφορά την μείωση της μιτωτικής δραστηριότητας στα κύτταρα της ρίζας, οδηγώντας σε επιμήκυνση του κυτταρικού κύκλου (Patra et al. 2004).

1.7 Μηχανισμοί Άμυνας του φυτού απέναντι στο μόλυβδο

Τα φυτά έχουν φυσικά αναπτύξει μηχανισμούς άμυνας ενάντια στην υψηλή συγκέντρωση του μολύβδου. Τέτοιοι μηχανισμοί άμυνας αφορούν τον αποκλεισμό του μετάλλου από την είσοδο στο φυτό, τη σύνθεση μεταλλοδεσμευτικών πεπτιδίων, την αδρανοποίηση του μέσω χηλικών ενώσεων, την απομόνωση του σε οργανίδια όπως χυμοτόπια, ή σε δομές όπως τα τριγίδια (Gurijala et al. 2015). Επιπροσθέτως, εμπλέκονται μηχανισμοί «αποτοξίνωσης», ενζυμικοί και μη ενζυμικοί προκειμένου να καταπολεμήσουν την αυξημένη παραγωγή ROS (Pourrut et al. 2011).

Μια στρατηγική που ακολουθεί το φυτό για να αποφύγει την τοξικότητα μολύβδου, είναι να περιορίζει το μόλυβδο στη ρίζα εμποδίζοντας τον από το να μεταφερθεί στα υπόλοιπα φυτικά μέρη. Πριν ακόμα όμως καταφέρει να εισέλθει στο φυτό, μια πρώτη ζώνη άμυνας είναι οργανικά μόρια τα οποία εξέρχονται από τα κύτταρα της ρίζας και σε συνεργασία με βλεννώδεις ουσίες στο ακρότατο σημείο των ριζών συνδέονται με το μόλυβδο στη ριζόσφαιρα καθιστώντας τον μη διαθέσιμο ή λιγότερο διαθέσιμο για αφομοίωση από το φυτό.

Λόγω του μεγάλου ατομικού αριθμού του, και εξαιτίας της συγκράτησης από ανιόντα, ο μόλυβδος είναι βραδυκίνητος εντός του φυτού, όντας μάλιστα ένα από τα βαρέα μέταλλα με τη μικρότερη κινητικότητα. Το μεγαλύτερο μέρος του μολύβδου που απορροφάται παραμένει δεσμευμένο στη ρίζα. Έτσι αποφεύγεται η μεταφορά του στον αγγειακό ιστό και μόνο ένα μικρό ποσοστό του φτάνει στο υπέργειο μέρος μέσω του ξυλώματος (Gupta et al. 2013). Ο μόλυβδος που παραμένει στα κυτταρικά τοιχώματα βρίσκεται είτε σε αδιάλυτη μορφή είτε δεσμεύεται σε ενώσεις σαν την πηκτίνη (Kopittke et al. 2008), ένα συστατικό των κυτταρικών τοιχωμάτων -σημαντικό για την άμυνα του φυτού. Όταν έρχεται σε επαφή με το μόλυβδο, σχηματίζει σύμπλοκα εμποδίζοντας την είσοδο του στην κυτταροπλασματική μεμβράνη.

Η διαμερισματοποίηση των βαρέων μετάλλων, δηλαδή η συγκράτηση τους σε πολλά διαφορετικά μέρη του φυτού, όπως στην προκειμένη περίπτωση του μολύβδου σε κυτταρικά τοιχώματα και χυμοτόπια (Gurta et al. 2013), βοηθάει στην ελαχιστοποίηση της τοξικότητας που προκαλεί ο μολύβδος και που επηρεάζει ζωτικές λειτουργίες του φυτού.

Το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από την υψηλή συγκέντρωση μολύβδου καταλήγει σε αυξημένη παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS). Το φυτό επιστρατεύει μια σειρά από αντιοξειδωτικές ουσίες, οι οποίες είναι ικανές να εντοπίσουν τις ROS και να τις εξουδετερώσουν, επαναφέροντας έτσι μια ισορροπία στις συγκεντρώσεις τους εντός του φυτικού συστήματος. Σε αυτή την κατηγορία εμπίπτουν οι αντιοξειδωτικές ουσίες:

- Ασκορβικό οξύ
- Ανηγγμένη γλουταθειόνη (GSH)
- Καροτενοειδή
- α-τοκοφερόλη

Ωστόσο πολύ σημαντικές στην περίπτωση του μολύβδου είναι η δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD), ένα μεταλλοένζυμο που καταλύει τη μετατροπή δύο υπεροξειδίων σε H_2O_2 , καθώς και η γλουταθειόνη (Mishra et al. 2006). Άλλες ουσίες με αντιοξειδωτική δράση είναι οι προλίνη, ασκορβική υπεροξειδάση (APX) και καταλάση (Poutrut et al. 2011). Η γλουταθειόνη είναι η πιο σημαντική ουσία για την αδρανοποίηση των ROS στα πλαστίδια. Ωστόσο η δράση της δεν περιορίζεται μόνο σε αυτό το κομμάτι, καθώς φαίνεται πως ενισχύει την συσσώρευση προλίνης σε φυτά που βρίσκονται υπό καταπόνηση. Ως αποτέλεσμα αυτού, μειώνεται η ζημιά στις μεμβράνες και τις πρωτεΐνες (Liu T. et al. 2009).

Τέλος, μία σημαντική κατηγορία ουσιών που εμπλέκονται στην άμυνα του φυτού και συγκεκριμένα στην από-τοξικοποίηση του μολύβδου είναι τα μόρια-συνδέτες που ενώνονται με τα βαρέα μέταλλα. Οι πιο σημαντικές ενώσεις που εμπίπτουν σε αυτή την κατηγορία είναι οι φυτοχελατίνες (phytochelatins) και οι μεταλλοθειονίνες (metallothioneins). Πρόκειται για πολυπεπτίδια ικανά να συνδεθούν με τα μέταλλα δημιουργώντας αδρανή σύμπλοκα και καθιστούν ανέφικτη τη μετακίνησή τους εντός του φυτού (Gurta et al. 2009).

1.8 Ρίγανη

Για τους σκοπούς της πτυχιακής εργασίας, ως υπό μελέτη φυτό επιλέχθηκε η ρίγανη (*Origanum vulgare* ssp). Η ρίγανη συναντάται ως αυτοφυές φυτό στη Μεσόγειο κυρίως, σε μεγάλη ποικιλία εδαφών και κλιμάτων από παραθαλάσσιες έως ορεινές περιοχές, στη νησιώτικη και την ηπειρωτική Ελλάδα, σε πλούσια και φτωγά εδάφη χάρη στη μεγάλη προσαρμοστικότητά της. Ωστόσο αναπτύσσεται κυρίως σε εδάφη ξηρικά, άγονα, σε περιοχές με υψηλές μέσες θερμοκρασίες, αποδεικνύοντας ότι πρόκειται για ένα εξαιρετικά ανθεκτικό φυτό στις καταπονήσεις.

Ένας επιπλέον λόγος που συντέλεσε στην επιλογή της ρίγανης στο παρόν πείραμα είναι ότι αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά αρωματικά φυτά που απαντώνται στην

Ελληνική γη. Παρότι πρόκειται για ένα κατεξοχήν αυτοφυές φυτό, τα τελευταία χρόνια υπάρχει μια σημαντική τάση προς τη συστηματική καλλιέργεια της, με τις αντίστοιχες εκτάσεις να έχουν αυξηθεί σημαντικά. Αναφορικά με τις χρήσεις της, χρησιμοποιείται κυρίως στη μαγειρική ως καρύκευμα, ενώ το αιθέριο έλαιο της χρησιμοποιείται στην φαρμακοβιομηχανία και στην αρωματοθεραπεία.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Γενικά

Το πείραμα διεξήχθη στον περιβάλλοντα χώρο του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος από τις αρχές Απριλίου έως και τις αρχές Ιουλίου του έτους 2017.

2.2 Πειραματικός Σχεδιασμός

Για την έναρξη του πειράματος, απαιτούνταν ποσότητα εδάφους, της τάξεως των 600kg που θα χρειαζόταν για την συνέχεια του πειράματος. Η λήψη του εδάφους έγινε από το αγρόκτημα του τμήματος στην περιοχή του Βελεστίνου, Μαγνησία. Το έδαφος απλώθηκε πάνω σε νάιλον στο εσωτερικό παρακείμενου θερμοκηπίου του αγροκτήματος, όπου και παρέμεινε για 13 ημέρες, με απώτερο στόχο την αεροζύρανση του. Στη διάρκεια αυτού του διαστήματος γίνονταν συνεχής αναμοχλεύσεις. Μετά το πέρας των 13 ημερών, το έδαφος κοσκινίστηκε ώστε να αφαιρεθούν τα μεγάλα συσσωματώματα και οι πέτρες. Εν συνεχεία το έδαφος τοποθετήθηκε σε σακούλες 40kg ώστε να μεταφερθεί στο χώρο του τμήματος της σχολής όπου και διεξήχθη το πείραμα.

Ενδιάμεσα, λίγες μέρες πριν, είχαμε προμηθευτεί τα φυτά ρίγανης τα οποία φυτεύτηκαν σε γλάστρες του μισού λίτρου, στον πάτο των οποίων είχαμε εναποθέσει περλίτη πάχους περίπου 3 cm. Η αρχική μεταφύτευση των φυτών ρίγανης σε μικρές γλάστρες απαλλαγμένες από επιμόλυνση με μόλυβδο, έγινε με σκοπό την ανάπτυξη των φυτών έως ότου φτάσουν στο κατάλληλο επίπεδο ανάπτυξης που θα μας επέτρεπε να κάνουμε την τελική μεταφύτευση στις γλάστρες με τη μεταφύτευση. Επίσης, με αυτή την πρακτική απευχθεί το μεταφυτευτικό στρες των φυτών. Σε αυτή τη φάση του πειράματος, τα φυτά ποτίζονταν περίπου ανά 3 ημέρες. Τα φυτά παρέμειναν στις μικρές αυτές γλάστρες για 1 μήνα πριν την τελική Μεταφύτευση

Στο διάστημα αυτό, έγιναν οι προετοιμασίες για την τελική μεταφύτευση των φυτών στις γλάστρες με την επιμόλυνση. Αφού είχε προαποφασιστεί κατά τον σχεδιασμό του πειράματος με τους υπεύθυνους καθηγητές ο αριθμός των μεταχειρίσεων και οι επαναλήψεις, ετοιμάστηκαν 150 γλάστρες των 2,5 lt, οι οποίες πληρώθηκαν με το έδαφος που είχε συλλεχθεί και προετοιμαστεί από την περιοχή του αγροκτήματος. Όπως και στη ‘‘μεταβατική’’ μεταφύτευση, έτσι και σε αυτή την περίπτωση, στον πάτο των γλαστρών τοποθετήθηκαν περίπου 3 cm περλίτη, αλλά και διηθητικό χαρτί.

Για την παρασκευή της επιμόλυνσης, διαλύθηκαν 192 g νιτρικού μολύβδου $Pb(NO_3)_2$ σε 2 lt νερού. Την επόμενη μέρα, έγινε η επιμόλυνση του εδάφους στις 100 από τις 150 γλάστρες που είχαμε ετοιμάσει, Με βάση το παραπάνω λοιπόν, γίνεται κατανοητό ότι έγινε διαχωρισμός σε μεταχειρίσεις, με τον τρόπο που φαίνεται στον πίνακα που ακολουθεί:

Μεταχ. 1^η: Καμία επιμόλυνση	Μεταχ. 2^η: 300ppm Pb	Μεταχ. 3^η: 900ppm Pb
<i>Control</i>	<i>M1</i>	<i>M2</i>

Συνεπώς, όπως φαίνεται από τον παραπάνω πίνακα, έγινε διαχωρισμός σε τρεις μεταχειρίσεις για τις οποίες ισχύουν τα παρακάτω δεδομένα:

- Κάθε μεταχείριση είχε 50 επαναλήψεις (50 γλάστρες)
- Οι μεταχειρίσεις δέχθηκαν τις ακόλουθες ποσότητες επιμόλυνσης
 - Control (ο μάρτυρας): δεν δέχθηκε ποσότητα επιμόλυνσης
 - M1: δέχθηκε 10 ml επιμόλυνσης ανά γλάστρα
 - M2: δέχθηκε 30 ml επιμόλυνσης ανά γλάστρα
- Από τις 50 γλάστρες της κάθε μεταχείρισης, επιλέχθηκαν με τυχαίο τρόπο 10 γλάστρες οι οποίες θα αξιοποιούνταν αποκλειστικά για τις φυτοκομικές και φυσιολογικές μετρήσεις που είχαν προγραμματιστεί να γίνουν στη συνέχεια του πειράματος, έτσι ώστε να υπάρχει ένα σημείο αναφοράς και να εξετάζεται η πρόοδος του κάθε φυτού.



Εικόνα 4: Τρεις μεταχειρίσεις: Control, M1, M2 (από μπροστά προς το βάθος της φωτογραφίας)

Στη διάρκεια του πειράματος και την παραμονή των φυτών στις γλάστρες, έγιναν μετρήσεις με τη χρήση οργάνου SPAD για τη χλωροφύλλη, καθώς και μετρήσεις με τη χρήση οργάνου Handy PEA για το φθορισμό της χλωροφύλλης, τα οποία όμως θα αναλυθούν παρακάτω με περισσότερη λεπτομέρεια.



Εικόνα 5: Η εικόνα των φυτών στις 12-5-2017 στις 3 μεταχειρίσεις. Από αριστερά προς τα δεξιά M2, M1, Control

2.3 Μετρήσεις-Αναλύσεις

2.3.1 Μετρήσεις επι τόπου

Στη διάρκεια του πειράματος, πάρθηκαν μετρήσεις επι τόπου στο περιβάλλοντα χώρο της σχολής. Αυτές αφορούσαν μετρήσεις για τη χλωροφύλλη και το φθορισμό της χλωροφύλλης.

Για τη χλωροφύλλη, οι μετρήσεις έγιναν με τη χρήση οργάνου SPAD (κατασκευάστρια εταιρείας: Minolta) (Εικόνα 4), ωστόσο λόγω της δυσκολίας που παρουσιάστηκε στην λήψη των μετρήσεων λόγω του μικρού μεγέθους των φύλλων της

ρίγανης, οι μετρήσεις κρίθηκαν επίσης αναξιόπιστες και δεν συνεχίστηκαν καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, παρά μόνο λίγες που πάρθηκαν στην αρχή του πειράματος.



Εικόνα 6: Όργανο μέτρησης SPAD-502 για μέτρηση χλωροφύλλης στα φύλλα

Οι μετρήσεις ωστόσο για το φθορισμό της χλωροφύλλης έγιναν κανονικά και επιτόπου στο χώρο της σχολής. Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το προαναφερόμενο Handy PEA (κατασκευάστρια εταιρεία: Hansatech). Συνολικά έγιναν 3 μετρήσεις με τη χρήση του οργάνου Handy PEA (Εικόνα 3).



Εικόνα 7: Όργανο μέτρησης φθορισμού χλωροφύλλης Handy PEA

Οι μετρήσεις πραγματοποιούνταν μεταξύ 5:30 με 7:00 π.μ., με το επίπεδο της ηλιακής ακτινοβολίας να είναι το χαμηλότερο δυνατό. Πραγματοποιούντα κάθε φορά 12 μετρήσεις ανά μεταχείριση = 36 μετρήσεις στο σύνολο τους.

Η μέτρηση με το Handy PEA ακολουθεί την εξής διαδικασία: Τοποθετείτε ένα ειδικό μανταλάκι σε ένα φύλλο κάθε γλάστρας (σε δυό από τις γλάστρες κάθε μεταχείρισης τοποθετήθηκαν δύο μανταλάκια) (Εικόνα 4). Τα φύλλα πρέπει να είναι σχετικά μεγάλα σε μέγεθος- ώστε να μπορεί να πιάσει και να στερεωθεί σφιχτά πάνω τους το μανταλάκι του οργάνου. Τα φύλλα που επιλέγονται για τη μέτρηση πρέπει να είναι ‘πράσινα’, να βρίσκονται στο ύψος κοντα μέση του βλαστού. Το μανταλάκι πρέπει να τοποθετείτε -όσο είναι δυνατόν- με τρόπο τέτοιο ώστε, η υποδοχή που διαθέτει για τον αισθητήρα να βρίσκεται στο κέντρο του φύλλου. Η υποδοχή διαθέτει σύρτη που ανοίγει/κλείνει για την κάλυψη της. Καθ’ότι πριν την μέτρηση το κάθε φύλλο πρέπει να είναι προσκοτινιασμένο για περίπου 30 λεπτά, κατά την τοποθέτηση του μανταλακίου στο φύλλο, πρέπει να είναι βέβαιο ότι ο σύρτης παραμένει κλειστό, ώστε να διασφαλιστεί μια έγκυρο, αξιόπιστη μέτρηση.



Εικόνα 8: Ειδικά μανταλάκια οργάνου μέτρησης Handy-PEA τοποθετημένα επάνω στα φύλλα του φυτού της ρίγανης

Με το πέρας μισής ώρας, τοποθετείται ο αισθητήρας του οργάνου επάνω στο μανταλάκι στην ειδική υποδοχή που διαθέτει, αφού πρώτα έχει ανοίξει ο σύρτης, και γίνεται η λήψη των μετρήσεων τις οποίες το μηχάνημα καταγράφει στη μνήμη του. Αργότερα, μέσω ειδικού λογισμικού του οργάνου για τον υπολογιστή, γίνεται η ανάκτηση των δεδομένων προς αποθήκευση και εν συνεχεία επεξεργασία τους και στατιστική τους ανάλυση.

2.3.2 Αναλύσεις στο εργαστήριο

Αφού οι μετρήσεις που λήφθηκαν με το όργανο SPAD κρίθηκαν αναξιόπιστες, οι μετρήσεις για τις χλωροφύλλες έγιναν στο εξής στο εργαστήριο. Για την μέτρηση των χλωροφυλλών στο εργαστήριο, επιλέχθηκαν πέντε φυτά από κάθε μεταχείριση -από τα δέκα προς μελέτη φυτά που είχαμε διαλέξει στην αρχή του πειράματος- φυτά καλά ανεπτυγμένα, σε καλή κατάσταση, με καλά ανεπτυγμένα και σε καλή κατάσταση φύλλα, φυσικά ενόσω τα φυτά βρίσκονταν ακόμα στις γλάστρες. Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 4 μετρήσεις στο εργαστήριο, ανά διάστημα δεκαπέντε ημερών.

Από κάθε φυτό διαλέγονταν δύο φύλλα από τα οποία με φυλλοτρυπητήρα στάνταρ διαμέτρου παίρναμε τμήμα τους, το οποίο εν συνεχεία κονιορτοποιούνταν σε γουδί με τη

βοήθεια κετόνης και ανθρακικού ασβεστίου (CaCO_3). Ακολουθεί φυγοκέντρωση προς διαχωρισμό του υπερκείμενου από το ίζημα, ογκομέτρηση του υπερκείμενου σε ογκομετρικό σωλήνα και εν τέλει φωτομέτρηση με τη χρήση φασματόμετρου. Ο υπολογισμός των χλωροφυλλών έγινε με πρότυπο καμπύλη.

Στο εργαστήριο επίσης έγιναν αναλύσεις για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών, ακολουθώντας την μέθοδο των Waterman & Mole (1994) με τη χρήση του αντιδραστήριου Folin-Ciocalteu. Από το αντιδραστήριο χρησιμοποιήθηκαν 0,25 ml/δείγμα, ενώ τα υπόλοιπα υλικά που χρειάστηκαν ήταν Μεθανόλη σε ποσότητα 6 ml/δείγμα, και διάλυμα Na_2CO_3 (ανθρακικό νάτριο), 0,75 ml/δείγμα. Εδώ, να σημειωθεί ότι είναι μεζόνος σημασίας το αντιδραστήριο να είναι προστατευμένο από το φως.

Η διαδικασία ξεκινάει με το ζύγισμα 250 mg κονιορτοποιημένου ξηρού δείγματος και κατόπιν η τοποθέτηση τους σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες με πάμα. Στον εκάστοτε σωλήνα προστίθενται από 6 ml υδατικού διαλύματος μεθανόλης 50%. Τα σωληνάκια σφραγίζονται και τοποθετούνται σε υδατόλουτρο, όπου επωάζουν για 1h στους 40 °C υπό ήπια ανάδευση.

Σε μεγαλύτερους δοκιμαστικούς σωλήνες, προστίθενται 3,95 ml απιονισμένου νερού, μαζί με 0,25 ml του αντιδραστήριου Folin-Ciocalteu καθώς και 0,05 ml το υπερκείμενου, το οποίο ωστόσο πριν είχε διηθηθεί μέσω χωνιού και είχε τοποθετηθεί σε μικρότερους γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες. Στο τυφλό δείγμα είχε γίνει αντικατάσταση των 0,05 ml του υπερκείμενου με 0,05 ml υδατικού διαλύματος μεθανόλης 50%.

Ακολουθήσε Vortex στους δοκιμαστικούς σωλήνες για καλύτερη και ομοιόμορφη ανάδευση και με το πέρας 1-8min έγινε η προσθήκη 0,75 ml Na_2CO_3 . Κατόπιν, εκ νέου ανάδευση του δείγματος με τη χρήση Vortex και επώαση των δειγμάτων σε συνθήκες δωματίου για διάστημα 2h, με ενδιάμεσες αναδεύσεις στο Vortex κάθε 20 min. Εν τέλει, έγινε η φωτομέτρηση των διαλυμάτων σε μήκος κύματος 760nm. Ο υπολογισμός των ολικών φαινολικών έγινε με βάση καμπύλη αναφοράς.

Επόμενη ανάλυση που έγινε στο εργαστήριο, ήταν ο προσδιορισμός της προλίνης με τη μέθοδος όξινης νινυδρίνης των Khan et al. (2000). Αυτό αποτελεί μια τροποποιημένη εκδοχή της μεθόδου που είχαν προτείνει αρχικά οι Bates et al. (1997).

Για την διαδικασία, απαιτήθηκαν: 3% σουλφοσαλικικό 10 ml/δείγμα, CH_3COOH (οξικό οξύ) 2ml/δείγμα, C_7H_8 (Τολουόλιο) 4 ml/δείγμα, ποσότητα πάγου, και το διάλυμα όξινης νινυδρίνης το οποίο αποτελείτο από: 1.25 g νινυδρίνης, 30 ml CH_3COOH , 20 ml 6M H_3PO_4 (ορθοφωσφορικό οξύ). Για την παρασκευή του διαλύματος έγινε αρχικά ανάδευση, και στη συνέχεια ελαφριά θέρμανση ενώ το διάλυμα ήταν καλυμμένο με αλουμινόχαρτο για την προστασία του από το φως

Πριν την εκκίνηση της διαδικασίας, μπήκε σε λειτουργία το υδατόλουτρο στους 100 °C, ώστε να έχει πιάσει την απαιτούμενη θερμοκρασία μέχρι τη στιγμή που θα χρειαστεί.

Αρχικά, ζυγίστηκαν 350 mg νωπού δείγματος, εκχυλίστηκαν με 3% σουλφοσαλκυκικό φτάνοντας σε τελικό όγκο τα 10 ml ανά σωλήνα φυγοκέντρωσης, οι οποίοι σφραγίστηκαν και με πάμα. Ακολούθησε φυγοκέντρωση στα 4000g για 10' και κατόπιν μεταφορά του υπερκείμενου σε μικρούς γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες. Στους μικρούς σωλήνες που χρησιμοποιήθηκαν για τη φυγοκέντρωση, προστίθενται 2 ml εκχυλίσματος, 2 ml αντιδραστηρίου όξινης νινυδρίνης και 2 ml CH₃COOH. Οι σωλήνες σφραγίζονται και επωάζουν στο υδατόλουτρο, το οποίο είχε ετοιμαστεί στην αρχή, για 1h. Στο διάστημα αυτό, γίνονται και κάποιες αναδεύσεις με vortex. Αμέσως μετά το πέρας της 1h, οι σωλήνες μεταφέρονται σε πάγο. Εν συνεχεία, το περιεχόμενο των σωλήνων μεταφέρεται σε μεγάλους δοκιμαστικούς, όπου προστίθεται με ιδιαίτερη προσοχή 4 ml C₇H₈ (Τουλιόλιο) και αναδεύονται για 15sec. Ακολουθεί ο διαχωρισμός των φάσεων. Το χρωμοφόρο (αν περιέχει προλίνη) το οποίο περιέχει Τολουόλιο, διαχωρίζεται από την υδατική φάση του διαλύματος και πηγαίνει προς τα επάνω. Τέλος, το υπερκείμενο παραλαμβάνεται και μετριέται η απορρόφηση σε μήκος κύματος 520 nm, με τυφλό τουλιόλιο. Η συγκέντρωση της προλίνης υπολογίζεται μέσω πρότυπης καμπύλης αναφοράς.

2.3.4 Μετρήσεις στο εργαστήριο

Ενώ τα φυτά βρίσκονταν στην πλήρη άνθηση, αφαιρέθηκε το υπέργειο τμήμα τους από τα φυτά όλων των μεταχειρίσεων. Από τις 10 γλάστρες που είχαν επιλεγεί στην αρχή του πειράματος, ζυγίστηκε το υπέργειο τμήμα για το νωπό τους βάρος, και στη συνέχεια τοποθετήθηκε για 48h σε φούρνο ξήρανσης στους 70 °C. Μετά από 48h, τα φυτά βγήκαν από το φούρνο ξήρανσης του εργαστηρίου, και ζυγίστηκαν εκ νέου προς καταγραφή του ξηρού του βάρους αυτή τη φορά, το οποίο καταγράφηκε και υπολογίστηκε η διαφορά τους.

Οι ρίζες των φυτών των οποίων αφαιρέθηκε το υπέργειο τμήμα, καθαρίστηκαν μεθοδικά από το έδαφος της γλάστρας και τοποθετήθηκαν με τη σειρά τους και αυτές σε φούρνο ξήρανσης για 48h στους 70 °C. Για να γίνει ευκολότερα το καθάρισμα των ριζών από το έδαφος, οι ρίζες τοποθετήθηκαν σε διάλυμα αλατόνευρου, με περιεκτικότητά 13%, για μία ημέρα. Όταν βγήκαν από το φούρνο έγινε η καταγραφή του βάρους τους

Στο τέλος κάθε φυτό κονιοροποιήθηκε σε μύλο άλεσης και τοποθετήθηκε σε χάρτινες σακούλες.

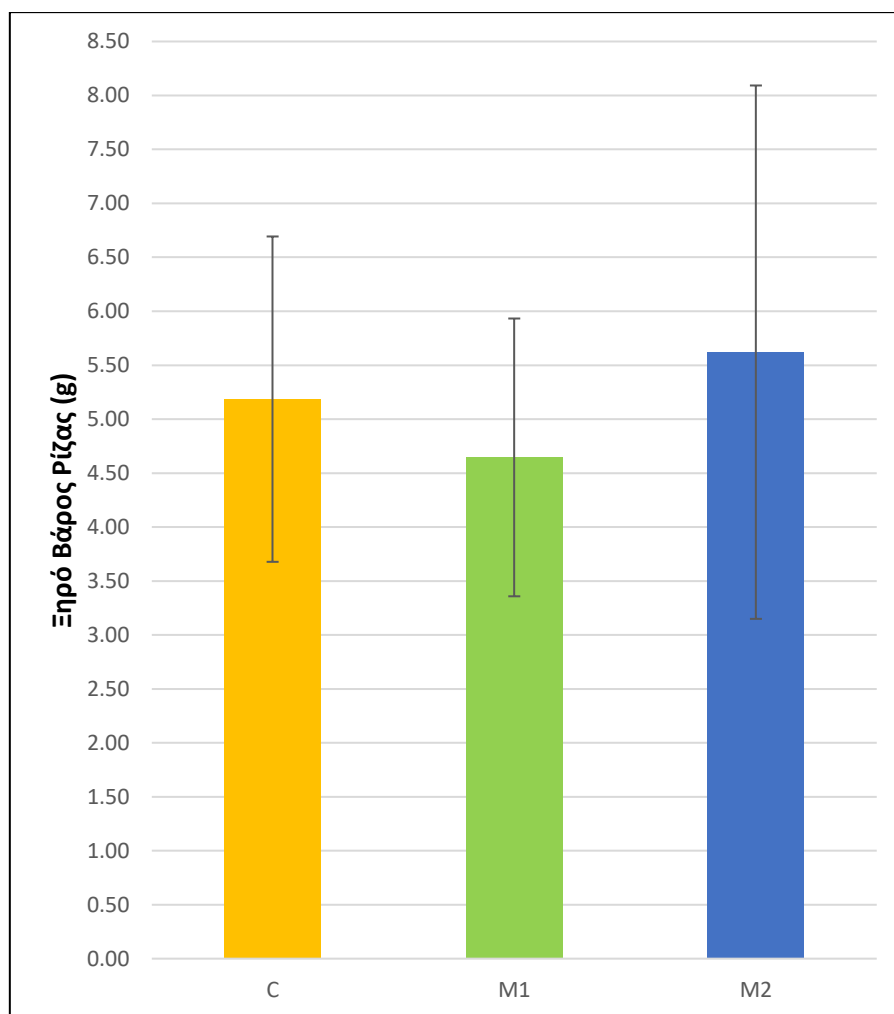
2.4 Στατιστική επεξεργασία των δεδομένων

Όλα τα δεδομένα που καταγράφηκαν κατά τη διάρκεια των αναλύσεων και των μετρήσεων, τόσο επιτόπου στο σημείο διεξαγωγής του πειράματος όσο και στο εργαστήριο, περάστηκαν σε αρχεία ηλεκτρονικής μορφής του προγράμματος Microsoft Office Excel 2016. Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων έγινε με τη χρήση του λογισμικού στατιστικού πακέτου ανάλυσης δεδομένων IBM SPSS Statistics version 25 σε λειτουργικό σύστημα Windows 10. Η επεξεργασία των δεδομένων προς έλεγχο στατιστικά σημαντικών

διαφορών έγινε με τη χρήση One-Way ANOVA και LSD σε ότι αφορά τα post-hoc tests, με το επίπεδο σημαντικότητας ορισμένο στο $p < 0.05$.

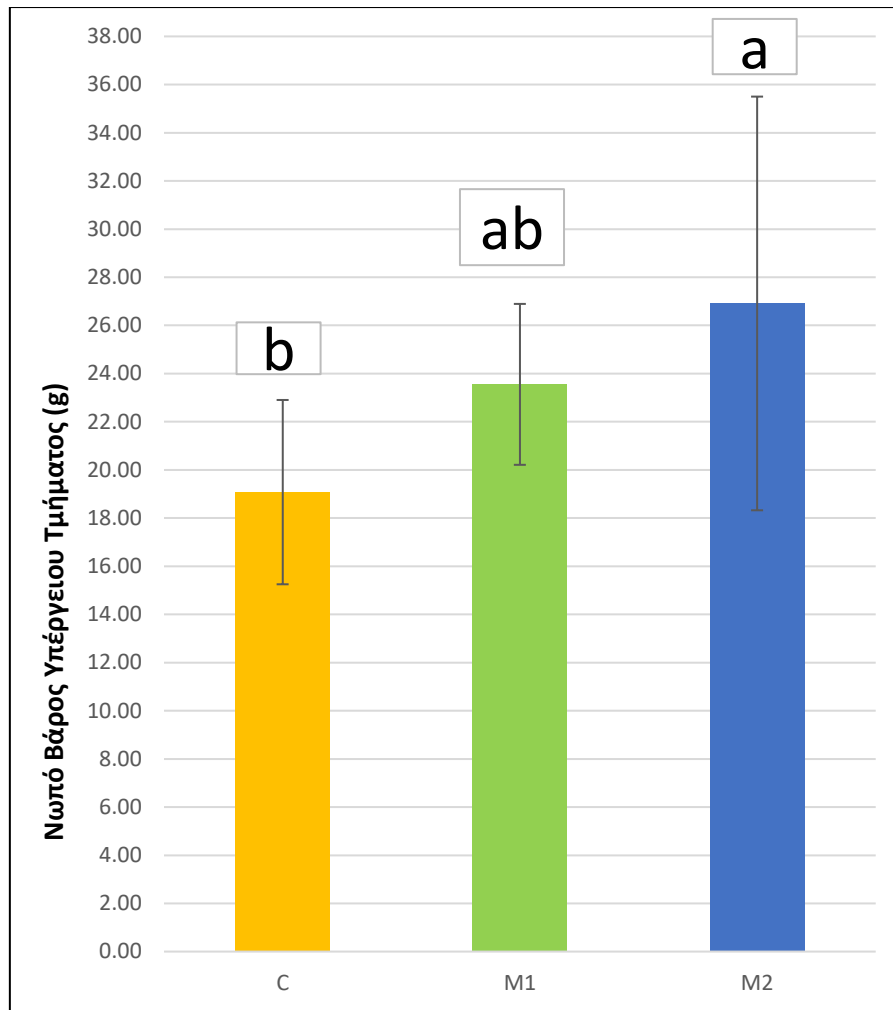
3.Αποτελέσματα

Παρακάτω παρατίθενται τα αποτελέσματα των πειραμάτων από την επιμόλυνση του εδάφους με Pb για τις μεταχειρίσεις M1 και M2 καθώς και της μεταχείρισης μάρτυρα (C), η οποία δεν δέχθηκε επιμόλυνση.



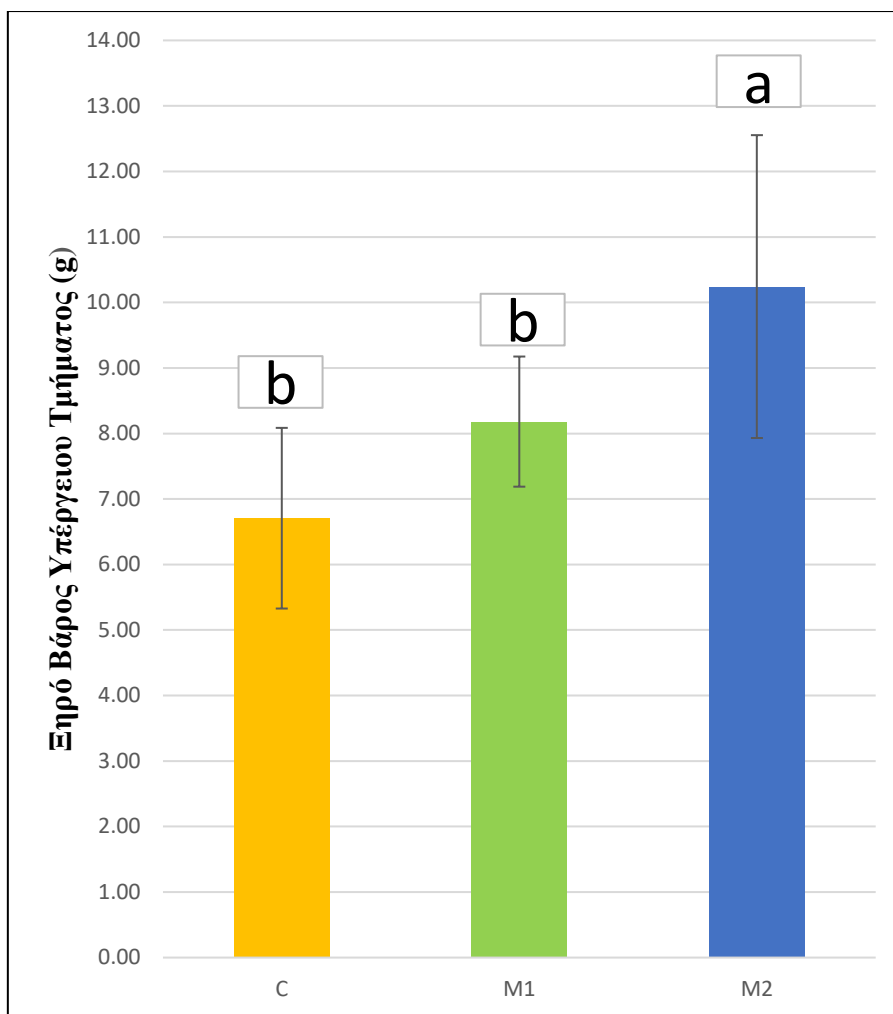
Γράφημα 1: Μέτρηση του ξηρού βάρους της ρίζας των φυτών της κάθε μεταχείρισης (M.O. ± SD)

Το ξηρό βάρος της ρίζας των φυτών των διαφορετικών μεταχειρίσεων, δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές.



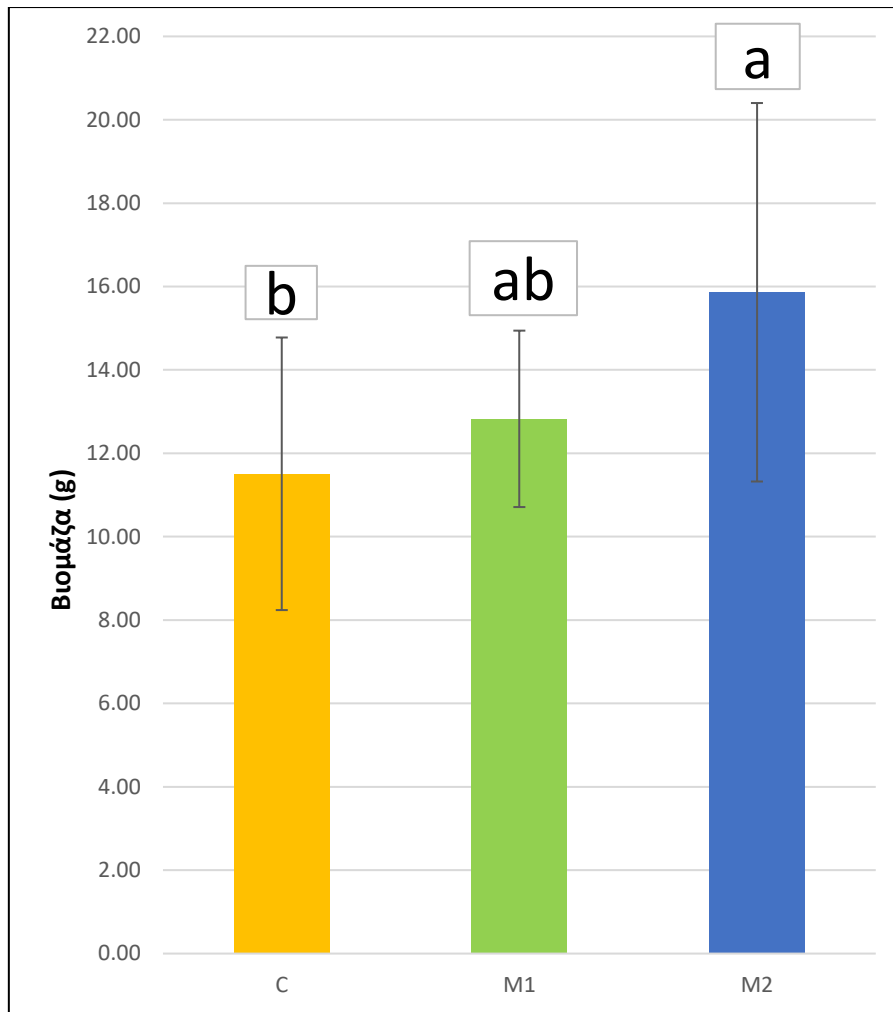
Γράφημα 2: Μέτρηση του νωπού βάρους του υπέργειου τμήματος των φυτών της κάθε μεταχείρισης (Μ.Ο. ± SD). Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές υποδεικνύονται από τα διαφορετικά γράμματα ($p < 0,05$)

Το νωπό βάρος του υπέργειου τμήματος των φυτών μεταξύ των μεταχειρίσεων C και M2 παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές. Το υπέργειο μέρος των φυτών της μεταχείρισης C ήταν σημαντικά μικρότερο από αυτό της M2, και συνολικά το μικρότερο από όλες τις μεταχειρίσεις.



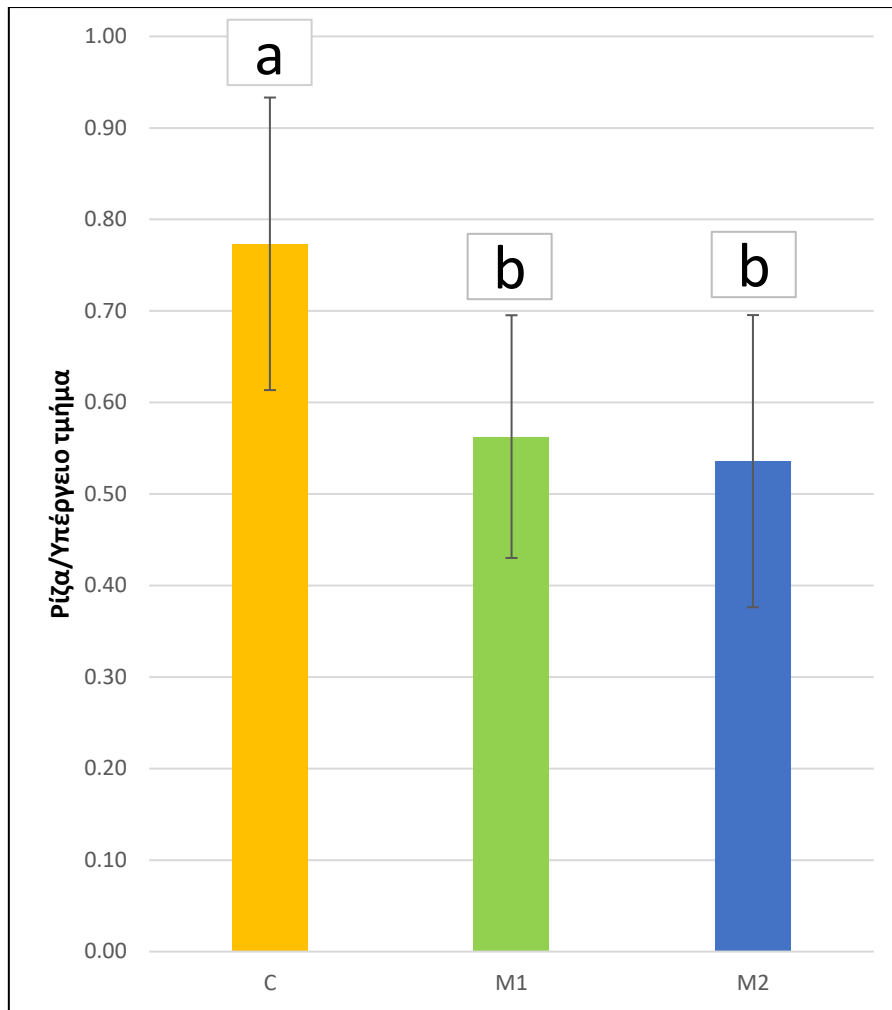
Γράφημα 3: Μέτρηση του ξηρού βάρους του υπέργειου τμήματος των φυτών της κάθε μεταχείρισης (Μ.Ο. ± SD). Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές υποδεικνύονται από τα διαφορετικά γράμματα ($p < 0,05$)

Το ξηρό βάρος του υπέργειου τμήματος των φυτών των μεταχειρίσεων C και M1 παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές με τα φυτά της μεταχείρισης M2. Τα φυτά της μεταχείρισης C είχαν το μικρότερο ξηρό βάρος. Αποτελούσαν τα φυτά “μάρτυρα” και το έδαφος που αναπτύσσονταν δεν είχε δεχθεί επιμόλυνση με μόλυβδο.



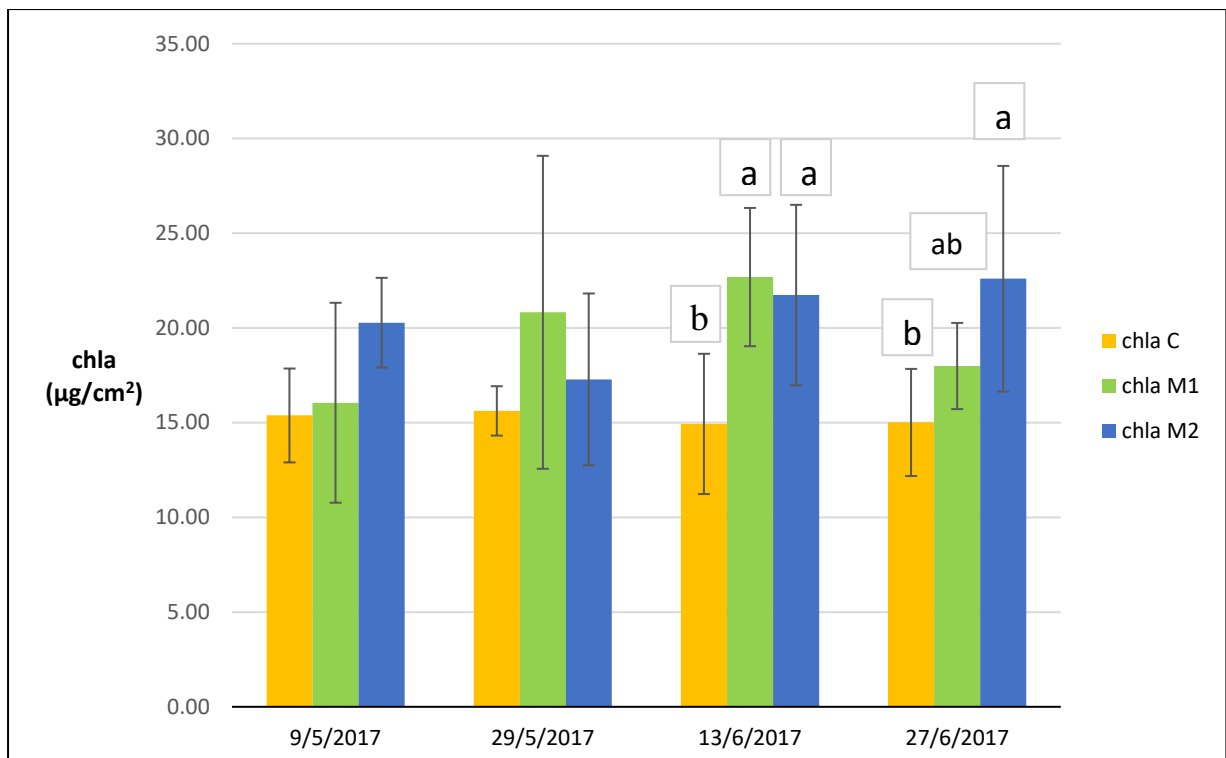
Γράφημα 4: Μέτρηση της βιομάζας των φυτών ανά μεταχείριση (Μ.Ο. ± SD). Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές υποδεικνύονται από τα διαφορετικά γράμματα ($p < 0,05$)

Οι μεταχειρίσεις C και M2 παρουσίασαν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ως προς τη συσσώρευση βιομάζας στα φυτά. Τα φυτά της μεταχείρισης C είχαν τη μικρότερη βιομάζα από τις τρεις συνολικά μεταχειρίσεις, με τη μεταχείριση M2 να εμφανίζει το υψηλότερο μέσο όρο βιομάζας.



Γράφημα 5: Ο λόγος της ρίζας ως προς το υπέργειο τμήμα των φυτών ανά μεταχείριση (Μ.Ο. ± SD). Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές υποδεικνύονται από τα διαφορετικά γράμματα ($p < 0,05$)

Τα φυτά των μεταχειρίσεων M1 και M2 παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με τα φυτά της μεταχείρισης C, έχοντας μικρότερο λόγο ρίζας προς το υπέργειο τμήμα του φυτού. Δηλαδή η ανάπτυξη της ρίζας σε σχέση με την ανάπτυξη του βλαστού και φυλλώματος ήταν μεγαλύτερη για τα φυτά-μάρτυρες.



Γράφημα 6: Συγκεντρωτικό γράφημα των συγκεντρώσεων χλωροφύλλης a στην εκάστοτε μεταχείριση, κατά τη διάρκεια του πειράματος. (M.O. ± SD). Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές υποδεικνύονται από τα διαφορετικά γράμματα ($p < 0,05$)

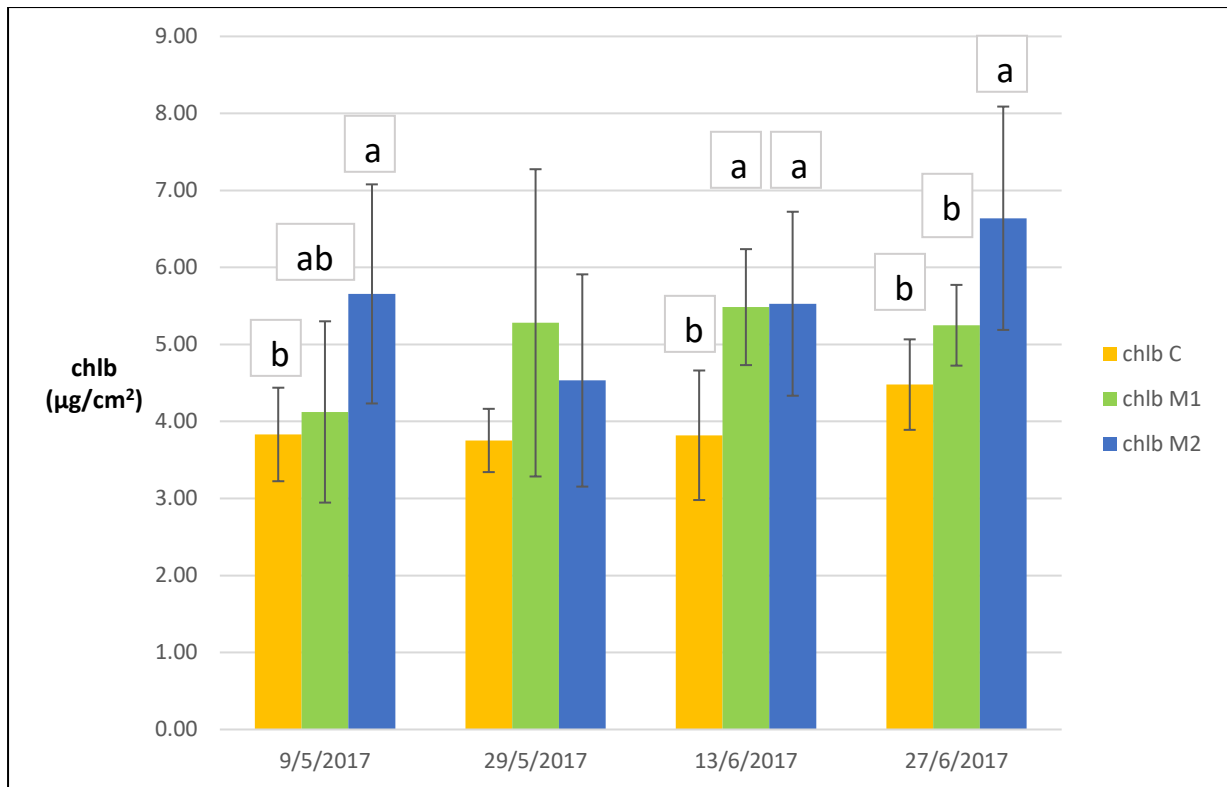
Στο άνωθεν διάγραμμα, φαίνεται η συγκέντρωση των χλωροφυλλών ανά μέτρηση και μεταχείριση στην πορεία του πειράματος.

-1^η Μέτρηση, 9/5/2017: Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις συγκεντρώσεις της χλωροφύλλης a μεταξύ των μεταχειρίσεων.

-2^η Μέτρηση, 29/5/2017: Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις συγκεντρώσεις της χλωροφύλλης a μεταξύ των μεταχειρίσεων.

-3^η Μέτρηση, 13/6/2017: Παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωση χλωροφύλλης a μεταξύ του C και των μεταχειρίσεων M1 και M2. Το C είχε στατιστικά σημαντική διαφορά από τις άλλες δύο μεταχειρίσεις που είχαν δεχθεί επιμόλυνση με μόλυβδο, και η συγκέντρωση χλωροφύλλης a στα φύλλα των φυτών της μεταχείρισης C ήταν σημαντικά μικρότερη από τις μεταχειρίσεις M1 και M2.

-4^η Μέτρηση, 27/6/2017: Παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων C και M2. Τα φυτά της μεταχείρισης C, είχαν τη μικρότερη συγκέντρωση χλωροφύλλης a, με τα φυτά της μεταχείρισης M2 να έχουν τη μεγαλύτερη συγκέντρωση από τις τρεις μεταχειρίσεις



Γράφημα 7: Συγκεντρωτικό γράφημα των συγκεντρώσεων χλωροφύλλης b στην εκάστοτε μεταχείριση, κατά τη διάρκεια του πειράματος. (M.O. ± SD). Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές υποδεικνύονται από τα διαφορετικά γράμματα ($p < 0,05$)

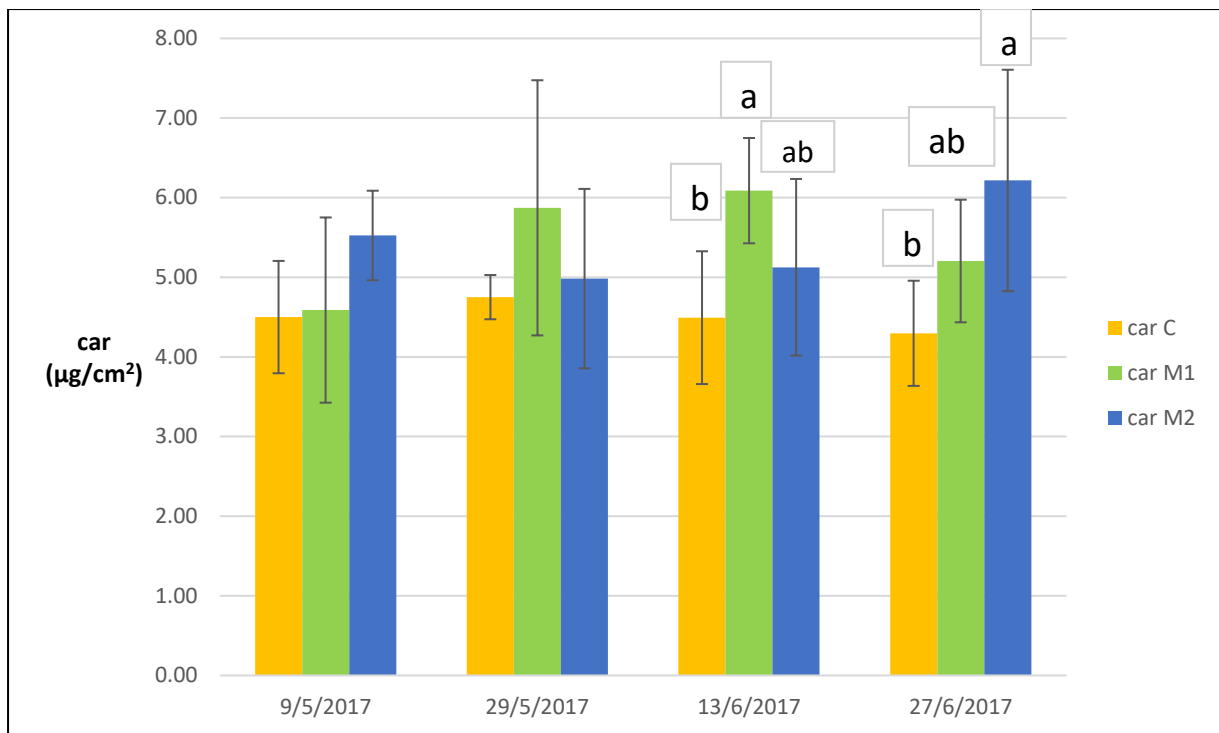
Παρατηρώντας το σχήμα 8 και με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την One-Way ANOVA και τον LSD έλεγχο, προκύπτουν τα εξής:

-1^η Μέτρηση, 9/5/2017: Υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων C και M2 στη συγκέντρωση της χλωροφύλλης b στα φύλλα των φυτών, με τη μεταχείριση C να εμφανίζει το μικρότερο μέσο όρο συγκέντρωσης χλωροφύλλης b.

-2^η Μέτρηση, 29/5/2017: Δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων.

-3^η Μέτρηση, 13/6/2017: Τα φυτά της μεταχείρισης C παρουσίασαν σημαντικά μικρότερη συγκέντρωση χλωροφύλλης b σε σχέση με τις μεταχειρίσεις M1 και M2.

-4^η Μέτρηση, 27/6/2017: Στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν μεταξύ των μεταχειρίσεων C και M2. Και εδώ, τα φυτά της μεταχείρισης C είχαν το μικρότερο μέσο όρο συγκέντρωσης χλωροφυλλών b.



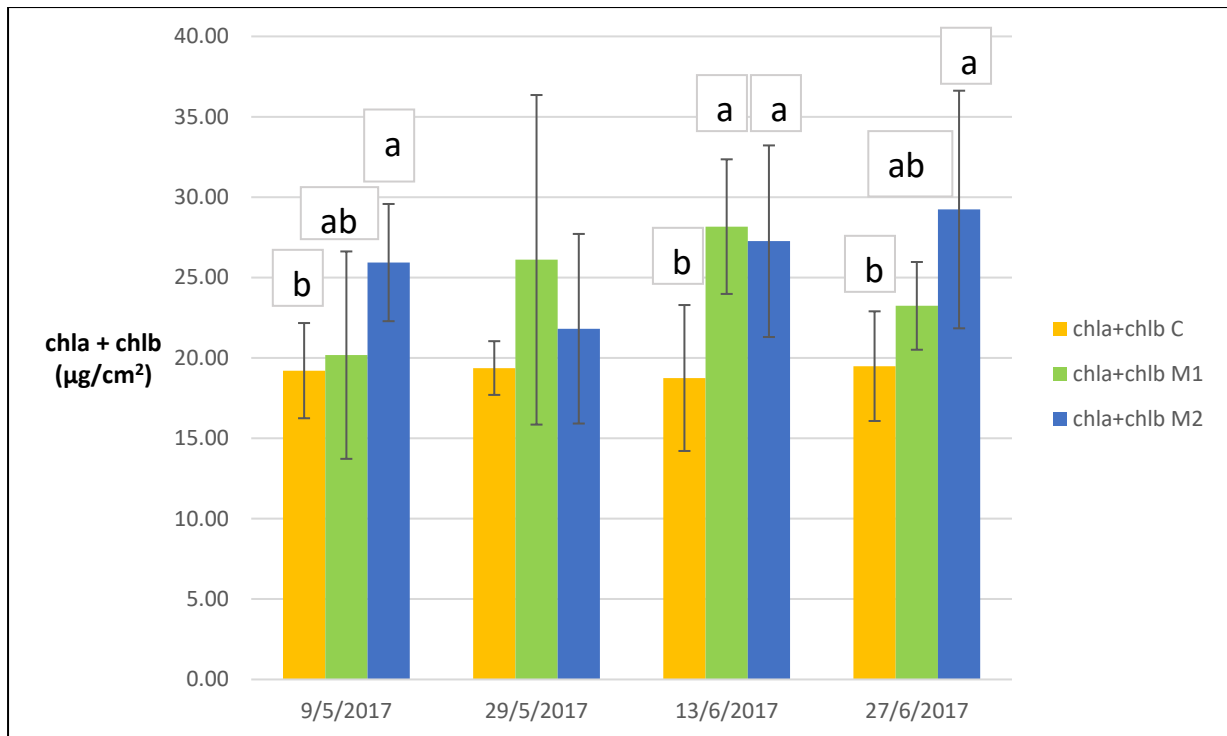
Γράφημα 8: Συγκεντρωτικό γράφημα των συγκεντρώσεων καροτενοειδών στην εκάστοτε μεταχείριση, στην πορεία του πειράματος. (Μ.Ο. ± SD). Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές υποδεικνύονται από τα διαφορετικά γράμματα ($p < 0,05$)

-1^η Μέτρηση, 9/5/2017: Δεν υπήρξαν σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωση καροτενοειδών μεταξύ των μεταχειρίσεων.

-2^η Μέτρηση, 29/5/2017: Δεν υπήρξαν σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωση καροτενοειδών μεταξύ των μεταχειρίσεων.

-3^η Μέτρηση, 13/6/2017: Οι μεταχειρίσεις C και M1 παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Η μεταχείριση C είχε μικρότερο μέσο όρο συγκέντρωσης καροτενοειδών από τις υπόλοιπες δύο, δηλαδή τις M1 και M2.

-4^η Μέτρηση, 27/6/2017: Σε αυτή την περίπτωση, σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωση καροτενοειδών παρατηρήθηκαν μεταξύ των μεταχειρίσεων C και M2. Η C είχε τη μικρότερη συγκέντρωση καροτενοειδών από τις M1 και M2 μεταχειρίσεις.



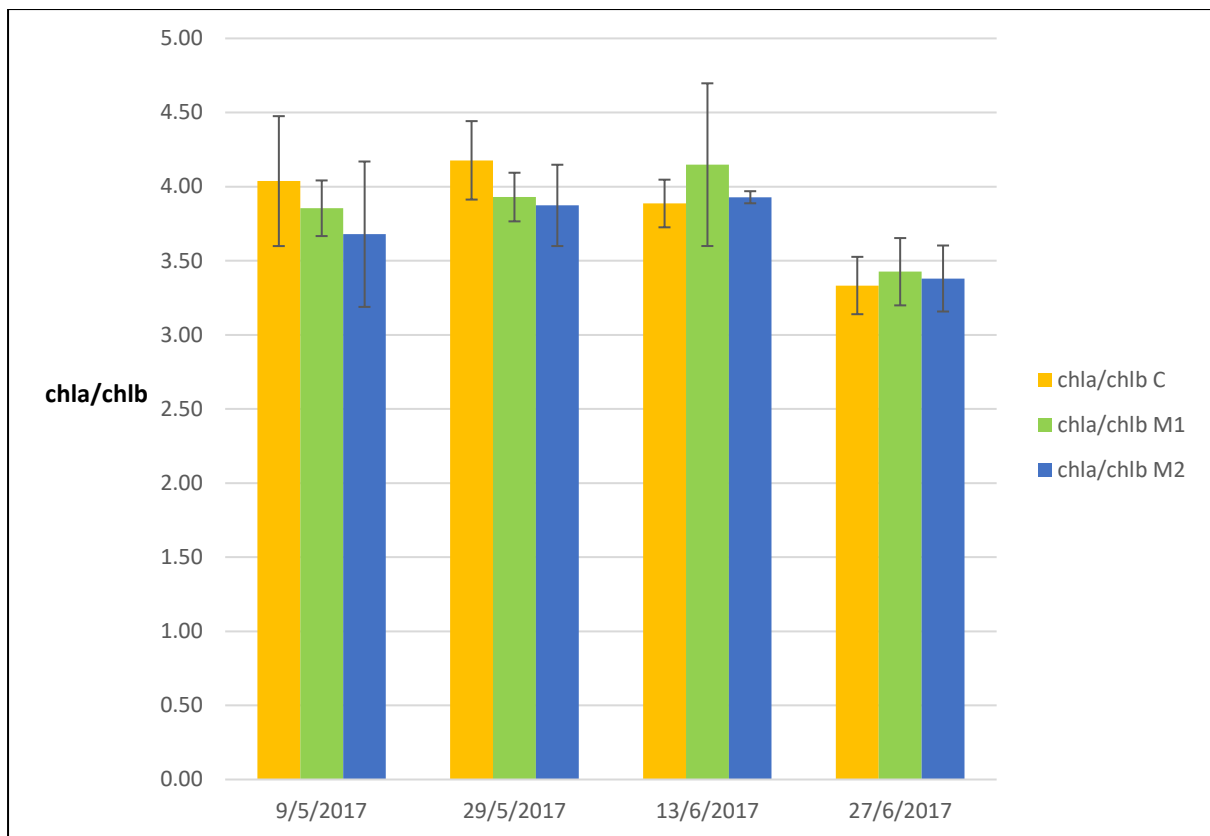
Γράφημα 9: Συγκεντρωτικό γράφημα των συγκεντρώσεων αθροιστικά χλωροφύλλης a και χλωροφύλλης b στην εκάστοτε μεταχείριση, στην πορεία του πειράματος. (Μ.Ο. ± SD). Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές υποδεικνύονται από τα διαφορετικά γράμματα ($p < 0,05$)

-1^η Μέτρηση, 9/5/2017: Η μεταχείριση C είχε το μικρότερο μέσο όρο συγκεντρώσεων των χλωροφυλλών a και b αθροιστικά, και παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές με τη μεταχείριση M2.

-2^η Μέτρηση, 29/5/2017: Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων στις συγκεντρώσεις των χλωροφυλλών a και b.

-3^η Μέτρηση, 13/6/2017: Η C μεταχείριση είχε το μικρότερο μέσο όρο συγκέντρωσης χλωροφύλλης a και b, και σημαντικά χαμηλότερη από τις συγκεντρώσεις των μεταχειρίσεων M1 και M2.

-4^η Μέτρηση, 27/6/2017: Σημαντικές διαφορές, σε επίπεδο σημαντικότητας 5%, υπήρξαν μεταξύ των μεταχειρίσεων C και M2. Έτσι τα φυτά της μεταχείρισης C (φυτά μάρτυρες) είχαν τη μικρότερη αθροιστική συγκέντρωση χλωροφυλλών a και b.



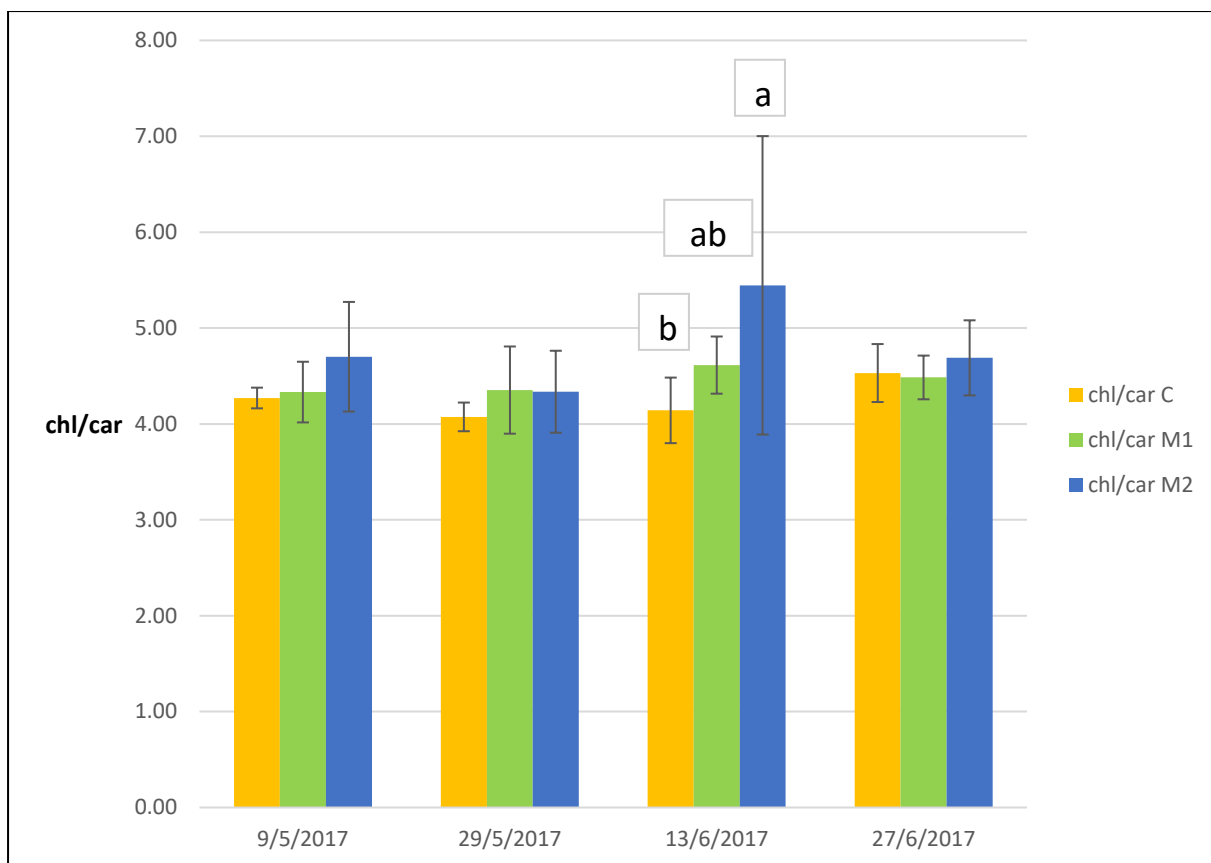
Γράφημα 6: Συγκεντρωτικό γράφημα του λόγου της συγκέντρωσης χλωροφύλλης a ως προς τη χλωροφύλλη b στην εκάστοτε μεταχείριση, κατά τη διάρκεια του πειράματος. (Μ.Ο. ± SD). Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές υποδεικνύονται από τα διαφορετικά γράμματα ($p < 0,05$)

-1^η Μέτρηση, 9/5/2017: Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων.

-2^η Μέτρηση, 29/5/2017: Στη 2^η μέτρηση επίσης δεν προέκυψαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων στο λόγο χλωροφύλλης a προς χλωροφύλλη b.

-3^η Μέτρηση, 13/6/2017: Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων.

-4^η Μέτρηση, 27/6/2017: Πρόκειται για την τελευταία μέτρηση χλωροφυλλών που έγινε, και ούτε σε αυτή την περίπτωση παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων στο λόγο χλωροφύλλης a προς χλωροφύλλη b.



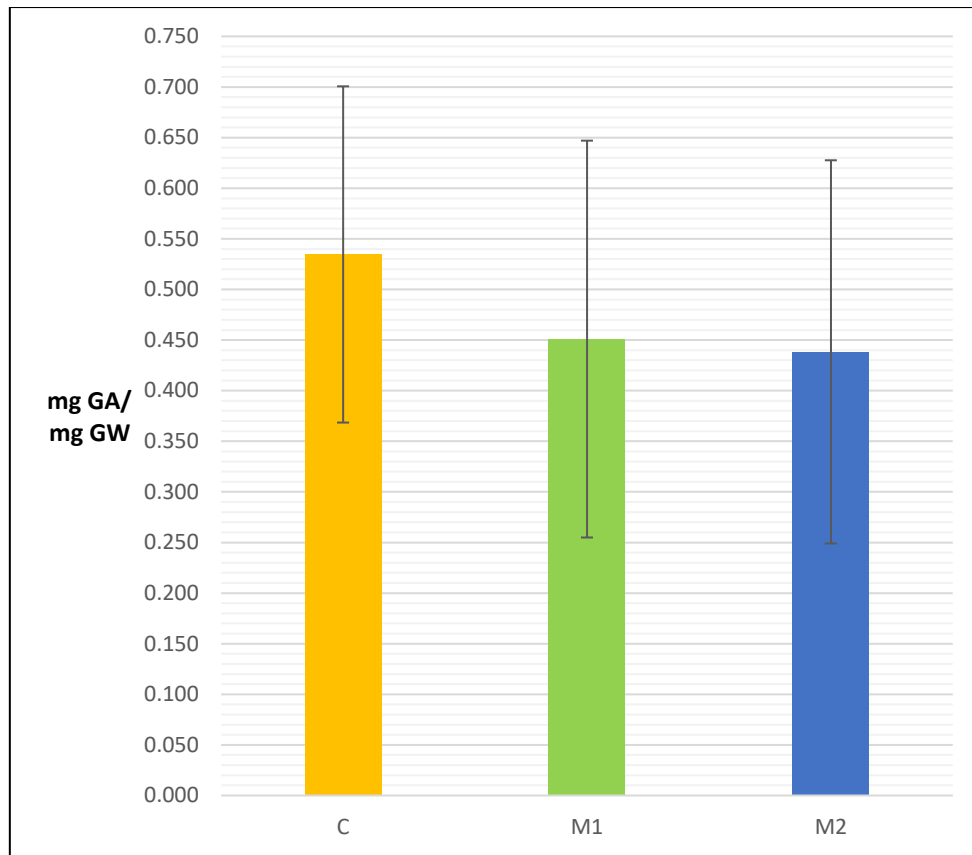
Γράφημα 7: Συγκεντρωτικό γράφημα του λόγου της συγκέντρωσης των χλωροφυλλών ως προς τα καροτενοειδή στην εκάστοτε μεταχείριση, κατά τη διάρκεια του πειράματος. (Μ.Ο. ± SD). Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές υποδεικνύονται από τα διαφορετικά γράμματα ($p < 0,05$)

-1^η Μέτρηση, 9/5/2017: Δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων στο λόγο των συγκεντρώσεων των χλωροφυλλών προς τα καροτενοειδή.

-2^η Μέτρηση, 29/5/2017: Ούτε στην 2^η μέτρηση υπήρξαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων.

-3^η Μέτρηση, 13/6/2017: Τα φυτά της μεταχείρισης C, εμφάνισαν λόγο συγκεντρώσεων χλωροφυλλών προς καροτενοειδών σημαντικά μικρότερο από τα φυτά της μεταχείρισης M2, και το μικρότερο συνολικά από τις μεταχειρίσεις.

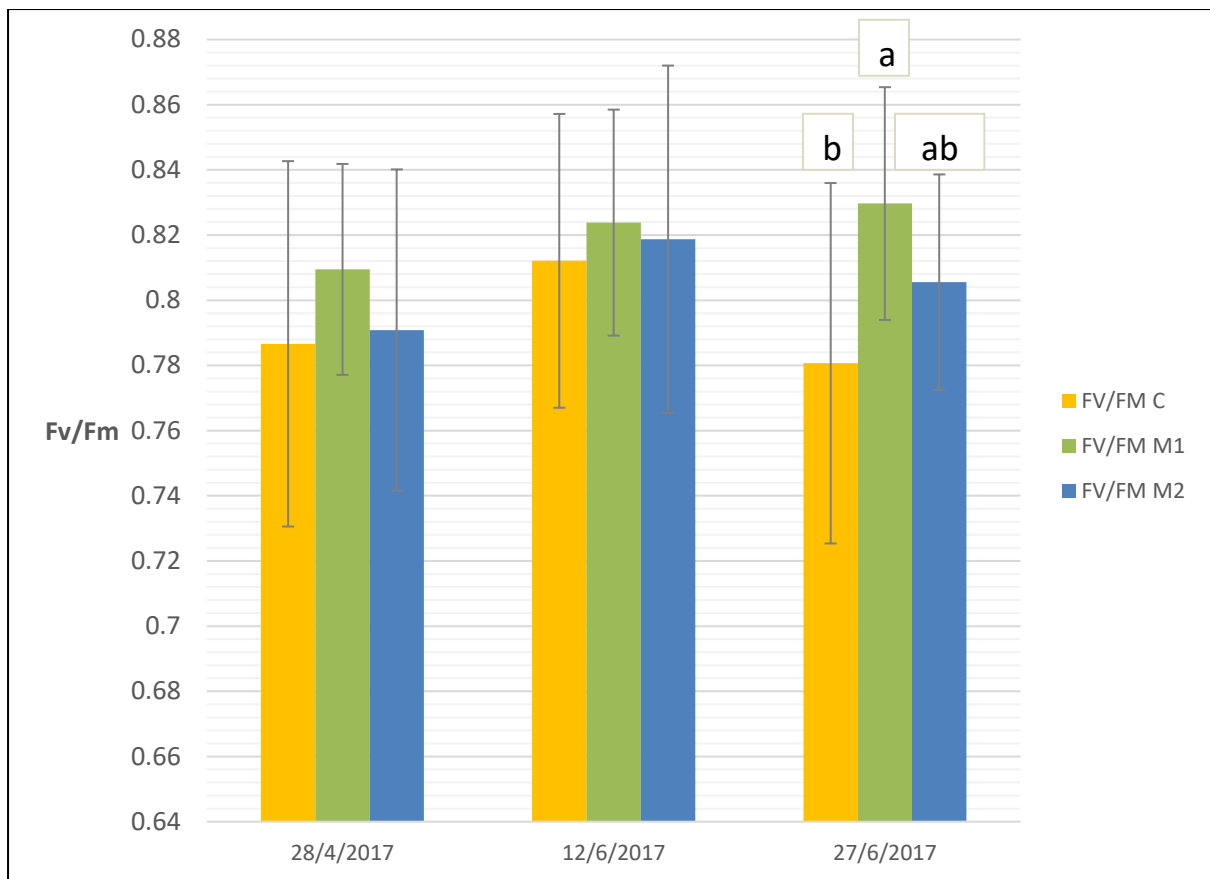
-4^η Μέτρηση, 27/6/2017: Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων.



Γράφημα 8: Ο λόγος της συγκεντρώσεων Ολικών Φαινολικών ουσιών των φύλλων ανά μεταχείριση, εκφρασμένη ως ισοδύναμα mg γαλλικού οξέος (GA) ανά g ξηρού βάρους φύλλου (M.O. ± SD). Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές υποδεικνύονται από τα διαφορετικά γράμματα ($p < 0,05$)

Η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών στις διαφορετικές μεταχειρίσεις C, M1 και M2, δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, που σημαίνει ότι η παρουσία του μόλυβδου στο έδαφος δεν ήταν αρκετή ώστε να προκαλέσει σημαντικές διαφορές.

Από τις αναλύσεις που έγιναν για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης προλίνης στο φυτό, δεν προέκυψε κάποιο αποτέλεσμα. Η ποσότητα προλίνης που βρέθηκε στα φυτά ήταν σχεδόν μηδενική.



Γράφημα 9: Συγκεντρωτικό γράφημα του φθορισμού της χλωροφύλλης a in vivo ανά μεταχείριση για κάθε μια από τις μετρήσεις που έγιναν κατά τη διάρκεια του πειράματος (M.O. ± SD). Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές υποδεικνύονται από τα διαφορετικά γράμματα ($p < 0,05$)

Σε ότι αφορά το φθορισμό της χλωροφύλλης a in vivo, κατά τις πρώτες μετρήσεις δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων. Κατά την τελευταία όμως μέτρηση του πειράματος παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ της μεταχείρισης σε C και της M1. Συνολικά η μεταχείριση C παρουσίασε μικρότερο λόγο Fv/Fm σε σχέση με τις άλλες δύο.

4. Συζήτηση

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η απόκριση της ρίγανης (*Origanum vulgare*) σε δυο διαφορετικές συγκεντρώσεις Pb στο έδαφος, στα 300ppm και 900ppm (M1 και M2 αντίστοιχα).

Το ξηρό βάρος των ριζών των μεταχειρίσεων C και M2 ήταν μεγαλύτερο από αυτό της μεταχείρισης M1, με τις ρίζες των φυτών της μεταχείρισης M2 να έχουν το μεγαλύτερο συνολικά μέσο όρο ξηρού βάρους ρίζας στα 5.62 g. Οι διαφορές ωστόσο που προέκυψαν μεταξύ των μεταχειρίσεων δεν ήταν στατιστικά σημαντικές. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν έρχονται σε αντιδιαστολή με τα αποτελέσματα ανάλογων μελετών. Οι Korittke et al. (2007) ανέφεραν μειωμένη ξηρή μάζα της ρίζας όσο αυξανόταν η συγκέντρωση του μολύβδου στο έδαφος, δουλεύοντας με τα είδη *Brachiaria decumbens* και *Chloris gayana*. Σε ανάλογα αποτελέσματα καταλήγουν και άλλες έρευνες (Pourrut et al. 2011, Fazal et al. 2015) όπου διαπιστώθηκε μειωμένη ανάπτυξη της ρίζας, εξαιτίας της μεγαλύτερης συγκέντρωσης Pb σε αυτή σε σχέση με άλλα τμήματα του φυτού (π.χ. υπέργειο τμήμα). Επίσης παρατήρησαν διόγκωση της ρίζας, δηλαδή η ρίζα ήταν πιο κοντή και εμφανίζονταν πολλές δευτερεύουσες ρίζες.

Επίσης σε αντιδιαστολή με τα αποτελέσματα άλλων ερευνών έρχονται τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, όπου ο μέσος όρος του νωπού βάρους του υπέργειου τμήματος του φυτού ήταν μεγαλύτερος στην μεταχείριση M2 η οποία είχε δεχθεί επιμόλυνση με 900ppm Pb και είχε μέσο όρο νωπού βάρους 26,91g και σημαντική στατιστική διαφορά σε σχέση με τα φυτά μάρτυρες που είχαν μέσο όρο νωπού βάρους 19,08g. Τα φυτά της μεταχείρισης M1 είχαν μέσο όρο νωπού βάρους 23,55g και δεν διέφερε σημαντικά από τις άλλες δύο μεταχειρίσεις. Όσον αφορά το ξηρό βάρος του υπέργειου τμήματος, η εικόνα είναι κάπως ανάλογη, καθώς τα φυτά της μεταχείρισης M2 παρουσίασαν το μεγαλύτερο μέσο όρο ξηρού βάρους και σημαντική στατιστική διαφορά από τις μεταχειρίσεις C και M1 οι οποίες είχαν σχεδόν ίδιο μέσο όρο ξηρού βάρους. Οι Korittke et al. (2007) και Pourrut et al. (2011), όπως και στην περίπτωση της ρίζας, έτσι και στην περίπτωση του νωπού και ξηρού βάρους του υπέργειου τμήματος είχαν παρατηρήσει μειωμένο βάρος του υπέργειου τμήματος όσο αυξανόταν η συγκέντρωση του μολύβδου. Σε συμφωνία με αυτές τις μελέτες ήταν και το πείραμα από τους Islam et al. (2007) σε φυτά του είδους *Elsholtzia argyi*, όπου στην πορεία του πειράματος εκτός των άλλων σημειώθηκε σημαντική μείωση του ξηρού και νωπού βάρους φυτών που εκτέθηκαν σε αυξημένες συγκεντρώσεις μολύβδου στο έδαφος.

Το ίδιο μοτίβο αποτελεσμάτων συνεχίζεται καθώς προχωράμε στα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μέτρηση της βιομάζας των φυτών ανά μεταχείριση, πάλι με τη μεταχείριση M2 να εμφανίζει το μεγαλύτερο Μ.Ο. βιομάζας και σημαντικά μεγαλύτερο από αυτό της μεταχείρισης C, δηλαδή του μάρτυρα, άλλα όχι σημαντικά διαφορετικό από αυτόν της μεταχείρισης M1. Οι Pourrut et al. (2011) στο πείραμα του διαπίστωσε παρεμπόδιση της ανάπτυξης σε υψηλές συγκεντρώσεις Pb, όπως και οι Islam et al. (2008).

Σε ότι αφορά το λόγο της βιομάζας της ρίζας ως προς αυτή του υπέργειου τμήματος, προκύπτει ότι είναι σημαντικά μεγαλύτερος για τα φυτά της μεταχείρισης C σε σχέση με τις μεταχειρίσεις M1 και M2. Σε αυτή την περίπτωση ωστόσο τα αποτελέσματα άλλων ερευνών (Fazal et al. 2015) είναι σε συμφωνία με τα δικά μας αποτελέσματα.

Στην περίπτωση των χλωροφυλλών a και b τα αποτελέσματα που προέκυψαν από το δικό μας πείραμα είναι σε πλήρη διαφωνία με τα αποτελέσματα ανάλογων μελετών. Γενικά ισχύει ότι η χλωροφύλλη β είναι πιο ευαίσθητη από τη χλωροφύλλη α (Pourrut et al. 2011), ενώ επηρεάζονται και οι δύο από την παρουσία μολύβδου στο υπόστρωμα, σύνθεσης σύμπτωμα της τοξικότητας μολύβδου (Liu et al. 2008). Έτσι από ανάλογες έρευνες (Pourrut et al. 2011, Mostafa et al. 2012, Fazal et al. 2015) προκύπτει μείωση της χλωροφύλλης b στις περιπτώσεις όπου η συγκέντρωση του μολύβδου είναι υψηλή. Τα δικά μας αποτελέσματα δείχνουν το ακριβώς αντίθετο. Πράγματι, η συγκέντρωση της χλωροφύλλης b στον μάρτυρα ήταν μικρότερη από τις άλλες δυο μεταχειρίσεις, M1 και M2, σε όλες σχεδόν τις μετρήσεις που έγιναν στην πορεία του πειράματος, και συνήθως με σημαντική διαφορά. Η χλωροφύλλη a φαίνεται να έχει επηρεαστεί λιγότερο από την παρουσία του μολύβδου, όπως προκύπτει και από τις υπόλοιπες μελέτες που προαναφέρθηκαν. Στην προκειμένη περίπτωση, μόνο στις δυο τελευταίες μετρήσεις προκύπτουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων αν και γενικώς αντίστοιχες τάσεις υπήρχαν και στις δύο πρώτες μετρήσεις. Και στην περίπτωση της χλωροφύλλης a τα αποτελέσματά μας είναι σε αντιδιαστολή με αυτά των υπόλοιπων μελετών (Pourrut et al. 2011, Mostafa et al. 2012, Fazal et al. 2015).

Οι συγκεντρώσεις των καροτενοειδών ακολουθούν το ίδιο πρότυπο με αυτό που παρουσιάστηκε στις χλωροφύλλες μεταξύ των διάφορων μεταχειρίσεων. Μεγαλύτερη συγκέντρωση καροτενοειδών εντοπίζεται στα φυτά των μεταχειρίσεων M1 και M2 σταθερά σε όλες τις μετρήσεις που έλαβαν χώρα, ενώ στατιστικά σημαντικές διαφορές εμφανίζονται μόνο στις δύο τελευταίες μετρήσεις. Σε ανάλογη μελέτη (Pourrut et al. 2011) προέκυψε ότι οι αυξημένες συγκεντρώσεις μολύβδου προκαλούν παρεμπόδιση στη σύνθεση των καροτενοειδών.

Εκτός των ανώτερων αποτελεσμάτων λόγος πρέπει να γίνει επίσης για την προλίνη. Στην διάρκεια του πειράματος πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις για τον προσδιορισμό της προλίνης στα φυτά της κάθε μεταχείρισης. Η ποσότητα ωστόσο προλίνης που εντοπίστηκε ήταν μηδενική. Σε αντίστοιχες μελέτες ωστόσο, τα φυτά εμφάνισαν αυξημένη συγκέντρωση προλίνης (Pourrut et al. 2011, Mostafa et al. 2012). Έχει αναφερθεί ότι σε συνθήκες στρες, τα φυτά παράγουν προλίνη ώστε να αντιμετωπίσουν τη μείωση της πίεσης σπαργής, και να αποφευχθεί η παρεμπόδιση του ανοίγματος ή κλεισίματος των στομάτων. Η απόκριση όμως αυτή είναι ειδο-ειδική και από την παρούσα εργασία φαίνεται ότι η ρίγανη δεν αντιδρά σε καταπόνηση με αύξηση των επιπέδων προλίνης στα φύλλα της.

5. Συμπεράσματα

Η παρούσα πτυχιακή εργασία, είχε ως στόχο τη μελέτη της επίδρασης του μολύβδου στο εδαφικό διάλυμα, στην ανάπτυξη και τη φυσιολογία της ρίγανης που επιλέχτηκε ως το υπό μελέτη φυτό.

Τα αποτελέσματα του πειράματος παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Παρά την ύπαρξη του μολύβδου στο εδαφικό διάλυμα, η ρίγανη φαίνεται να αποκρίνεται πολύ καλά. Τα φυτά της μεταχείρισης M2 (Μεταχείριση M2: 900ppm Pb), σε σχέση με τα φυτά της μεταχείρισης C (μάρτυρας), εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα χλωροφυλλών αλλά και καροτενοειδών, κυρίως στις μετρήσεις που έγιναν προς το τέλος του πειράματος, ενώ το ίδιο ισχύει και για χαρακτηριστικά όπως το νωπό βάρος και η βιομάζα. Η μεταχείριση M1 τείνει και αυτή να έχει αυξημένα επίπεδα των βιοχημικών χαρακτηριστικών που αναφέρθηκαν και καλύτερα αναπτυξιακά χαρακτηριστικά, χωρίς ωστόσο να διαφέρει σε μεγάλο βαθμό από τη μεταχείριση-μάρτυρα. Η καλύτερη εικόνα των φυτών των μεταχειρίσεων M1 και M2 συμπληρώνεται από τις ικανοποιητικές τιμές των παραμέτρων του φθορισμού της χλωροφύλλης *a in vivo* και την μηδενική συσσώρευση προλίνης στα φυτά που αναπτύσσονταν σε έδαφος που είχε δεχθεί επιμόλυνση μολύβδου.

Όλα τα παραπάνω μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι τα φυτά δεν υπέστησαν ιδιαίτερη καταπόνηση από την παρουσία των συγκεκριμένων συγκεντρώσεων μολύβδου στο έδαφος. Επομένως, θα μπορούσαμε να προτείνουμε τη ρίγανη ως φυτό υποψήφιο για την φυτοεξυγίανση εδαφών ρυπασμένων από μόλυβδο.

6. Βιβλιογραφία

ATSDR (2007) Agency for Toxic Substances and Disease Registry. <http://www.atsdr.cdc.gov/>

Bi X, Ren L, Gong M, He Y, Wang L, Ma Z (2010) Transfer of cadmium and lead from soil to mangoes in an uncontaminated area, Hainan Island, China. *Geoderma* 155 (12):115–120

Cecchi M, Dumat C, Alric A, Felix-Faure B, Pradere P, Guisresse M (2008) Multi-metal contamination of a calcic cambisol by fallout from a lead-recycling plant. *Geoderma* 144(12):287–298

Fazal Hadi, Tariq Aziz (2015) A Mini Review on Lead (Pb) Toxicity in Plants, *Journal of Biology and Life Science*, Vol. 6, No. 2

Gupta D, Nicoloso F, Schetinger M, Rossato L, Pereira L, Castro G, Srivastava S, Tripathi (2009) Antioxidant defense mechanism in hydroponically grown *Zea mays* seedlings under moderate lead stress. *J Hazard Mater* 172(1):479–484

Gupta, D.K., Huang, H.G. & Corpas, F.J. *Environ Sci Pollut Res* (2013) Lead tolerance in plants: strategies for phytoremediation 20: 2150

Gurijala, Hanumanth & Jasti, Pramoda. (2015). Heavy Metal Lead Influential Toxicity and its Assessment in Phytoremediating Plants - A Review. *Water, Air, and Soil Pollution*. 226.

Islam E, Yang X, Li T, Liu D, Jin X, Meng F (2007) Effect of Pb toxicity on root morphology, physiology and ultrastructure in the two ecotypes of *Elsholtzia argyi*. *Hazard Mater* 147(3):806–816

Islam E, Liu D, Li T, Yang X, Jin X, Mahmood Q, Tian S, Li J (2008) Effect of Pb toxicity on leaf growth, physiology and ultrastructure in the two ecotypes of *Elsholtzia argyi*. *J Hazard Mater* 154(1–3):914–926

Kopittke PM, Asher CJ, Kopittke RA, Menzies NW (2007) Toxic effects of Pb²⁺ on growth of cowpea (*Vigna unguiculata*). *Environ Pollut* 150(2):280–287

Kopittke PM, Asher CJ, Kopittke RA, Menzies NW (2008) Prediction of Pb speciation in concentrated and dilute nutrient solutions. *Environ Pollut* 153(3):548–554 soil. *Chemosphere* 72:157–164

Liu D, Li T, Jin X, Yang X, Islam E, Mahmood Q (2008) Lead induced changes in the growth and antioxidant metabolism of the lead accumulating and non-accumulating ecotypes of *Sedum album*. *J Integr Plant Biol* 50(2):129–140

Liu T, Liu S, Guan H, Ma L, Chen Z, Gu H (2009) Transcriptional profiling of *Arabidopsis* seedlings in response to heavy metal lead (Pb). *Environ Exp Bot* 67(2):377–386

Maestri E, Marmiroli M, Visioli G, Marmiroli N (2010) Metal tolerance and hyperaccumulation: costs and trade-offs between traits and environment. *Environ Exp Bot* 68:1–13–8, discussion 8–9

Mostafa Lamhamdi, Ouiam El Galiou, Ahmed Bakrim, Juan Carlos Novoa-Munoz, Manuel Arias-Estevez, Ahmed Aarab, Rene Lafont (2012) Effect of lead stress on mineral content and growth of wheat (*Triticum aestivum*) and spinach (*Spinacia oleracea*) seedlings. *Saudi Journal of Biological Sciences* Volume 20, Issue 1, Pages 29-36

Patra M, Bhowmik N, Bandopadhyay B, Sharma A (2004) Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. *Environ Exp Bot* 52(3):199–223

Pourrut B, Shahid M, Dumat C, Winterton P, Pinelli E. (2011) Lead Uptake, Toxicity, and Detoxification in Plants. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, Springer Verlag, 2011, vol. 213, pp. 113-136

Ζαμπετάκης Λ., Θ. Μανίος, Γ. Καρατζάς, Χατζόπουλος, Π., (2001). Βιοτεχνολογία Φυτών. Εκδόσεις Έμβρυο, Αθήνα

Μήτσιος Ι., (2004). Γονιμότητα Εδαφών. Εκδόσεις Zymel, Αθήνα, σελ.397