



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΚΑΙΝΟΤΟΜΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ
ΥΨΗΛΗΣ ΠΡΟΣΤΙΘΕΜΕΝΗΣ ΑΞΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ:

Διερεύνηση της κινητικότητας του μόλυβδου στο έδαφος και της πρόσληψης του από φυτά μαρουλιού
(*Lactuca sativa*) και η επίδραση της χρήσης του βιοεξανθρακώματος (biochar) ως μέσου
αποκατάστασης

Χριστοφή Εμμανουέλα

Βόλος, 2021

Copyright © Εμμανουέλα Χριστοφή, 2021.

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας διατριβής, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης.

Η έγκριση της Μεταπτυχιακής Διατριβής Ειδίκευσης από το Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δε δηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα.

Τριμελής επιτροπή επίβλεψης

- Αντωνιάδη Βασίλειος (Αναπληρωτής Καθηγητής, Εφαρμοσμένη Εδαφολογία)
- Ντάλιας Παναγιώτης (Λειτουργός Γεωργικών Ερευνών Α', Τμήμα Φυσικοί Πόροι και Περιβάλλον, Ινστιτούτο Γεωργικών Ερευνών Κύπρου)
- Δαναλάτος Νικόλαος (Καθηγητής, Γεωργία-Οικολογία Φυτών Μεγάλης Καλλιέργειας)

Ευχαριστίες:

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Αντωνιάδης Βασίλειος, για την καθοδήγηση, την στήριξη και την υπομονή του, καθ' όλη την διάρκεια της διεκπεραίωσης της μεταπτυχιακής εργασίας. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον συνεπιβλέποντα μου στην Κύπρο κ. Παναγιώτη Ντάλια, Λειτουργό Γεωργικών Ερευνών Α' του Τμήματος Φυσικοί Πόροι και Περιβάλλον στο Ινστιτούτο Γεωργικών Ερευνών Κύπρου για την καθοδήγηση, στήριξη και την υπομονή του, καθ' όλη την διάρκεια της διεκπεραίωσης της εργασίας. Ευχαριστώ επίσης τον κ. Δαναλάτο Νικόλαο για την στήριξη και προσφορά του για την διεκπεραίωσης της μεταπτυχιακής εργασίας.

διεκπεραίωσης της μεταπτυχιακής εργασίας. Από το Ινστιτούτο γεωργικών ερευνών ευχαριστώ επίσης τον κ. Αναστάση Χρίστου, Λειτουργό Γεωργικών Ερευνών Α' του Τμήματος Φυσικοί Πόροι και Περιβάλλον για την καθοδήγηση και την στήριξη του για την διεκπεραίωση της διατριβής καθώς και τον κ. Χατζηστερκώτη Ελευθέριο, Λειτουργό Περιβάλλοντος.

Από το γενικό χημείο του κράτους ευχαριστώ τους χημικούς Ελένη Δημητρίου, Σοφία Κοζάκου, Μαρία Χριστοφίδου, Νίκο Μιχαήλ, Χρυστάλλα Χαραλάμπους, Μηλίτσα Χατζηγεωργίου, Ευτυχία Χρίστου, Δημήτρη Στεφανή και Ευαγγελία Χριστοφόρου.

Από το Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο Κύπρου (ΤΕΠΑΚ) ευχαριστώ τον κ. Φωτόπουλο Βασίλη, Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Γεωπονικών Επιστημών, Βιοτεχνολογίας και Επιστήμης Τροφίμων και τους διδακτορικούς φοιτητές Αντρέα Ιωάννου, Αλέξανδρο Σπανό για την συνεργασία και καθοδήγηση τους.

Ευχαριστώ γενικά το Ινστιτούτο Γεωργικών Ερευνών, το Γενικό Χημείο της Κύπρου και το Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο Κύπρου (ΤΕΠΑΚ) για την συνεργασία και την φιλοξενία τους παραχωρώντας εργαστηριακό χώρο και εξοπλισμό.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια και στους φίλους μου για την κατανόηση και την στήριξη τους για την διεκπεραίωση της μεταπτυχιακής εργασίας.

Περίληψη

Ο μόλυβδος (Pb) αποτελεί το δεύτερο πιο τοξικό στοιχείο μετά από το αρσενικό (As) ενώ η υψηλή συγκέντρωσή του σε ένα έδαφος χαρακτηρίζεται ως απειλή της δημόσιας υγείας. Η μεγάλη κυνηγητική δραστηριότητα που παρατηρείται στην Κύπρο δημιουργεί την ανάγκη για διερεύνηση του πιθανού προβλήματος της ρύπανσης των εδαφών με Pb από τα σκάγια των φυσιγγίων. Στόχος της διατριβής ήταν η μελέτη της κινητικότητας του Pb στο έδαφος και του βαθμού πρόσληψης από φυτά μαρουλιού (*Lactuca sativa*) σε τεχνητό περιβάλλον σε λυσίμετρα. Η πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε στις εγκαταστάσεις του Ινστιτούτου Γεωργικών Ερευνών (ΙΓΕ) της Κύπρου. Καλλιεργήθηκαν συνολικά 200 φυτά μαρουλιού σε 8 λυσίμετρα τα οποία επέτρεψαν την καλλιέργεια σε ελεγχόμενο περιβάλλον αλλά ταυτόχρονα σε παρόμοιες συνθήκες με τις πραγματικές συνθήκες καλλιέργειας στην φύση. Από τα 8 λυσίμετρα το ένα χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας, ένα χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας με την προσθήκη βιοεξανθρακώματος, σε 2 χορηγήθηκαν 300 mg Pb, σε 2 χορηγήθηκαν 600 mg μόλυβδου, σε ένα προστέθηκαν 300 mg μόλυβδου και βιοεξανθράκωμα και σε ένα 600 mg μόλυβδου και βιοεξανθράκωμα. Επιπλέον η καλλιέργεια σε λυσίμετρα έδωσε την δυνατότητα της συλλογής υδάτινων πόρων στα 1,25 m επιτρέποντας την εκτίμηση έκπλυσης του μόλυβδου και την πιθανή μόλυνση των υπόγειων υδάτινων. Επίσης διερευνήθηκε ο ρόλος της ανάμειξης εξανθρακώματος (biochar) στο έδαφος των λυσιμέτρων όσον αφορά στη μείωση της κινητικότητας του Pb. Βρήκαμε ότι με την προσθήκη Pb έχουν ξεπεραστεί στα μαρούλια τα ανώτατα επιτρεπτά επίπεδα συγκέντρωσης μόλυβδου στα φυλλώδη λαχανικά σύμφωνα με τον Κανονισμό 1881/2006/EK το οποίο ισούται με 0,3 mg/kg νωπού βάρους. Επίσης η χορήγηση 300 mg kg⁻¹ και 600 mg kg⁻¹ Pb στο έδαφος δεν επηρέασε σημαντικά τις αναπτυξιολογικές παραμέτρους των φυτών μαρουλιού, ενώ οι μετρήσεις δεικτών καταπόνησης, στοματικής αγωγιμότητας, καροτενοειδών και παρατήρηση συγκεκριμένων φαινοτυπικών χαρακτηριστικών αποδεικνύουν την πρόκληση καταπόνησης στα φυτά μετά από την χορήγηση Pb. Η χορήγηση βιοεξανθρακώματος στο έδαφος αύξησε σημαντικά τη βιομάζα και το ύψος των μαρουλιών λόγω της επιπλέον χορήγησης θρεπτικών που εμπεριέχονται στο βιοεξανθράκωμα, ενώ δεν επηρέασε σημαντικά τη στοματική αγωγιμότητα, δείκτες καταπόνησης και καροτενοειδή, ενώ στις μεταχειρίσεις με βιοεξανθράκωμα παρατηρήθηκε μια τάση μείωσης στην συγκέντρωση μόλυβδου στα φυτά η οποία όμως δεν καθίστανται στατιστικώς σημαντική. Συμπεραίνουμε ότι εδάφη με επίπεδα Pb στα 600 mg/kg προκαλούν καταπόνηση σε φυτά μαρουλιού, τα οποία, λόγω της συγκέντρωσης επικίνδυνα υψηλών συγκεντρώσεων Pb, δεν μπορούν πλέον να καταναλωθούν.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	5
1.Εισαγωγή	8
1.1 Μόλυβδος.....	8
1.1.1 Φυσική και ανθρωπογενής προέλευση Pb.....	8
1.1.2 Χημικές ιδιότητες Pb	8
1.1.3 Προβλήματα στο περιβάλλον και στην δημόσια υγεία.....	9
1.1.4 Χρήσεις Pb.....	10
1.1.5 Εδαφικές ιδιότητες από τις οποίες εξαρτάται η διαθεσιμότητά του Pb	10
1.1.6 Πρόσληψή του Pb από τα φυτά	11
1.1.7 Επίδραση Pb στα φυτά.....	12
1.1.8 Συγκεντρώσεις μόλυβδου στα εδάφη της Κύπρου	15
1.2 Βιοεξανθράκωμα.....	15
1.3 Μαρούλι	16
1.4 Κενά στη βιβλιογραφία και σκοπός της διατριβής	16
2.Υλικά και Μέθοδοι	18
2.1. Πειραματικός σχεδιασμός.....	18
2.1.1 Στήσιμο πειράματος, περιποίηση φυτών	18
2.1.2 Φυσιολογικές μετρήσεις μαρουλιών.....	19
2.1.3 Δειγματοληψία και πειραματική επεξεργασία	19
2.2.1. Μέθοδοι ανάλυσης- Αναλύσεις μόλυβδου, στοματική αγωγιμότητα.....	22
2.2.1.1. Ανάλυση μόλυβδου στα φύλλα μαρουλιού, εδάφους, εκκλύματος.....	22
2.2.1.2. Στοματική αγωγιμότητα.....	22
2.2.2. Μετρήσεις δεικτών καταπόνησης και φωτοσυνθετικών χρωστικών	23
2.2.2.1.H2O2.....	23
2.2.2.2. Υπεροξειδωση λιπιδίων	23
2.2.2.3. Προλίνη	24
2.2.2.4 Φωτοσυνθετικές χρωστικές	25
2.3 Στατιστική Επεξεργασία	25
3. Αποτελέσματα	26

3.1 Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά μαρουλιού	26
3.1.1 Φωτογραφίες φαινοτυπικών χαρακτηριστικών μαρουλιών	26
3.1.2 Μετρήσεις ύψους και πλάτους μαρουλιών	26
3.2 Βιομάζα μαρουλιού (νωπή, ξηρή), ποσοστά υγρασίας και στοματική αγωγιμότητα	28
3.3 Υπολογισμός συγκεντρώσεων Pb και άλλων χημικών στοιχείων (έδαφος, φυτό,έκπλημα.....	31
3.4 Μετρήσεις δεικτών καταπόνησης	33
3.5 Φωτοσυνθετικές χρωστικές	35
4. Συζήτηση	39
5. Συμπεράσματα.....	43
6. Βιβλιογραφία	44
7. Παράρτημα	53

Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή

1.1 Μόλυβδος

1.1.1 Φυσική και ανθρωπογενής προέλευση μόλυβδου

Ο μόλυβδος έχει ατομικό αριθμό 82, ατομικό βάρος 207.2, με χημικό του σύμβολο Pb και ανήκει στα βαρέα μέταλλα. Η θερμοκρασία τήξης του είναι 327,5 °C, ενώ η θερμοκρασία βρασμού του έχει υπολογιστεί στους 1740 °C (Davidson et al., 1992). Ο μόλυβδος αποτελεί ένα μέταλλο το οποίο βρίσκεται σε μικρές ποσότητες στον φλοιό της Γης οι οποίες συνήθως δεν ξεπερνούν τα 50 mg kg⁻¹ (Pais and Jones, 1997). Ο μεταλλικός μόλυβδος εμφανίζεται στη φύση, συνήθως με τη μορφή μεταλλευμάτων. Τα πιο κοινά ορυκτά του μόλυβδου που απαντώνται στην φύση αποτελούν ο γαληνίτης (PbS), ο κερουσίτης (PbCO₃) και ο αγγλεσίτης (PbSO₄). Το κυριότερο μέταλλευμα του μόλυβδου είναι η γαληνίτης (PbS) με περιεκτικότητα σε μόλυβδο περίπου 86.6% (Cecchi et al., 2008).

Παρόλο που τα βαρέα μέταλλα απαντώνται φυσικά και βρίσκονται στον φλοιό της γης, η κύρια περιβαλλοντική μόλυνση και η έκθεση στον άνθρωπο προκύπτουν από ανθρωπογενείς δραστηριότητες όπως εργασίες εξόρυξης και τήξης, βιομηχανική παραγωγή και οικιακή, γεωργική χρήση μετάλλων και ενώσεων που περιέχουν μέταλλα (McCumber and Strevett, 2017). Η περιβαλλοντική μόλυνση μπορεί επίσης να συμβεί μέσω διάβρωσης μετάλλων, ατμοσφαιρικής εναπόθεσης, διάβρωσης εδάφους, έκπλυσης βαρέων μετάλλων, επανεναιώρησης ιζημάτων και εξάτμισης μετάλλων από τους υδάτινους πόρους στο έδαφος και τα υπόγεια ύδατα (Merian, 1980). Όταν οι ποσότητες μόλυβδου που εντοπίζονται προέρχονται από ανθρώπινη δραστηριότητα, αυτός συσσωρεύεται κυρίως στα επιφανειακά στρώματα του εδάφους και με το βάθος αυτές οι συγκεντρώσεις μειώνονται (Cecchi et al., 2008). Ο αερομεταφερόμενος μόλυβδος μπορεί να εναποτίθεται στο έδαφος και το νερό φτάνοντας έτσι στον άνθρωπο μέσω της τροφικής αλυσίδας και του πόσιμου νερού. Τα επίπεδα μόλυβδου που βρίσκονται στον αέρα, τα τρόφιμα, το νερό, το έδαφος και τη σκόνη ποικίλλουν σε μεγάλο βαθμό σε όλο τον κόσμο και εξαρτώνται από το βαθμό βιομηχανικής ανάπτυξης, την αστικοποίηση και τους τρόπους ζωής (Dongre et al., 2011)

1.1.2 Χημικές ιδιότητες μόλυβδου

Ο μόλυβδος αποτελεί δηλητηριώδες μέταλλο, επηρεάζοντας σχεδόν πολλά όργανα και συστήματα στον ανθρώπινο οργανισμό. Το μεγαλύτερο ποσοστό πρασλαμβανόμενου μόλυβδου απορροφάται στην κυκλοφορία του αίματος. Η κύρια αιτία της τοξικότητάς του αποτελεί η ικανότητα του να παρεμβαίνει στην λειτουργία των ενζύμων (Pryor, 1991). Ο μόλυβδος είναι θετικά φορτισμένος έτσι εμφανίζει συγγένεια με τις αρνητικά φορτισμένες θειουδρικές ομάδες, εξουδετερώνοντας ένζυμα τα οποία

εξαρτώνται από τις θειοϋδρικές ομάδες (π.χ δεϋδράση και σιδηροτσελατάση), τα οποία αποτελούν σημαντικά ένζυμα για τη βιοσύνθεση της αίμης (haem). Μπορεί να συνδεθεί με τις σουλφυδρυλικές ομάδες που βρίσκονται σε πολλά ένζυμα, ή αντικαταστώντας και εκτοπίζοντας άλλα μέταλλα που δρουν ως συμπαραγόντες σε πολλές ενζυματικές αντιδράσεις. Μεταξύ των βασικών μετάλλων με τα οποία αλληλεπιδρά ο μόλυβδος είναι το ασβέστιο, ο σίδηρος και ο ψευδάργυρος. Τα υψηλά επίπεδα ασβεστίου και σιδήρου τείνουν να παρέχουν κάποια προστασία από δηλητηρίαση από μόλυβδο. Τα χαμηλά επίπεδα προκαλούν αυξημένη ευαισθησία σε αυτόν (Ahmed and Tajmir-Riahi, 1993).

Ο δισθενής μόλυβδος συμπεριφέρεται και μιμείται τη δράση του ασβεστίου σε διάφορα συστήματα, όπως είναι η αναπνοή των μιτοχονδρίων, και στη λειτουργία των νευρικών ιών. Επίσης ο μόλυβδος επηρεάζει τα δύο νουκλεϊνικά οξέα DNA και RNA. Η δράση του μετάλλου επί των νουκλεϊνικών οξέων είναι δυνατόν να έχει βιολογικές επιπτώσεις (Davidson et al., 1992)

1.1.3 Προβλήματα στην δημόσια υγεία

Ο μόλυβδος εισέρχεται στους οργανισμούς διαμέσου της τροφικής αλυσίδας και της διαδικασίας της αναπνοής (Rooney et al., 1999). Η κατάποση του Pb μέσω της τροφικής αλυσίδας λόγω της τοξικότητας του έχει αποδειχθεί ότι αποτελεί δυνητικό κίνδυνο για την υγεία των φυτών και των ανθρώπων. Οι υψηλές συγκεντρώσεις σε μόλυβδο μπορούν να προκαλέσουν βλάβη στο νευρικό σύστημα, στα νεφρά αναστολή σχηματισμού αίμης, αναιμία, διατάραξη ψυχικής ανάπτυξης, καρκινογένεση και μειωμένη αναπαραγωγικότητα. Η συνολική συγκέντρωση Pb σε ένα ανθρώπινο σώμα εξαρτάται από το περιβάλλον, την ηλικία και το επάγγελμα του ατόμου. Εκτιμάται ότι ένα άτομο που ζυγίζει 70 κιλά θα έχει κατά μέσο όρο 120 mg Pb, με 0,2 mg/L στο αίμα, 5–50 στα οστά του (σε mg/kg) και 0,2–3 στους ιστούς (Emsley, 2011). Ο μόλυβδος εισέρχεται στο σώμα μέσω της εισπνοής σκόνης που περιέχει Pb, πρόσληψης μολυσμένου νερού με Pb ή πρόσληψης τροφών που καλλιεργούνται σε περιοχές μολυσμένες με Pb ή μέσω κατανάλωσης μολυσμένου κτηνοτροφικού κρέατος (Rumbeiha et al., 2001). Μετά την απορρόφηση του Pb, αυτό κατανέμεται στο σώμα μέσω των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Ο Pb συνδέεται κυρίως με την αιμοσφαιρίνη μετά την είσοδο στο κύτταρο (Abadin et al., 2007). Το αιματοποιητικό σύστημα είναι ένα ευαίσθητο σύστημα στην τοξικότητα του Pb και μπορεί να οδηγήσει σε αναιμία. Η τοξικότητα του Pb αυξάνει επίσης τα επίπεδα ενζύμων στο αίμα και μειώνει τη σύνθεση πρωτεϊνών. Επιπλέον τα ιόντα Pb μεταφέρονται στο ήπαρ, όπου μπορούν να προκαλέσουν χρόνια βλάβη καθώς και στα νεφρά μέσω δομικών βλαβών και μεταβολών στην εκκριτική λειτουργία (Yuan et al., 2014). Άλλα συστήματα που επηρεάζονται λόγω τοξικότητας μόλυβδου είναι το νευρικό, καρδιαγγειακό και αναπαραγωγικό σύστημα (Flora, 2002).

Ο μόλυβδος είναι ιδιαίτερα επικίνδυνος για τα παιδιά επειδή το αναπτυσσόμενο σώμα τους απορροφά περισσότερο μόλυβδο από ό,τι οι ενήλικες και μπορούν να υποστούν σοβαρές και μόνιμες επιπτώσεις στην υγεία τους, επηρεάζοντας ιδιαίτερα την ανάπτυξη του εγκεφάλου και του νευρικού τους συστήματος (Concha et al., 2013). Τα υποσιτισμένα παιδιά είναι πιο ευαίσθητα στον μόλυβδο επειδή το σώμα τους απορροφά περισσότερο μόλυβδο εάν λείπουν άλλα θρεπτικά συστατικά, όπως ασβέστιο ή σίδηρος. Ο μόλυβδος μπορεί να προκαλέσει επίσης μακροχρόνια βλάβη σε στα ενήλικα άτομα, συμπεριλαμβανομένου του αυξημένου κινδύνου για υψηλή αρτηριακή πίεση και νεφρική βλάβη. Η έκθεση μιας εγκύου σε υψηλά επίπεδα μόλυβδου μπορεί να οδηγήσει σε έκθεση στο αναπτυσσόμενο έμβρυο και κατ' επέκταση να προκαλέσει αποβολή τοκετού, πρόωρο τοκετό και χαμηλό βάρος γέννησης (Abadin et al., 2007).

1.1.4 Χρήσεις μόλυβδου

Περισσότερα από τα τρία τέταρτα της παγκόσμιας κατανάλωσης μόλυβδου προορίζονται για την κατασκευή μπαταριών μόλυβδου-οξέος για μηχανοκίνητα οχήματα. Ο μόλυβδος, ωστόσο, χρησιμοποιείται και σε πολλά άλλα προϊόντα, για παράδειγμα χρωστικές ουσίες, χρώματα, συγκολλητικό, βιτρό, γυάλινα σκεύη από μόλυβδο, πυρομαχικά, κεραμικά τζάμια, κοσμήματα, παιχνίδια και σε ορισμένα καλλυντικά και παραδοσιακά φάρμακα (Dongre et al., 2011). Το πόσιμο νερό που διανέμεται μέσω σωλήνων μόλυβδου ή σωλήνων που ενώνονται με κολλητήρι μόλυβδου μπορεί να περιέχει μόλυβδο (who., 2019). Κατ' επέκταση σημαντικές πηγές περιβαλλοντικής μόλυνσης από μόλυβδο περιλαμβάνουν δραστηριότητες εξόρυξης, τήξης, κατασκευής και ανακύκλωσης και, σε ορισμένες χώρες, τη συνεχιζόμενη χρήση χρωμάτων με μόλυβδο, βενζίνης με μόλυβδο και καυσίμων με μόλυβδο στον τομέα της αεροπλοΐας. Σήμερα ο Pb, ενώ έχει απαγορευθεί από τα καύσιμα των τροχοφόρων οχημάτων, εξακολουθεί να χρησιμοποιείται ως πρόσθετο συστατικό στα καύσιμα της αεροπλοΐας (McCumber and Strevett, 2017).

1.1.5 Εδαφικές ιδιότητες από τις οποίες εξαρτάται η διαθεσιμότητά του Pb

Ο μόλυβδος σχηματίζει σταθερά σύμπλοκα με διαφορετικές ενώσεις και τείνει να αποθηκεύεται στο έδαφος. Η τύχη και η συμπεριφορά του μόλυβδου στο έδαφος επηρεάζεται από τη μορφή, τη διαλυτότητα, την κινητικότητα και την βιοδιαθεσιμότητά του και ελέγχεται από πολλές βιογεωχημικές παραμέτρους, όπως το pH του εδάφους, οι συνθήκες οξειδοαναγωγής, η ικανότητα ανταλλαγής κατιόντων, η ορυκτολογία του εδάφους, οι βιολογικές και μικροβιακές συνθήκες, η ποσότητα και η φύση των υφιστάμενων οργανικών και ανόργανων συμπλόκων και ανταγωνιστικών κατιόντων (Pouffut et al, 2011). Ωστόσο, μόνο ένα μικρό κλάσμα του μόλυβδου που υπάρχει στο έδαφος είναι φυτοδιαθέσιμο.

1.1.6 Πρόσληψη μόλυβδου από τα φυτά

Η κύρια οδός συσσωρεύσης μετάλλων στα φυτά είναι μέσω της πρόσληψης τους από το έδαφος μέσω της ρίζας των φυτών (Sharma and Dubey 2005, Uzu et al. 2009). Ο μόλυβδος μπορεί επίσης να εισέλθει στα φυτά σε μικρές ποσότητες μέσω των φύλλων. Μέρος του μόλυβδου που υπάρχει στο εδαφικό διάλυμα απορροφάται στις ρίζες και στη συνέχεια δεσμεύεται σε καρβοξυλικές ομάδες βλενωδους ουρονικού οξέος ή απευθείας στους πολυσακχαρίτες της κυτταρικής επιφάνειας του ριζόδερμου (Seregin and Ivanov 2001). Η προσρόφηση μόλυβδου στις ρίζες συμβαίνει σε διάφορα είδη φυτών στα οποία ανήκει και το μαρούλι (*Lactuca sativa*) (Uzu et al., 2009). Η περιεκτικότητα του μολύβδου στα εδάφιμα μέρη των φυτών τα οποία αναπτύσσονται σε μη ρυπασμένες περιοχές, κυμαίνεται από 0,001 έως 0,08 mg/kg και από 0,05 μέχρι 3,0 mg/kg σε νοπιά και ξηρά, αντίστοιχα (Silbergeld et al., 2000). Μόλις απορροφηθεί από την επιφάνεια των ριζών, ο μόλυβδος μπορεί να εισέλθει στις ρίζες παθητικά και να κινηθεί μέσω της ροής του νερού. Ωστόσο, η απορρόφηση μόλυβδου δεν είναι ομοιόμορφη κατά μήκος των ριζών των φυτών με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις να παρατηρούνται στις κορυφές της ρίζας, όπου τα ριζικά κύτταρα είναι νεαρά και έχουν λεπτά κυτταρικά τοιχώματα που διευκολύνουν την πρόσληψη από τη ρίζα (Tung and Temple 1996, Seregin et al., 2004). Επιπλέον, η κορυφαία περιοχή είναι η περιοχή όπου το ριζοδερμικό pH είναι το χαμηλότερο, γεγονός που αυξάνει τη διαλυτότητα του μόλυβδου στο εδαφικό διάλυμα.

Ο μόλυβδος μπορεί να εισέλθει στις ρίζες μέσω πολλών οδών, και ένα συγκεκριμένο μονοπάτι αποτελεί αυτό των ιοντικών διαύλων. Η πρόσληψη μολύβδου εξαρτάται από τη λειτουργία της αντλίας $H^+/ATPase$ για να διατηρήσει ένα ισχυρό αρνητικό δυναμικό μεμβράνης στα ριζοδερμικά κύτταρα (Hirsch et al. 1998, Wang et al., 2007). Το ασβέστιο αναστέλλει την απορρόφηση του μολύβδου (Garland and Wilkins 1981, Kim et al. 2002) λόγω του ανταγωνισμού μεταξύ αυτών των δύο κατιόντων για τα κανάλια ασβεστίου (Huang and Cunningham 1996). Τα διαπερατά κανάλια Ca^{2+} αποτελούν την κύρια δίοδο με την οποία ο μόλυβδος εισέρχεται στις ρίζες (Wang et al., 2007, Pourrut et al., 2008). Ο μόλυβδος μπορεί επίσης να διεισδύσει στις ρίζες μέσω εναλλακτικών μη επιλεκτικών οδών, όπως κυκλικά νουκλεοτιδικά κανάλια ιόντων (Arazi et al., 1999, Kohler et al., 1999) ή μέσω μεταφορέων κατιόντων χαμηλής συγγένειας (Wojas et al., 2007).

Όταν ο μόλυβδος διεισδύσει στο ριζικό σύστημα, μπορεί να συσσωρευτεί εκεί ή να μεταφερθεί στο εναέριο τμήμα του φυτού. Στα περισσότερα είδη φυτών, η πλειοψηφία του απορροφημένου μολύβδου (~95%) συσσωρεύεται στις ρίζες και μόνο ένα μικρό κλάσμα μεταφέρεται σε μέρη του εναέριου φυτού, όπως έχει παρατηρηθεί σε αρκετά φυτά. Όπως πολλά μέταλλα εμφανίζουν

τον περιορισμό της μετατόπισης, έτσι αυτό παρατηρείται έντονα και για τον μόλυβδο. Κατά την είσοδο στη ρίζα, ο μόλυβδος κινείται κυρίως από τον απόπλαστη και ακολουθεί τη ροή του νερού μέχρι να φτάσει στην ενδοδερμίδα (Lane and Martin, 1977). Υπάρχουν διάφοροι λόγοι για τους οποίους η μεταφορά μολύβδου από τις ρίζες στα μέρη του εναέριου φυτού είναι περιορισμένη. Αυτοί οι λόγοι περιλαμβάνουν την ακινητοποίηση από αρνητικά φορτισμένες πηκτίνες εντός του κυτταρικού τοιχώματος, καταβύθιση αδιάλυτων αλάτων μολύβδου σε μεσοκυττάρια χώρους (Kopittke et al., 2007, Islam et al., 2007), συσσώρευση σε μεμβράνες πλάσματος (Seregin et al., 2004, Islam et al., 2007, Jiang and Liu., 2010) ή απομόνωση στα κενά των κυττάρων της ριζοδερμίδας και του φλοιού (Seregin et al., 2004, Kopittke et al., 2007). Επιπλέον, το ενδόδερμα λειτουργεί ως φυσικό εμπόδιο, διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στον χαμηλό ρυθμό μετάδοσης του μολύβδου από τη ρίζα σε βλαστό. Αυτό συμβαίνει γιατί στην μεταπλαστική μεταφορά, ο μόλυβδος μπλοκάρει στην ενδοδερμίδα από την Κασπαρική λωρίδα και πρέπει να ακολουθεί τη συμπλαστική μεταφορά. Στα κύτταρα της ενδοδερμίδας, το μεγαλύτερο μέρος του μολύβδου απομονώνεται ή αποβάλλεται με συστήματα αποτοξίνωσης των φυτών.

Ωστόσο οι υψηλές συγκεντρώσεις μολύβδου καταστρέφουν το φυσικό φράγμα που σχηματίζεται από την Κασπαρική λωρίδα. Η μεταφορά μετάλλων από τις ρίζες των φυτών στους βλαστούς απαιτεί μετακίνηση μέσω του ξυλώματος (Verbruggen et al. 2009) και, όταν συμβεί, πιθανότατα οδηγείται από τη διαπνοή (Liao et al., 2006; Agias et al., 2010). Αφού διεισδύσει στο κεντρικό τμήμα του στελέχους, ο μόλυβδος μπορεί και πάλι να μεταφερθεί μέσω της αποπλαστικής οδού. Ο μόλυβδος μεταφέρεται στη συνέχεια στις περιοχές των φύλλων μέσω της ροής των αγγείων (Sharma and Dubey, 2005, Krzesłowska et al., 2010). Ενώ περνά μέσα από το ξύλωμα, ο μόλυβδος μπορεί να σχηματίσει σύμπλοκα με αμινοξέα ή οργανικά οξέα. Ωστόσο, ο μόλυβδος μπορεί επίσης να μεταφερθεί σε ανόργανη μορφή (Roelfsema and Hedrich, 2005, Vadas and Ahner, 2009).

1.1.7 Επίδραση μολύβδου στα φυτά

Ο μόλυβδος δεν έχει βιολογική λειτουργία και προκαλεί διάφορες επιβλαβείς επιδράσεις στα φυτά. Η υπερβολική συσσώρευση μολύβδου στον ιστό των φυτών είναι τοξική για τα περισσότερα φυτά: οδηγεί σε μείωση της βλάστησης των σπόρων, επιμήκυνση των ριζών, μείωση της βιομάζας, αναστολή της βιοσύνθεσης χλωροφύλλης, μείωση της πρόσληψης μετάλλων και αναστολή ενζυματικών αντιδράσεων, καθώς και μια σειρά άλλων φυσιολογικών επιδράσεων. Η ένταση αυτών των επιδράσεων ποικίλλει ανάλογα με τη διάρκεια της έκθεσης, το στάδιο ανάπτυξης του φυτού, το όργανο που μελετήθηκε και τη συγκέντρωση μολύβδου που χρησιμοποιείται στην εκτίμηση της έκθεσης (Pourrut et al., 2011).

Η υπερβολική συσσώρευση μολύβδου στον ιστό των φυτών επηρεάζει διάφορες μορφολογικές, φυσιολογικές και βιοχημικές λειτουργίες στα φυτά, είτε άμεσα είτε έμμεσα. Προκαλεί φυτοτοξικότητα, μεταβάλλοντας την διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης, αντιδρώντας με δραστικές ομάδες διαφορετικών ενζύμων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των φυτών και αντιδρώντας με τις φωσφορικές ομάδες ADP ή ATP και αντικαθιστώντας τα απαραίτητα ιόντα. Η τοξικότητα του μολύβδου προκαλεί αναστολή της παραγωγής ATP, υπεροξειδωση λιπιδίων στα φυτά και βλάβη στο DNA με υπερπαραγωγή ROS. Επιπλέον, ο μολύβδος αναστέλλει έντονα τη βλάστηση των σπόρων, την επιμήκυνση των ριζών, την ανάπτυξη των δενδρυλλίων, την ανάπτυξη των φυτών, τη διαπνοή, την παραγωγή χλωροφύλλης και την περιεκτικότητα σε νερό και πρωτεΐνη. Οι αρνητικές επιδράσεις που έχει ο μολύβδος στη φυτική ανάπτυξη των φυτών οφείλονται κυρίως στους ακόλουθους παράγοντες: παραμόρφωση της υπερδομής των χλωροπλαστών, παρεμπόδιση της μεταφοράς ηλεκτρονίων, αναστολή των ενζύμων του κύκλου Calvin, διαταραχή πρόσληψης βασικών στοιχείων, όπως Mg και Fe, και προκαλούμενη ανεπάρκεια CO₂ από το στοματικό κλείσιμο. Κάποιες από τις επιβλαβείς επιδράσεις που προκαλεί ο μολύβδος στα φυτά επεξηγούνται παρακάτω (Pourrut et al., 2011).

Η υπερβολική συσσώρευση μολύβδου στον ιστό των φυτών επηρεάζει διάφορες μορφολογικές, φυσιολογικές και βιοχημικές λειτουργίες στα φυτά, είτε άμεσα είτε έμμεσα, και προκαλεί μια σειρά από επιβλαβείς επιδράσεις. Προκαλεί φυτοτοξικότητα με την αλλαγή της διαπερατότητας των κυττάρων, την αντίδραση με δραστικές ομάδες διαφορετικών ενζύμων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των φυτών και την αντίδραση με τις φωσφορικές ομάδες του ADP ή ATP και την αντικατάσταση των απαραίτητων ιόντων (Seregin and Ivanov., 2001).

Ο Pb επιδρά στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό λόγω της συγγενείας του Pb με πρωτεΐνες που περιέχουν ομάδες N- και S- (Ahmed and Tajmir-Riahi, 1993). Ενίσχυση της αποικοδόμησης της χλωροφύλλης συμβαίνει σε φυτά που έχουν υποστεί στρες που προκαλείται από τον Pb λόγω της αυξημένης δραστηριότητας της χλωροφυλλάσης. Η χλωροφύλλη b επηρεάζεται περισσότερο από ό,τι η χλωροφύλλη a από το στρες το οποίο προκαλείται από τον Pb (Sharma and Dubey., 2005). Οι υψηλές συγκεντρώσεις μολύβδου μπορεί να μειώσουν την περιεκτικότητα στον συνολικό αριθμό πρωτεϊνών στα φυτά (Chatterjee et al., 2004; Mishra et al., 2006, Piotrowska et al., 2009). Αυτή η ποσοτική μείωση της συνολικής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες είναι αποτέλεσμα πολλών επιδράσεων μολύβδου: τη διέγερση οξειδίας της οξειδωτικής πίεσης των ROS (Piotrowska et al., 2009; Gupta et al., 2009), την τροποποίηση της γονιδιακής έκφρασης (Kovalchuk et al., 2005), την αυξημένη δραστηριότητα ριβονουκλεάσης (Gopal και Rizvi, 2008), την χρήση πρωτεΐνης από τα φυτά για σκοπούς αποτοξίνωσης από το μολύβδο, και τη μείωση της περιεκτικότητας σε ελεύθερα αμινοξέα (Gupta et al., 2009) που συσχετίζεται με διαταραχή του μεταβολισμού του αζώτου (Chatterjee et al., 2004). Ωστόσο, ορισμένα αμινοξέα, όπως η προλίνη,

αυξάνονται υπό συνθήκες stress που προκαλείται από τον μόλυβδο (Qureshi et al. 2007). Τέτοιες πρωτεΐνες διαδραματίζουν ρόλο στην ανοχή του φυτού στον μόλυβδο. Αντίθετα, οι χαμηλές συγκεντρώσεις μόλυβδου αυξάνουν το συνολικό περιεχόμενο πρωτεΐνης (Mishra et al., 2006). Αυτή η συσσώρευση πρωτεΐνης μπορεί να βοηθήσει το φυτό για την αντιμετώπιση του στρες που προκαλείται από τον μόλυβδο (Gupta et al., 2010), ιδιαίτερα όσο αφορά τις πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη διατήρηση της οξειδοαναγωγής των κυττάρων.

Επίσης, ο μόλυβδος προκαλεί σημαντικές αλλαγές στη λιπιδική σύνθεση διαφορετικών κυτταρικών μεμβρανών των φυτών (Liu et al., 2008, Piotrowska et al., 2009, Grover et al., 2010, Yan et al., 2010). Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και οι εστέρες τους που υπάρχουν στα λιπίδια δείχνουν υψηλή ευαισθησία στις ROS (Dey et al., 2007, Gupta et al., 2009). Το ROS αφαιρεί το υδρογόνο από ακόρεστα λιπαρά οξέα και σχηματίζει λιπιδικές ρίζες και δραστικές αλδεΐδες, προκαλώντας τελικά παραμόρφωση της λιπιδικής διπλοστιβάδας (Malkowski et al., 2002). Τα ιόντα μολύβδου προκαλούν υπεροξειδωση των λιπιδίων, μειώνουν το επίπεδο κορεσμένων λιπαρών οξέων και αυξάνουν την περιεκτικότητα σε μεμβράνες ακόρεστων λιπαρών οξέων σε διάφορα είδη φυτών (Singh et al., 2010). Αυτές οι μεταβολές των λιπιδικών μεμβρανών προκαλούν το σχηματισμό αφύσικων κυτταρικών δομών, όπως αλλοιώσεις στην κυτταρική μεμβράνη (Dey et al., 2007, Islam et al., 2008, Gupta et al., 2009), οργανίδια (π.χ. μιτοχόνδρια), υπεροξειδία (Małecka et al., 2008, Liu et al., 2008) ή χλωροπλάστες (Choudhury and Panda, 2005, Weryszko et al., 2005).

Συγκεκριμένα οι ROS, όπως οι ρίζες υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot -}$), οι ρίζες υδροξυλίου ($\cdot OH$) και το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2), δημιουργούνται μετά από έκθεση σε ορισμένους περιβαλλοντικούς παράγοντες. Η παραγωγή ROS στα κύτταρα των αερόβιων οργανισμών, που ορίζεται ως οξειδωτικό στρες, είναι ένα γνωστό χαρακτηριστικό της τοξικότητας των βαρέων μετάλλων, συμπεριλαμβανομένου του μολύβδου (Pourrut et al., 2008, Liu et al., 2008, Grover et al., 2010, Singh et al., 2010). Η παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS) που προκαλείται από το μόλυβδο είναι η κύρια αιτία της τοξικότητάς του. Αυτές οι ελεύθερες ρίζες διαταράσσουν την οξειδοαναγωγική κατάσταση των κυττάρων, προκαλώντας οξειδωτικό στρες και βλάβη του DNA μέσω της οξειδωσης και οδηγούν σε ανεπανόρθωτη μεταβολική δυσλειτουργία και κυτταρικό θάνατο. Τα φυτά προστατεύονται από την τοξικότητα του μολύβδου μέσω πολλών μηχανισμών αποφυγής ή αποτοξίνωσης και παρεμποδίζουν στην είσοδο του μολύβδου στα κύτταρά τους μέσω αποκλεισμού ή οδηγούν στα κυτταρικά τοιχώματά τους ή άλλους υποκαταστάτες. Τα φυτά καταπολεμούν την αυξημένη παραγωγή ROS που προκαλείται από μόλυβδο ενεργοποιώντας διάφορα αντιοξειδωτικά ένζυμα. Η αποτελεσματικότητα των μηχανισμών αποτοξίνωσης καθορίζει την τελική ανοχή ή ευαισθησία των φυτών στο στρες που προκαλείται από μέταλλα. Τα φυτά που διαθέτουν αποτελεσματικούς μηχανισμούς αποτοξίνωσης χαρακτηρίζονται γενικά ως υπερσυσσωρευτές. Αντίθετα,

τα φυτά που δεν αντιμετωπίζουν αποτελεσματικά τους ρύπους είναι ευαίσθητα στην τοξικότητα μετάλλων και χρησιμοποιούνται συχνά σε μελέτες εκτίμησης κινδύνου (Pourrut et al., 2011).

Άλλες αμυντικές στρατηγικές των φυτών για την αντιμετώπιση της τοξικότητας του μόλυβδου περιλαμβάνουν μειωμένη πρόσληψη στο κύτταρο, απομόνωση μόλυβδου σε κενά με το σχηματισμό συμπλεγμάτων, δέσμευση μόλυβδου από φυτοκελατίνες, γλουταθειόνη και αμινοξέα. και σύνθεση ωσμολυτών. Επιπλέον, η ενεργοποίηση διαφόρων αντιοξειδωτικών για την καταπολέμηση της αυξημένης παραγωγής ROS που προκαλείται από μόλυβδο αποτελεί δευτερεύον αμυντικό σύστημα (Pourrut et al., 2008, Pourrut et al., 2011).

1.1.8 Συγκεντρώσεις μόλυβδου στα εδάφη της Κύπρου

Το ασφαλές επιτρεπτό επίπεδο συγκέντρωσης μόλυβδου στο έδαφος σύμφωνα με το FAO αποτελεί τα 600 mg/kg (Madhavan et al., 1989). Σύμφωνα με έρευνα που πραγματοποιήθηκε με συλλογή 5377 δειγμάτων σε μεγάλο τμήμα της Κύπρου, ο μέσος όρος συγκέντρωσης μόλυβδου στα 0-25 cm ήταν 11 mg/kg και με συλλογή 5197 δειγμάτων ο μέσος όρος συγκέντρωσης μόλυβδου στα 25-50 cm ήταν 7 mg/kg. Με βάση αυτή την έρευνα, οι συγκεντρώσεις μόλυβδου στα εδάφη της Κύπρου κυμαίνονται κυρίως από 1 mg/kg έως 60 mg/kg . Ωστόσο υπήρχαν δείγματα τα οποία είχαν συγκέντρωση μέχρι 2040 mg/kg (Cohen et al., 2012).

1.2 Βιοεξανθράκωμα (biochar)

Το βιοεξανθράκωμα είναι ένα υλικό πλούσιο σε άνθρακα που προέρχεται από την καύση βιομάζας σε υψηλές θερμοκρασίες και χαμηλά επίπεδα οξυγόνου (Lehmann and Joseph, 2015). Τα υλικά προέλευσης περιορίζονται γενικά σε βιολογικά κατάλοιπα (π.χ. ξύλο και υπολείμματα καλλιεργειών) (Beesley et al., 2011). Το biochar παράγεται μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται πυρόλυση, η οποία περιλαμβάνει θέρμανση βιομάζας σε πλήρη ή σχεδόν πλήρη απουσία οξυγόνου. Η επίδραση του biochar όταν εφαρμόζεται στο έδαφος ως εδαφοβελτιωτικό εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως ο τύπος του εδάφους, η πρώτη ύλη που χρησιμοποιείται για την εξανθράκωση, οι συνθήκες πυρόλυσης και η ποσότητα του βιοεξανθρακώματος που εφαρμόζεται στο έδαφος (Li et al., 2021). Το βιοεξανθράκωμα αποτελεί ακινητοποιητικό παράγοντα καθώς χρησιμοποιείται συχνά για τη χημική σταθεροποίηση βαρέων

μετάλλων. Το biochar μπορεί να μειώσει την κινητικότητα του Pb μέσω της καθίζησης αδιάλυτων Pb-φωσφορικών αλάτων που προέρχονται από αυτό (Lehmann and Joseph, 2015).

Προηγούμενες έρευνες έδειξαν ότι η προσθήκη βιοεξανθρακώματος σε έδαφος μολυσμένο με βαρέα μέταλλα αύξησε το pH του εδάφους, βελτίωσε τους τις συνθήκες διαβίωσης για τους μικροοργανισμούς στο έδαφος και ενίσχυσε την ανάπτυξη των φυτών και την παραγωγή βιομάζας (Meier et al. 2021). Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται για τη μείωση της κινητικότητας, της βιοδιαθεσιμότητας και της βιοπροσβασιμότητας των βαρέων μετάλλων στο έδαφος. Η χημική σταθεροποίηση είναι μια απλή, γρήγορη, σχετικά οικονομικά αποδοτική χημική προσέγγιση με την οποία ο Pb μπορεί να ακινητοποιηθεί με προσρόφηση, χημική καθίζηση, ιοντοεναλλαγή και άλλους μηχανισμούς περιορισμού στις επιφανείες κolloειδών για τον περιορισμό της μεταφοράς και της βιοδιαθεσιμότητας του Pb. Ωστόσο, σε αυτή τη διαδικασία, ο Pb παραμένει στο έδαφος και ως εκ τούτου, συνιστάται η μακροχρόνια ακινησία του (Kumar et al., 2020). Η ικανότητα ανταλλαγής κατιόντων, που καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από τα υλικά προέλευσης και τις θερμοκρασίες πυρόλυσης, καθιστούν δυνατή την απορρόφηση τόσο των οργανικών όσο και των ανόργανων ρύπων στις επιφάνειές τους, μειώνοντας την κινητικότητά τους κατά την τροποποίηση των μολυσμένων εδαφών (Beesley et al., 2011).

1.3 Μαρούλι (*Lactuca sativa*)

Το μαρούλι είναι ένα δικοτυλήδονο φυτό που ανήκει στο είδος *Lactuca sativa* L. της οικογένειας Σύνθετα (*Asteraceae/Compositae*) της τάξης Αστερώδη (*Asterales*) (Πίνακας 1). Το μαρούλι είναι φυτό μικρού βιολογικού κύκλου, δηλαδή μονοετές και ποώδες. Η ρίζα του είναι πασσαλώδης φτάνοντας σε μήκος μέχρι το μισό μέτρο και τα φύλλα του είναι ανοιχτού ή σκούρου πράσινου χρώματος και φύονται απευθείας από τον κοντό και χοντρό βλαστό του. Το βάθος φύτευσης είναι μεταξύ 0,5 και 1,5 cm και το φυτό αναπτύσσεται σε διάφορους τύπους εδαφών με ευνοϊκότερη ανάπτυξη σε γόνιμα εδάφη. Σύμφωνα με κάποιες μελέτες, το μαρούλι, παρ' ό,τι έχει σχετικά μικρή βιομάζα και σύντομο κύκλο ζωής, είναι αρκετά αποτελεσματικό στη βιοσυσσώρευση διαφόρων μετάλλων που βρίσκονται στο έδαφος (Nogueira et al., 2010).

Πίνακας 1: Ταξινομική κατάταξη του είδους *Lactuca sativa*

Βασίλειο	Φύλο	Ομοταξία	Τάξη	Οικογένεια	Γένος	Είδος
<i>Plantae</i>	<i>Magnoliophyta</i>	<i>Magnoliopsida</i>	<i>Asterales</i>	<i>Asteraceae</i>	<i>Lactuca</i>	<i>Lactuca sativa</i>

1.4 Κενά στη βιβλιογραφία και σκοπός της διατριβής

Η υψηλή συγκέντρωσή του μόλυβδου σε ένα έδαφος χαρακτηρίζεται ως απειλή για τη δημόσια υγεία. Ο μόλυβδος προστίθεται στο φυσικό περιβάλλον κυρίως από πληθώρα ανθρωπογενών εισροών όπως η χρήση φυσιγγίων τα οποία περιέχουν μόλυβδο κατά την κυνηγετική δραστηριότητα. Η μεγάλη κυνηγετική δραστηριότητα που παρατηρείται στην Κύπρο δημιουργεί την ανάγκη για διερεύνηση του πιθανού προβλήματος της ρύπανσης των εδαφών με μόλυβδο (Pb) από τα σκάγια των φυσιγγίων. Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε με σκοπό να συμβάλει στην διερεύνηση των προβλημάτων που μπορούν να προκύψουν λόγω της επιμόλυνσης του εδάφους από υψηλές συγκεντρώσεις Pb καθώς και την κινητικότητα του μόλυβδου από το έδαφος σε φυτά μαρουλιού και στο υδατικό έκπλυμα, όπως και η αντιμετώπιση του προβλήματος που προκύπτει από τις υψηλές συγκεντρώσεις του μόλυβδου στο έδαφος. Για αυτό ερευνήθηκε η δυνατότητα περιορισμού της τοξικότητας του μόλυβδου στο έδαφος με εφαρμογή βιοεξανθρακώματος. Πιο συγκεκριμένα, διερευνήθηκαν (α) ο βαθμός πρόσληψης του μόλυβδου από φυτά μαρουλιού (*Lactuca sativa*) σε έδαφος με υψηλές συγκεντρώσεις Pb (300 και 600 mg kg⁻¹), (β) οι αναπτυξιολογικές και φυσιολογικές μεταβολές στα φυτά με την προσθήκη μολύβδου, (γ) οι επιδράσεις του Pb στα φυτά με την προσθήκη βιοεξανθρακώματος και (δ) ο βαθμός στον οποίο η χρήση του βιοεξανθρακώματος μείωσε τις επιπτώσεις του Pb στα φυτά

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1. Πειραματικός σχεδιασμός και μετρήσεις

2.1.1. Πείραμα

Η διεκπεραίωση των πειραμάτων στο πεδίο πραγματοποιήθηκε σε λυσίμετρα σε πραγματικές συνθήκες αγρού στις εγκαταστάσεις του Ινστιτούτου Γεωργικών Ερευνών στην περιοχή Αγλαντζιάς στην Λευκωσία. Τα λυσίμετρα με όγκο $0,867 \text{ m}^3$ καλύφθηκαν με ίδια ποσότητα εδάφους το οποίο προήλθε από χωράφι του πειραματικού σταθμού του Ινστιτούτου Γεωργικών Ερευνών και το οποίο χαρακτηρίζεται ως αμμοαργιλοπηλώδες (SCL-Sandy clay loam). Οι μέσες γεωχημικές ιδιότητες του επιφανειακού εδάφους (0-25 cm) στις πειραματικές επιφάνειες ήταν οι εξής: άμμος $51.84 \pm 1.12\%$, ιλύς $21.33 \pm 0.67\%$, άργιλος $26.83 \pm 0.67\%$, οργανική ουσία $0.62 \pm 0.02\%$, pH 8.74 ± 0.06 , φαινόμενη πυκνότητα $1,19 \text{ g/cm}$ και ικανότητα συγκράτησης νερού $0.16 \pm 0.01 \text{ mL/g}$. Το κλίμα στην πειραματική περιοχή κατά την διάρκεια του πειράματος χαρακτηρίζεται από υψηλές θερμοκρασίες (ημέρα: $29-43 \text{ }^\circ\text{C}$, νύχτα: $20-30 \text{ }^\circ\text{C}$) και χαμηλή σχετική υγρασία (χαμηλότερη από 20%), έχοντας ως αποτέλεσμα υψηλούς ρυθμούς εξάτμισης και διαπνοής στα φυτά μαρουλιού.

Τα λυσίμετρα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν είχαν ύψος $1,25 \text{ m}$ και όγκο $0,867 \text{ m}^3$ με υλικό κατασκευής τον ανοξείδωτο χάλυβα (Εικόνα 1). Στα 8 λυσίμετρα προστέθηκαν ο μόλυβδος και βιοεξανθράκωμα στις 12/03/2021. Ο μόλυβδος και το βιοεξανθράκωμα χορηγήθηκαν στα πρώτα 25 cm του εδάφους των λυσιμέτρων. Ο μόλυβδος χορηγήθηκε σε μορφή νιτρικού μόλυβδου $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. Στα 3 από τα 8 λυσίμετρα, προστέθηκαν $300 \text{ mg kg}^{-1} \text{ Pb}$, δηλαδή $81,12 \text{ g Pb}$ ανά λυσίμετρο, ενώ σε άλλα 3 λυσίμετρα προστέθηκαν $600 \text{ mg kg}^{-1} \text{ Pb}$ δηλαδή $162,24 \text{ g Pb}$ ανά λυσίμετρο. Κάθε δόση $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ που χορηγήθηκε ανά λυσίμετρο είχε διαλυθεί σε 10 L νερού. Το βιοεξανθράκωμα που χρησιμοποιήθηκε προήλθε από πυρόλυση καλαμιών και φυτών ακακίας και προστέθηκε σε 3 λυσίμετρα σε ποσότητα ίση με 7,5 L βιοεξανθρακώματος και 10 L νερού ανά λυσίμετρο, δηλαδή 5% v/v του όγκου του εδάφους στα πρώτα 25 cm.

Στις 16/03/2021 μεταφυτεύθηκαν συνολικά 200 μαρούλια ύψους 2-3 cm στα λυσίμετρα σε 8 λυσίμετρα, 25 μαρούλια ανά λυσίμετρο. Χρησιμοποιήθηκαν 8 λυσίμετρα και 6 διαφορετικές πειραματικές επιφάνειες, λόγω των 2 επαναλήψεων στα $300 \text{ mg kg}^{-1} \text{ Pb}$ και στα $600 \text{ mg kg}^{-1} \text{ Pb}$. Στην Εικόνα 2 παρουσιάζεται

σχεδιάγραμμα με τα 8 λυσίμετρα και το περιεχόμενο που προστέθηκε σε κάθε ένα από αυτά. Οι μεταχειρίσεις τελικά ήταν οι εξής:

- 1) Μάρτυρας (C): Δεν προστέθηκε μόλυβδος και βιοεξανθράκωμα
- 2) Μάρτυρας με βιοεξανθράκωμα (Cbc): Προσθήκη βιοεξανθρακώματος χωρίς προσθήκη μολύβδου
- 3) Pb300: Προσθήκη 300 mg kg⁻¹ Pb στα 0- 25cm του εδάφους ανά λυσίμετρο (σε δύο λυσίμετρα)
- 4) Pb300bc: Προσθήκη 300 mg kg⁻¹ Pb και βιοεξανθρακώματος στα 0- 25cm του εδάφους
- 5) Pb600: Προσθήκη 600 mg kg⁻¹ Pb στα 0- 25cm του εδάφους ανά λυσίμετρο (σε δύο λυσίμετρα)
- 6) Pb600bc: Προσθήκη 600 mg kg⁻¹ Pb και βιοεξανθρακώματος στα 0- 25cm του εδάφους

Τα φυτά μαρουλιού ποτίζονταν με νερό βρύσης αναλόγως των υδατικών τους αναγκών, οι οποίες ελέγχονταν συστηματικά. Στις 31/03/2021 έγινε προσθήκη 50 g λιπάσματος 20-20-20. Χορηγήθηκε ίση ποσότητα λιπάσματος σε κάθε λυσίμετρο.

2.1.2 Μετρήσεις αναπτυξιολογικών παραμέτρων του μαρουλιών

Οι μετρήσεις ύψους και πλάτους των μαρουλιών πραγματοποιήθηκαν στις 14/04/2021, δηλαδή 30 ημέρες μετά την μεταφύτευση τους και στις 24/04/2021, δηλαδή 40 ημέρες μετά την μεταφύτευση. Μετρήθηκε το υπέργειο μέρος των φυτών, από την επιφάνεια του εδάφους έως την κορυφή του φυτού. Οι μετρήσεις υλοποιήθηκαν για την παρατήρηση των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών των μαρουλιών μεταξύ των διαφορετικών λυσιμέτρων.

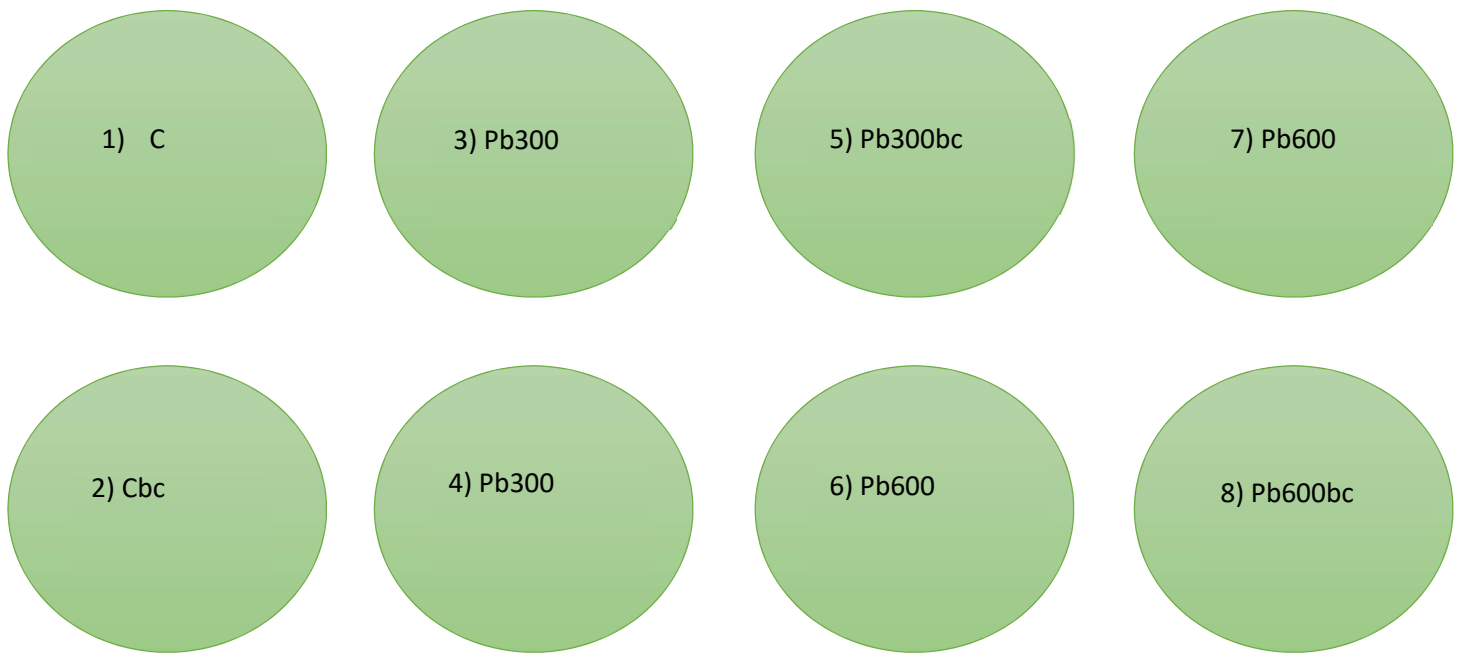
2.1.3 Δειγματοληψία και πειραματική επεξεργασία

Τα φυτά αναπτύχθηκαν και ωρίμασαν πλήρως και στις 42 ημέρες από την αρχή του πειράματος συλλέχθηκαν. Η δειγματοληψία των φυτών, του εδάφους και του υδατικού εκπλύματος πραγματοποιήθηκε στις 26/04/2021. Στην συνέχεια την ίδια ημέρα μετά την συλλογή των μαρουλιών από τα λυσίμετρα τοποθετήθηκε μεγάλη ποσότητα νερού σε κάθε λυσίμετρο μέχρι την ολοκλήρωση συλλογής 2 mL υδατικού εκπλύματος από την βάση των λυσιμέτρων.

Στην συνέχεια επιλέγηκαν τα δείγματα από συνολικά 24 μαρούλια, 4 από κάθε λυσίμετρο και ζυγίστηκαν για τον υπολογισμό του νεπού βάρους τους. Ακολούθως τα δείγματα μαρουλιών ξηράνθηκαν στους 68 °C μέχρι σταθερού βάρους και στην συνέχεια ζυγίστηκαν για τον υπολογισμό του ξηρού τους βάρους. Για τον υπολογισμό της υδατικής περιεκτικότητας των φύλλων μαρουλιού για κάθε δείγμα αφαιρέθηκε η τιμή του ξηρού βάρους του δείγματος από την τιμή του νεπού του βάρους.



Εικόνα 1: Λυσίμετρο με ύψος 1,25 m και όγκο 0,867 m³ στις εγκαταστάσεις του Ινστιτούτου Γεωργικών Ερευνών.



Εικόνα 2: Σχεδιάγραμμα των 8 λυσιμέτρων που χρησιμοποιήθηκαν και του περιεχομένου τους.

2.2.1. Μέθοδοι ανάλυσης-Αναλύσεις μόλυβδου, στοματική αγωγιμότητα

2.2.1.1. Ανάλυση μόλυβδου και άλλων χημικών στοιχείων στα φύλλα μαρουλιού, εδάφους, εκπλύματος

Οι αναλύσεις για τον ποσοτικό προσδιορισμό του μόλυβδου και άλλων χημικών στοιχείων (PTEs-potentially toxic elements) πραγματοποιήθηκαν στο Γενικό Χημείο της Κύπρου. Για το προσδιορισμό της συγκέντρωσης του μόλυβδου συλλέχθηκαν δείγματα από τα φύλλα μαρουλιού, από το έδαφος και από το υδατικό έκπλυμα των λυσιμέτρων αναλύθηκαν. Τα δείγματα εδάφους συλλέχθηκαν από τρία βάθη ανά λυσίμετρο, στα 0-25 cm, στα 26-50 cm και 51-75 cm. Τα χημικά στοιχεία προσδιορίστηκαν με την μέθοδο φασματομετρίας εκπομπής επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος αργού (ICP-OES) χρησιμοποιώντας φασματόμετρο Perkin Elmen Optima 7300DV. Η ICP-OES, αποτελεί μέθοδο ποιοτικού αλλά και ποσοτικού προσδιορισμού βαρέων μετάλλων. Το δείγμα ήταν σε μορφή διαλύματος. Το μίγμα θερμαίνεται στους 120-130 °C για 14-16 ώρες και στη συνέχεια επεξεργάζεται με υπεροξείδιο του υδρογόνου. Σε σωλήνες αυτόματης δειγματοληψίας των 8 mL σε racks για ICP-OES προσθέσαμε 3 mL διαλύματος του δείγματος και 3 mL 2% νιτρικού οξέος στον σωλήνα αυτόματης δειγματοληψίας (Soil & Plant Analysis Laboratory University of Wisconsin – Madison., 2005). Η ποιοτική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με σάρωση σε συγκεκριμένα μήκη κύματος ανάλογα του χημικού στοιχείου ενδιαφέροντος (175 έως 780 nm) και η δημιουργία της καμπύλης βαθμονόμησης (Skoog et al., 2007). Το μήκος κύματος απορρόφησης του Pb είναι στα 220,353 nm. Πραγματοποιήθηκε έλεγχος ακριβείας για κάθε μία από τις 6 ομάδες που αποτελείται από 3 δείγματα χρησιμοποιώντας ένα μάρτυρα (blank) και ένα εσωτερικό πρότυπο διαλύματος ελέγχου που παρασκευάστηκε από το πρότυπο διάλυμα ICP πολλαπλών χημικών στοιχείων Merck XVI (100 mg L⁻¹ σε 1 mol L⁻¹ HNO) (Pichtel et al.,2000).

2.2.1.2. Στοματική αγωγιμότητα

Η στοματική αγωγιμότητα (mmol m⁻² s⁻¹) μετράται με πορόμετρο και είναι ο ρυθμός εισόδου CO₂ ή εξόδου υδρατμών μέσω των στομάτων. Η μέτρηση των υδρατμών περιλαμβάνει μεθόδους δυναμικής και σταθερής κατάστασης. Για τον υπολογισμό της στοματικής αγωγιμότητας των φύλλων μαρουλιού χρησιμοποιήθηκε το ΔΤ-πορόμετρο AP4 (Delta-T Devices-Cambridge). Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε τυχαία επιλεγμένο δείγμα 4 πλήρως εκπτυγμένων φύλλων στα φυτά, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

2.2.2. Μετρήσεις δεικτών καταπόνησης και φωτοσυνθετικών χρωστικών

Οι μετρήσεις δεικτών καταπόνησης και φωτοσυνθετικών χρωστικών πραγματοποιήθηκαν στο Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο Κύπρου στο από την ομάδα Plant Stress Physiology του Τμήματος Γεωργικών Επιστημών, Βιοτεχνολογίας και Επιστήμης Τροφίμων.

2.2.2.1. H₂O₂

Οι ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS) αποτελούν τα υποπροϊόντα του μερικώς μειωμένου μοριακού οξυγόνου κατά τον αερόβιο μεταβολισμό και προκαλούν οξειδωτική καταπόνηση (De Gara et al., 2010). Η υπερπαραγωγή δραστικών παράγωγων του οξυγόνου (ROS) περιλαμβάνει παραγωγή μονοξειδίου, ανιόν υπεροξειδίου, υπεροξείδιο του υδρογόνου, ρίζα υδροξυλίου και ρίζα υπεροξυλίου. Η παραγωγή των ROS ενισχύεται υπό αβιοτικές ή βιοτικές καταπονήσεις, οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν οξειδωτική βλάβη στα μακρομόρια και τις κυτταρικές δομές των φυτών και στο DNA, τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια οδηγώντας σε αναστολή της ανάπτυξης ή στο θάνατο των φυτών. Εκτός από τον καταστρεπτικό τους ρόλο, τα ROS παίζουν καθοριστικό ρόλο ως δευτερεύοντα αγγελιοφόρο σε διάφορες κυτταρικές και βιολογικές διεργασίες, όπως η ανάπτυξη και ωρίμανση, και σύμφωνα με τη βιοτική και αβιοτική ανοχή στο στρες στα φυτά (Haider et al., 2021, Hossain et al., 2015). Μεταξύ των διαφόρων ROS, το ελεύθερα διάχυτο H₂O₂ λειτουργεί ως κεντρικός παράγοντας οδών της μεταγωγής σήματος στα φυτά. Αυτά τα μονοπάτια μπορούν στη συνέχεια να ενεργοποιήσουν πολλαπλές αποκρίσεις που ενισχύουν την αντίσταση σε διάφορους αβιοτικούς και βιοτικούς στρεσογόνους παράγοντες (Hossain et al., 2015).

Η περιεκτικότητα του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) στα δείγματα φύλλων προσδιορίστηκε σύμφωνα με την μεθοδολογία που πρότειναν οι Loreto and Velikova (2001) με βάση την αντίδραση του H₂O₂ με ιωδιούχο κάλιο (KI). Αρχικά ομογενοποιήθηκαν τα δείγματα από τα φύλλα των μαρουλιών σε 0,1% διαλύματος τριχλωροοξικού οξέως (TCA) σε πάγο. Ακολούθως φυγοκεντρήθηκε το μείγμα για 15 λεπτά στις 15000 στροφές στους 4 °C. Συλλέχθηκαν 0,5 mL από το υπερκείμενο και προστέθηκαν και αναμίχθηκαν ελαφρώς με 0,5 mL 10 mM φωσφορικού buffer με pH 7,0 και με 1,0 mL 1M KI. Η απορρόφηση μετρήθηκε φασματομετρικά στα 390 nm. Το H₂O₂ ποσοτικοποιήθηκε λαμβάνοντας υπόψη μια πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης με τιμές από γνωστές συγκεντρώσεις H₂O₂. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μmol H₂O₂ g⁻¹ νωπού βάρους.

2.2.2.2. Υπεροξείδωση λιπιδίων

Το οξειδωτικό στρες στο κυτταρικό περιβάλλον έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ενεργών και ασταθών υπεροξειδίων λιπιδίων από τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Προϊόν της διάσπασης αυτών των ασταθών μορίων είναι η μαλονδιαλδεΰδη (MDA), η οποία μπορεί να προσδιοριστεί μέσω της αντίδρασής της με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA) σύμφωνα με τους Heath and Packer (1968). Έτσι, τα TBARS, δηλαδή οι

ουσίες που αντιδρούν με το TBA εκφράζονται σαν ισοδύναμα της MDA, η οποία σχηματίζει μία ένωση με το TBA με αναλογία MDA προς TBA $\frac{1}{2}$. Το επίπεδο υπεροξειδωσης των λιπιδίων ποσοτικοποιήθηκε φασματοφωτομετρικά μετρώντας το περιεχόμενο της μαλονδιαλδεϋδης (MDA). Η MDA αποτελεί η οργανική ένωση με τύπο $\text{CH}_2(\text{CHO})_2$ και σχηματίζεται μέσω της αποσύνθεσης συγκεκριμένων προϊόντων της υπεροξειδωσης των λιπιδίων. Αρχικά ομογενοποιήθηκαν 0,1 g από τους ιστούς των φύλλων μαρουλιού και προστέθηκαν σε 0,5 mL 0,1% διαλύματος τριχλωροξικού οξέως (TCA). Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση του ομογενοποιημένου μείγματος για 10 λεπτά στους 4 °C και στις 15000 στροφές. Ακολούθως, συλλέχθηκε το υπερκείμενο και αναμίχθηκαν 0,5 mL του υπερκείμενου με 1,5 mL 0,5 % TBA αραιωμένο σε 20% TCA. Τα μείγματα θερμάνθηκαν στους 95 °C για 25 λεπτά και ακολούθως ψύχθηκαν γρήγορα σε παγόλουτρο. Στην συνέχεια έγιναν οι μετρήσεις φασματομετρικά στα 532 nm και 600 nm. Η τιμή της μη ειδικής απορρόφησης στα 600 nm αφαιρέθηκε από τις τιμές του συμπλόκου MDA-TBA στα 532 nm. Το περιεχόμενο MDA υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας τον νόμο Lambert-Beer ($A=\epsilon \cdot c \cdot l$), με συντελεστή εξαφάνισης $\epsilon^M = 155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ και εκφράστηκε ως $\mu\text{mol MDA}$ ανά g νωπού βάρους (Pryor, 1991).

2.2.2.3. Προλίνη

Μεταξύ των συμβατών φυτικών οσμολυτών (ή φυτοπροστατευτικών), η προλίνη θεωρείται μείζονος σημασίας, καθώς έχει αναφερθεί ότι συσσωρεύεται σε μεγάλο αριθμό φυτών ως απόκριση σε καταπονήσεις όπως σε συσσώρευση βαρέων μετάλλων, υπερβολική αλατότητα, κρύο ξηρασίας, ανεπάρκεια θρεπτικών συστατικών, λοιμώξεις και υψηλή οξύτητα (Hare and Cress, 1997). Η προλίνη βοηθά στην απενεργοποίηση ελεύθερων ριζών, ως πηγή ενέργειας και αζώτου, ρυθμίζει τα εν δυνάμει δυναμικά κάτω από συνθήκες καταπόνησης και αποτελεί σημαντικό συστατικό των πρωτεϊνών στα κυτταρικά τοιχώματα. Τα επίπεδα προλίνης ποσοτικοποιήθηκαν με βάση την μέθοδο αντίδρασης νινυδρίνης χρησιμοποιώντας μία τυπική καμπύλη προλίνης όπως περιγράφεται από τους Bates et al. (1973). Αρχικά ομογενοποιήθηκε το παγωμένο φυτικό υλικό σε 3% υδατικό σουλφοσαλικυλικό οξύ (0,01 g/0,5 mL) και το υπόλειμμα απομακρύνθηκε με φυγοκέντρηση που πραγματοποιήθηκε στις 12000 στροφές για 10 λεπτά. Ακολούθως 1 mL του ομογενοποιημένου ιστού αντέδρασε με 1 mL οξέος νινδρίνης και 1 mL παγόμορφου οξικού οξέος σε δοκιμαστικό σωλήνα για 1 ώρα στους 100 °C και η αντίδραση τερματίστηκε με την μεταφορά των διαλυμάτων σε παγόλουτρο. Για την παρασκευή του οξέος νινυδρίνης θερμάνθηκαν 1,25 g νινυδρίνης σε 30 mL παγόμορφου οξικού οξέος και 20 mL 6 M φωσφορικού οξέος και αναδεύτηκαν μέχρι να διαλυθούν. Στην συνέχεια το μίγμα της αντίδρασης εκχυλίστηκε με 2 mL τολουόλιο, αναμίχθηκε με έντονες κινήσεις και αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά μέχρι να διαχωριστούν οι δύο φάσεις (Bates et al, 1973).

2.2.2.4 Φωτοσυνθετικές χρωστικές

Οι φωτοσυνθετικές χρωστικές είναι τα μόρια που είναι υπεύθυνα για την απορρόφηση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, τη μεταφορά της ενέργειας των απορροφούμενων φωτονίων στο κέντρο αντίδρασης και τη φωτοχημική μετατροπή στα φωτοσυνθετικά συστήματα οργανισμών ικανών για φωτοσύνθεση (Richardson et al., 2002). Οι φωτοσυνθετικές χρωστικές προσδιορίστηκαν φασματοφωτομετρικά στα 663 nm, 645 nm και 470 nm σύμφωνα με το πρωτόκολλο εξαγωγής χλωροφύλλης των Hiscox and Israelstam (1979), προσαρμοσμένο από τους Richardson et al. (2002). Αρχικά προθερμάνθηκαν 700 mL διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO) και προστέθηκαν σε σωλήνα erpendorf των 2 mL 10 mg νωπού ιστού. Το διμεθυλοσουλφοξείδιο (dimethylsulfoxide, DMSO) είναι η απλούστερη οργανοσουλφινυλική ένωση με χημικό τύπο (CH₃)₂SO. Η ποσότητα του DMSO που προστέθηκε πρέπει να είναι σε ακριβή αναλογία με τα mg του νωπού ιστού. Στην συνέχεια εκχυλίστηκε η χλωροφύλλη θερμαίνοντας τους σωλήνες για 30 λεπτά στους 65 °C. Στην συνέχεια με την απομάκρυνση των σωλήνων από την επώαση προστέθηκαν 300 mL DMSO μέχρι ο τελικός όγκος του εκχυλίσματος να είναι 4 mL. Η ποσότητα DMSO που προστέθηκε έπρεπε να είναι σε ακριβή αναλογία με τον όγκο που προστίθεται στο πρώτο βήμα, δηλαδή για κάθε 600 mL DMSO που προστέθηκαν πριν από την εκχύλιση, έπρεπε να προστεθούν 200 mL DMSO μετά την εξαγωγή. Στην συνέχεια έγιναν οι μετρήσεις απορρόφησης στα 663 nm, 645 nm και 470 nm βαθμονομώντας στο μηδέν με καθαρό DMSO. Ο υπολογισμός των φωτοσυνθετικών χρωστικών (g L⁻¹), πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των ακόλουθων εξισώσεων σύμφωνα με τον Arnon (1949). Για όπου V αντιστοιχεί στον όγκο του εκχυλίσματος σε mL και όπου W αντιστοιχεί στο νωπό βάρος του δείγματος σε g:

$$\text{Χλωροφύλλη A (mg/g νωπού βάρους)} = [(12.7 * A_{663}) - (2.69 * A_{645})] * (V/1000 * W)$$

$$\text{Χλωροφύλλη B (mg/g νωπού βάρους)} = [(22.9 * A_{645}) - (4.68 * A_{663})] * (V/1000 * W)$$

$$\text{Ολική χλωροφύλλη} = (20,08 * A_{645} + 8,02 * A_{663}) * (V/1000 * W)$$

$$\text{Καροτενοειδή + Ξαννοφύλλες (mg/g νωπού βάρους)} = (1000 * A_{470} - 1.90 * X_{LA} - 63.14 * X_{LB}) / 214 * (V/1000 * W)$$

2.3 Στατιστική Επεξεργασία

Όλα τα πρωτογενή δεδομένα αναλύθηκαν με ανάλυση της παραλλακτικότητας (ANOVA) και εκτιμήθηκε η σημαντικότητα των διαφορών μεταξύ των μέσων όρων των μεταχειρίσεων με το Tukey post hoc test. Το επίπεδο σημαντικότητας θεωρήθηκε το 5% (p<0.05).

3. Αποτελέσματα

3.1 Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά μαρουλιού

3.1.1 Φωτογραφίες φαινοτυπικών χαρακτηριστικών μαρουλιών

Στις Εικόνες 3 και 4 (Παράρτημα) απεικονίζονται τα αποτελέσματα των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών των μαρουλιών ανά λυσίμετρο τα οποία παρατηρήθηκαν στις 30 και 40 ημέρες μετά την μεταφύτευση των μαρουλιών. Σε κάθε λυσίμετρο μεταφυτεύθηκαν 25 μαρούλια. Στην Εικόνα 3 (Παράρτημα) παρουσιάζονται τα μαρούλια τα οποία φωτογραφήθηκαν και παρατηρήθηκαν στις 30 ημέρες μετά την μεταφύτευση. Στην Εικόνα 4 (Παράρτημα) παρουσιάζονται τα μαρούλια τα οποία φωτογραφήθηκαν και παρατηρήθηκαν στις 40 ημέρες μετά την μεταφύτευση και την 42^η ημέρα κατά την συλλογή. Παρατηρήθηκαν οι φαινοτυπικές διαφορές μεταξύ των μαρουλιών στα 8 λυσίμετρα και με 6 μεταχειρίσεις, λόγω των 2 επαναλήψεων με προσθήκη 300 mg kg⁻¹ Pb και 600 mg kg⁻¹ Pb. Οι πειραματικές επιφάνειες αποτελούν τα: C, Cbc, Pb300, Pb300bc, Pb600, Pb600bc. Σύμφωνα με την Εικόνα 3 (Παράρτημα) και Εικόνα 4 (Παράρτημα) το μέγεθος των μαρουλιών διαφοροποιείται ανά λυσίμετρο. Η ταξινόμηση με σειρά μεγέθους των μαρουλιών από το μεγαλύτερο προς το μικρότερο ήταν Cbc > C > Pb300 > b > Pb600bc > Pb300 > Pb600. Συνοπτικά τα μεγαλύτερα σε μέγεθος αποτελούν τα μαρούλια στο μάρτυρα (Cbc,C), ακολουθούν τα μαρούλια με μόλυβδο και βιοεξανθράκωμα (Pb300bc, Pb600bc) και τα μικρότερα σε μέγεθος ήταν τα μαρούλια με μόλυβδο (Pb300και τέλος Pb600). Επιπλέον παρατηρήθηκε λιγότερο έντονο πράσινο χρώμα στα μαρούλια με μόλυβδο (Pb300και Pb600) καθώς και η εμφάνιση στιγμάτων στα φύλλα.

3.1.2 Μετρήσεις ύψους και πλάτους μαρουλιών

Στους Πίνακες 2 και 3 παρουσιάζεται ο μέσος όρος του ύψους και πλάτους των μαρουλιών στις 30 και 40 ημέρες αντίστοιχα μετά την μεταφύτευση. Επιπλέον παρουσιάζεται το γινόμενο των μέσων όρων ύψους και πλάτους ανά μεταχείριση. Στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των τιμών ύψους και πλάτους σε εκατοστόμετρα (cm) από 10 μαρούλια (n=10) ανά λυσίμετρο, και το γινόμενο των τιμών ύψους και πλάτους τους ανά μεταχείριση στις 30 ημέρες μετά την μεταφύτευση. Στον Πίνακα 3 παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των τιμών μετρήσεων ύψους και πλάτους σε εκατοστόμετρα (cm) από 10 μαρούλια (n=10) ανά μεταχείριση, οι μέσοι όροι τους και το γινόμενο των τιμών ύψους και πλάτους τους ανά λυσίμετρο στις 40 ημέρες μετά την μεταφύτευση. Σύμφωνα με τις τιμές που προκύπτουν από το γινόμενο ύψους και πλάτους των μαρουλιών ανά λυσίμετρο, το μέγεθος των μαρουλιών διαφοροποιήθηκε ανά μεταχείριση. Η ταξινόμηση ανά σειρά μεγέθους των μαρουλιών από το μεγαλύτερο προς το μικρότερο ήταν: Cbc > C > Pb600bc > Pb300bc > Pb300 > Pb600. Επίσης φαίνεται ότι η μεταχείριση Cbc εμφανίζει στατιστικώς

σημαντικές διαφορές μεταξύ των άλλων μεταχειρίσεων, ενώ οι υπόλοιπες μεταχειρίσεις δεν παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Η ταξινόμηση ανά σειρά μεγέθους των μαρουλιών από το μεγαλύτερο προς το μικρότερο ήταν: Cbc > C > Pb300bc > Pb300 > Pb600bc > Pb600. Συνοπτικά, τα μαρούλια με βιοεξανθράκωμα και μόλυβδο (Pb300bc, Pb600bc) ήταν μεγαλύτερα σε μέγεθος από τα μαρούλια με μόλυβδο (Pb300 και Pb600). Επίσης φαίνεται ότι οι μεταχειρίσεις c και Cbc εμφάνισαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους και μεταξύ των άλλων μεταχειρίσεων, ενώ οι υπόλοιπες μεταχειρίσεις, δηλαδή Pb300bc, Pb300, Pb600bc και Pb600, δεν παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές.

Πίνακας 2: Οι μέσοι όροι (Μ.Ο) των μετρήσεων ύψους και πλάτους των μαρουλιών, και το γινόμενο των μέσων όρων ανά μεταχείριση στις 30 ημέρες. Οι μέσοι όροι των μεταχειρίσεων που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους ($p < 0,05$).

30 ημέρες												
Μεταχείριση	C		Cbc		Pb300		Pb300bc		Pb600		Pb600bc	
	Υ(cm)	Π(cm)	Υ(cm)	Π(cm)	Υ(cm)	Π(cm)	Υ(cm)	Π(cm)	Υ(cm)	Π(cm)	Υ(cm)	Π(cm)
Μ.Ο	7.25	15.01	10.63	19.4	5.99	16.02	5.79	16.71	5.81	15.9	6.28	16.6
Ύψος*πλάτος(Μ.Ο)	108.82		206.22		95.99		96.75		92.38		104.25	
Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης	b		a		b		b		b		b	

Πίνακας 3: Οι μέσοι όροι (Μ.Ο) των μετρήσεων ύψους και πλάτους των μαρουλιών, το γινόμενο των μέσων όρων και αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης ανά μεταχείριση στις 40 ημέρες. Οι μέσοι όροι των μεταχειρίσεων που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους ($p < 0,05$).

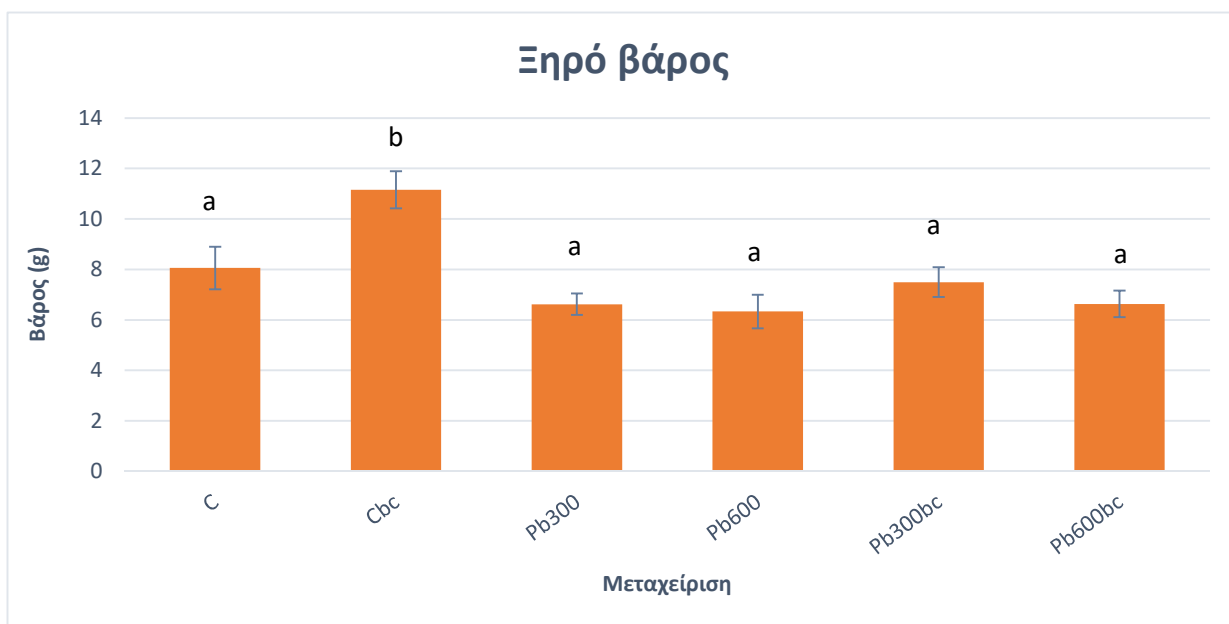
40 ημέρες												
Μεταχείριση	C		Cbc		Pb300		Pb300bc		Pb600		Pb600bc	
	Υ	Π	Υ	Π	Υ	Π	Υ	Π	Υ	Π	Υ	Π
Μ.Ο	20.5	22	23.8	25.4	13.45	19.25	13.9	20.2	11.4	18.35	11.8	19
Υψος*πλάτος(Μ.Ο)	451		604.5		258.91		280.8		209.19		224.2	
Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης	b		c		a		a		a		a	

3.2 Βιομάζα μαρουλιού (νωπή, ξηρή), ποσοστά υγρασίας και στοματική αγωγιμότητα

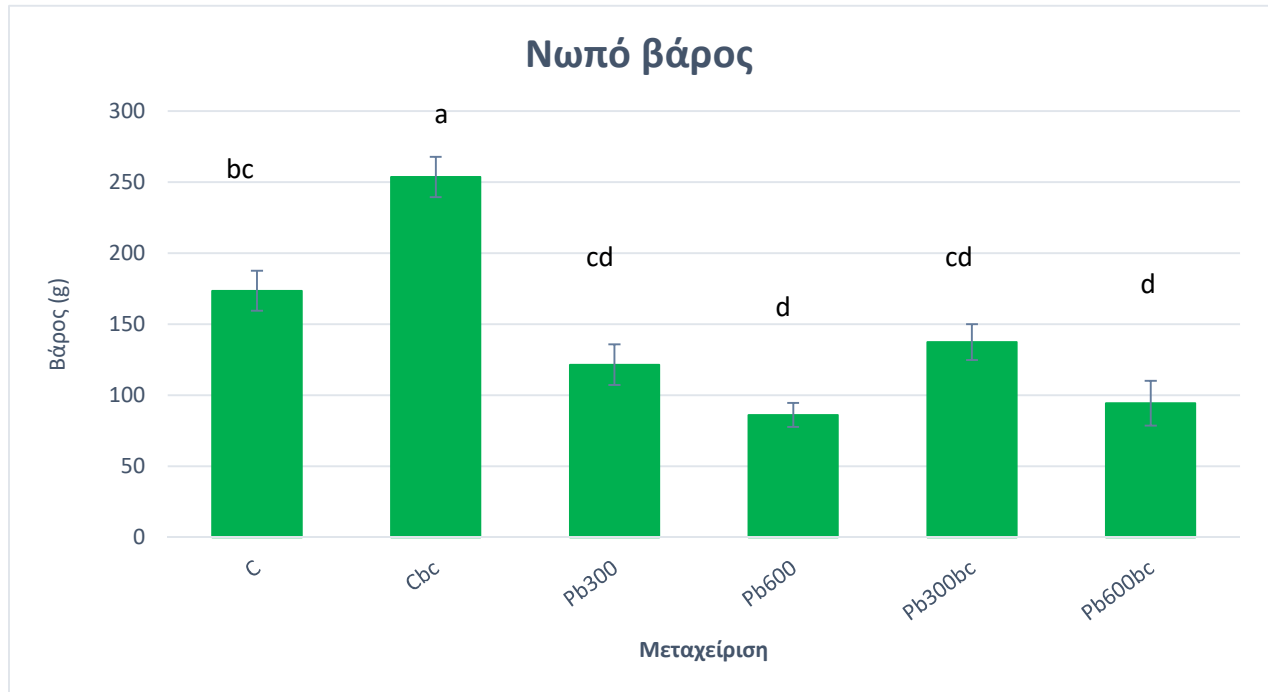
Στην Σχήμα 1 και Σχήμα 2 παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των τιμών ξηρού και νωπού βάρους των μαρουλιών ανά μεταχείριση, αντίστοιχα. Στον κάθετο άξονα φαίνεται το βάρος των δειγμάτων σε γραμμάρια (g) και στον οριζόντιο άξονα οι 6 μεταχειρίσεις των δειγμάτων. Παρουσιάζεται το τυπικό σφάλμα για κάθε μεταχείριση καθώς και διαφορετικά γράμματα τα οποία υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές. Η ταξινόμηση με σειρά ξηρού βάρους των μαρουλιών από το μεγαλύτερο προς το μικρότερο βάρος ήταν $Cbc > C > Pb300bc > Pb600bc > Pb300 > Pb600$. Επίσης φαίνεται στο ξηρό βάρος ότι η μεταχείριση Cbc εμφανίζει στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των άλλων μεταχειρίσεων, ενώ οι υπόλοιπες μεταχειρίσεις δεν παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Επίσης, η ταξινόμηση με σειρά νωπού βάρους των μαρουλιών από το μεγαλύτερο προς το μικρότερο βάρος ήταν $Cbc > C > Pb300bc > Pb300 > Pb600bc > Pb600$. Στο ξηρό βάρος φαίνεται ότι η μεταχείριση Cbc εμφάνισε στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των άλλων μεταχειρίσεων, και η μεταχείριση C στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων Cbc, Pb600 και Pb600bc. Επίσης η μεταχείριση Pb300 και Pb300bc εμφάνισε στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ της μεταχείρισης Cbc, ενώ οι μεταχειρίσεις Pb600 και Pb600bc στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων C και Cbc. Το μεγαλύτερο νωπό βάρος είχαν τα μαρούλια στο μάρτυρα (Cbc, C) και ακολούθησαν τα μαρούλια με μικρότερη ποσότητα μόλυβδου (Pb300bc, Pb300) και βιοεξανθράκωμα και με το μικρότερο νωπό βάρος ήταν τα μαρούλια με την μεγαλύτερη ποσότητα μόλυβδου (Pb600bc, Pb600).

Στον Πίνακα 4 παρουσιάζονται οι τιμές των ποσοστών υγρασίας (%) από 4 μαρούλια (n=4) ανά λυσίμετρο και οι μέσοι όροι τους. Τα ποσοστά υγρασίας δεν είχαν μεγάλη απόκλιση μεταξύ τους. Η μεταχείριση Cbc εμφάνισε στατιστικώς σημαντικές διαφορές με την Pb300bc, ενώ οι μεταχειρίσεις C, Pb300, Pb600 και Pb600bc δεν παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων.

Για τον προσδιορισμό της στοματικής αγωγιμότητας μαρουλιού επιλέχθηκαν 4 δείγματα (n=4) ανά λυσίμετρο. Στον Πίνακα 5 παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των τιμών στοματικής αγωγιμότητας ($\text{Mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ανά μεταχείριση. Η ταξινόμηση των μαρουλιών ανά μεταχείριση με βάση τα ποσοστά στοματικής αγωγιμότητας από την μεγαλύτερη προς μικρότερη τιμή ήταν $C > Pb600 > Cbc > Pb300bc > Pb300 > Pb600bc$. Η μεταχείριση C είχε στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των άλλων μεταχειρίσεων, ενώ οι υπόλοιπες μεταχειρίσεις δεν παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους.



Σχήμα 1: Οι μέσοι όροι των τιμών ξηρού των μαρουλιών ανά μεταχείριση, τα τυπικά τους σφάλματα και αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης. Οι μέσοι όροι των μεταχειρίσεων που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά ($p < 0,05$)



Σχήμα 2: Οι μέσοι όροι των τιμών νωπού βάρους των μαρουλιών ανά μεταχείριση, τα τυπικά τους σφάλματα και αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης. Οι μέσοι όροι των μεταχειρίσεων που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους ($p < 0,05$)

Πίνακας 4: Οι μέσοι όροι (Μ.Ο) των μετρήσεων ποσοστών υγρασίας (%) των μαρουλιών ανά μεταχείριση, και αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης ανά μεταχείριση. Οι μέσοι όροι των μεταχειρίσεων που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους ($p < 0,05$)

Υδατικό περιεχόμενο %						
Μεταχείριση	C	Cbc	Pb300	Pb300bc	Pb600	Pb600bc
Μ.Ο	0,95	0.956	0.9456	0.945	0.9265	0.9297
Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης	ab	a	ab	b	ab	ab

Πίνακας 5: Οι μέσοι όροι (Μ.Ο) των τιμών στοματικής αγωγιμότητας ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) των μαρουλιών, και τα αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης ανά μεταχείριση. Οι μέσοι όροι των μεταχειρίσεων που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους ($p < 0,05$).

Στοματική αγωγιμότητα						
Μεταχείριση	C	Cbc	Pb300	Pb300bc	Pb600	Pb600bc
Μ.Ο	636.5	331.1	262.4	288.3	337.5	229.4
Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης	b	a	a	a	a	a

3.3 Υπολογισμός συγκεντρώσεων Pb και άλλων χημικών στοιχείων (φυτό, έδαφος, υδατικό έκπλυμα)

Στους Πίνακες 7-9 παρουσιάζονται οι τιμές ποσοτικού προσδιορισμού του Pb στα φυτά μαρουλιού, έδαφος καλλιέργειας των μαρουλιών και του υδατικού τους εκπλύματος ανά λυσίμετρο. Στον Πίνακα 7 παρουσιάζονται οι τιμές συγκέντρωσης Pb στα φύλλα μαρουλιού σε χιλιογραμμάρια ανά κιλό (mg/kg) από 4 μαρούλια ($n=4$) ανά λυσίμετρο, οι μέσοι όροι τους και τα αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης. Η ταξινόμηση των πειραματικών επιφανειών με βάση τον μέσο όρο των τιμών συγκέντρωσης Pb στα μαρούλια από την μεγαλύτερη προς μικρότερη συγκέντρωση ήταν $\text{Pb600} > \text{Pb600bc} > \text{Pb300bc} > \text{Pb300} > \text{C} > \text{Cbc}$. Οι μεταχειρίσεις C και Cbc είχαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ της μεταχείρισης Pb600, ενώ οι μεταχειρίσεις Pb300, Pb600 και Pb600bc δεν είχαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων. Στον Πίνακα 8 δίνονται οι τιμές συγκέντρωσης Pb στα έδαφος (mg/kg) από 1 δείγμα ($n=1$) σε 3 διαφορετικά βάθη ανά λυσίμετρο, τους. Δείγματα εδάφους συλλέχθηκαν σε τρία διαφορετικά βάθη εδάφους ανά μεταχείριση, στα 0-25 cm, 26-50 cm και 51-75 cm. Η ταξινόμηση των πειραματικών επιφανειών με βάση τις τιμές συγκέντρωσης Pb στο έδαφος από την μεγαλύτερη προς μικρότερη συγκέντρωση στα 0-25cm ήταν $\text{Pb600bc} > \text{Pb300bc} > \text{Pb600} > \text{Pb300} > \text{C} > \text{Cbc}$. Η συγκέντρωση Pb στα 0-25cm στην μεταχείριση Pb600bc ήταν πολύ υψηλή. Τιμές ίσες με < 10 υποδηλώνουν συγκεντρώσεις Pb (mg/kg) κάτω από το όριο ανίχνευσης. Η ταξινόμηση των πειραματικών επιφανειών με βάση τις τιμές συγκέντρωσης Pb στο έδαφος από την μεγαλύτερη προς μικρότερη συγκέντρωση στα 0-25 cm ήταν $\text{Pb600bc} > \text{Pb300bc} > \text{Pb600} > \text{Pb300} > \text{Cbc}$ και C. Η ταξινόμηση των πειραματικών επιφανειών στα 26-50 cm ήταν $\text{Pb300bc} > \text{Pb600} > \text{Pb300} > \text{Pb600bc} > \text{Cbc} > \text{C}$. Οι τιμές συγκέντρωσης Pb στα 51-75 cm εδάφους ήταν ιδιαίτερα χαμηλές.

Στον Πίνακα 9 δίνονται οι τιμές συγκέντρωσης Pb στο υδατικό έκπλυμα των μαρουλιών σε μικρογραμμάρια ανά λίτρο ($\mu\text{g/L}$) από 1 δείγμα ($n=1$) ανά λυσίμετρο. Η ταξινόμηση των μεταχειρίσεων

με βάση τις τιμές συγκέντρωσης Pb στο υδατικό έκπλυμα από την μεγαλύτερη προς μικρότερη συγκέντρωση ήταν Pb300bc > Cbc > Pb300 > C > Pb600bc > Pb600.

Πίνακας 7: Οι μέσοι όροι (Μ.Ο) της συγκέντρωσης Pb (mg/kg) στα φύλλα μαρουλιών και τα αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης ανά μεταχείριση. Οι μέσοι όροι των μεταχειρίσεων που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικώς μεταξύ τους (p<0,05)

Ανάλυση Pb στα φύλλα (mg/kg)						
Μεταχείριση	C	Cbc	Pb300	Pb300bc	Pb600	Pb600bc
Μ.Ο	0.049	0.027	0.48	0.61	1.49	0.95
Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης	b	b	a	a	a	a

Πίνακας 8: Η συγκέντρωση Pb (mg/kg) στο έδαφος ανά μεταχείριση, στα 0-25 cm, 26-50 cm και 51-75 cm βάθος. Οι τιμές ίσες με <10 υποδηλώνουν συγκεντρώσεις κάτω από το όριο ανίχνευσης

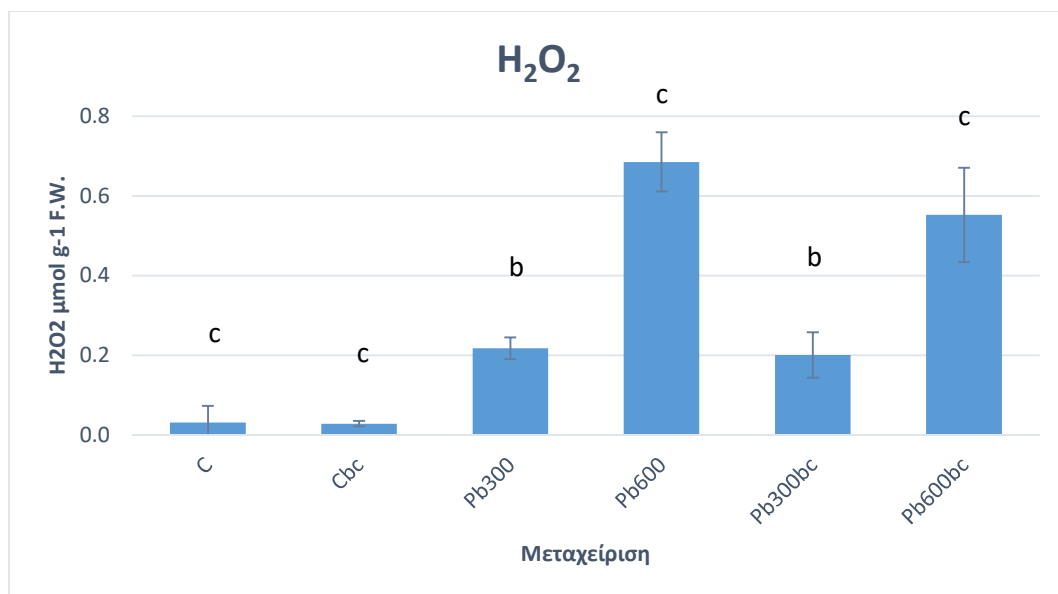
Ανάλυση Pb στο έδαφος(mg/kg)						
Μεταχείριση	C	Cbc	Pb300	Pb300bc	Pb600	Pb600bc
Βάθος Εδάφους δειγμάτων						
0-25cm	<10	<10	275	457	415	1032
26-50 cm	<10	<10	27	32	32	19
51-75cm	<10	<10	10	<10	<10	<10

Πίνακας 9: Η συγκέντρωση Pb (μg/L) στο υδατικό έκπλυμα ανά μεταχείριση

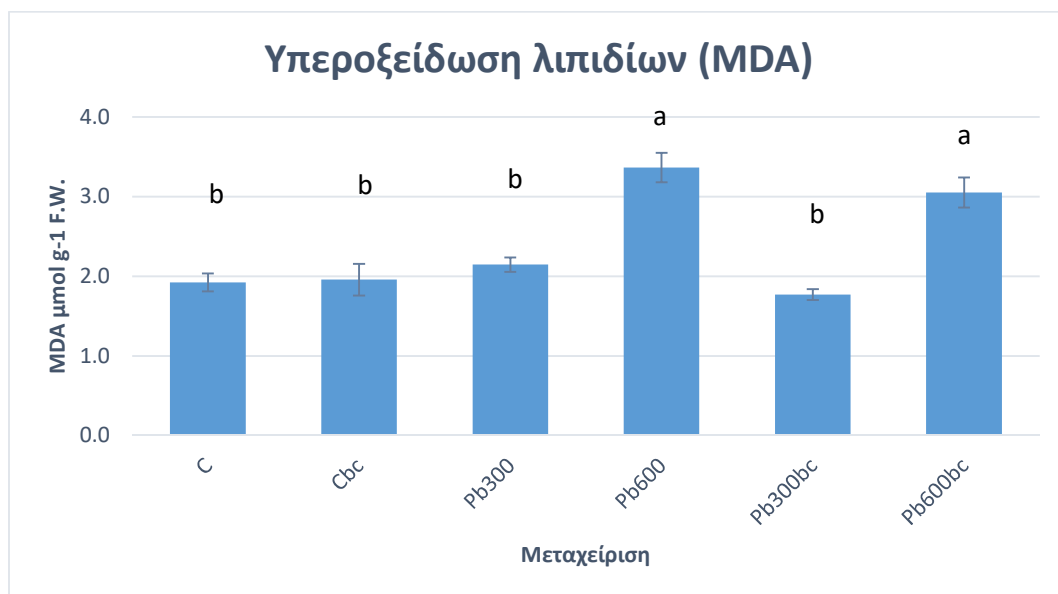
Ανάλυση Pb στο υδατικό έκπλυμα (μg/L)						
Μεταχείριση	C	Cbc	Pb300	Pb300bc	Pb600	Pb600bc
	13	15	15	24	5.3	7.1

3.4 Μετρήσεις δεικτών καταπόνησης (H₂O₂, προλίνη, υπεροξειδωση λιπιδίων (MDA))

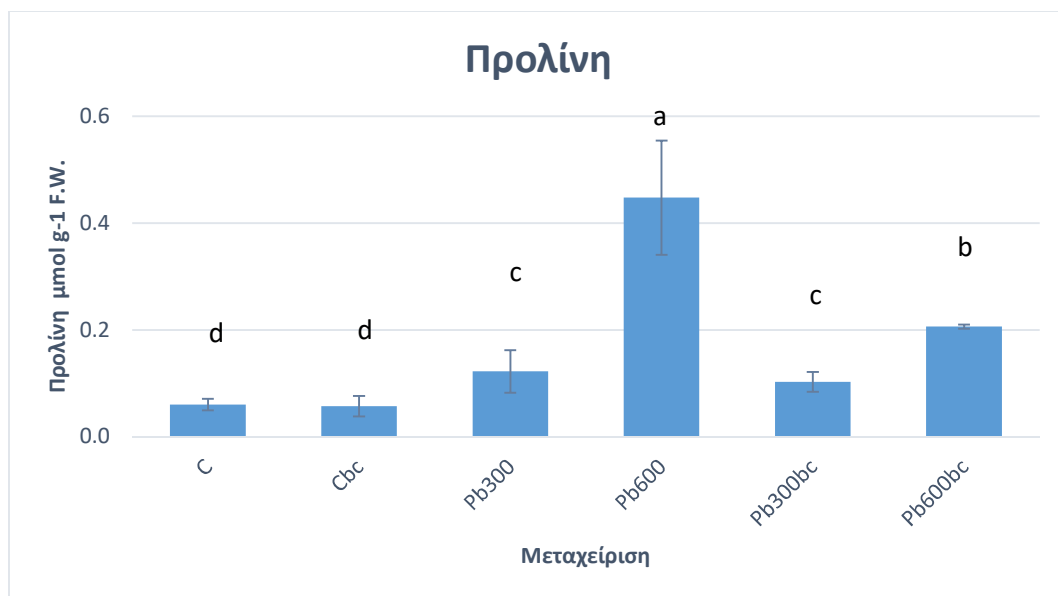
Στα Σχήματα 3-5 παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των δεικτών καταπόνησης από 4 δείγματα (n=4) μαρουλιών ανά μεταχείριση που πραγματοποιήθηκαν μέσω βιοχημικών αναλύσεων. Οι δείκτες καταπόνησης που εξετάστηκαν είναι οι εξής: H₂O₂, προλίνη, και υπεροξειδωση λιπιδίων. Στον κάθετο άξονα φαίνεται η συγκέντρωση των δεικτών καταπόνησης σε μmol g⁻¹ και στον οριζόντιο άξονα οι 6 μεταχειρίσεις. Επιπλέον παρουσιάζεται το τυπικό σφάλμα και τα αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης για κάθε μεταχείριση. Στην Σχήμα 3 παρουσιάζονται οι τιμές συγκέντρωσης H₂O₂ των μαρουλιών ανά μεταχείριση. Η ταξινόμηση των πειραματικών επιφανειών με βάση τις τιμές συγκέντρωσης H₂O₂ από μεγαλύτερη προς μικρότερη συγκέντρωση ήταν Pb600 > Pb600bc > Pb300 > Pb300bc > C > Cbc. Οι μεταχειρίσεις Pb300 και Pb300bc είχαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των άλλων μεταχειρίσεων αλλά όχι μεταξύ τους. Στην Σχήμα 4 παρουσιάζονται οι τιμές συγκέντρωσης μαλονδιαλδεΐδη (MDA) των μαρουλιών που προκύπτουν από την υπεροξειδωση των λιπιδίων ανά μεταχείριση. Η ταξινόμηση των πειραματικών επιφανειών με βάση τις τιμές συγκέντρωσης H₂O₂ από μεγαλύτερη προς μικρότερη συγκέντρωση ήταν Pb600 > Pb600bc > Pb300 > Cbc > C > Pb300bc. Οι μεταχειρίσεις Pb600 και Pb600bc εμφάνισαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των άλλων μεταχειρίσεων αλλά όχι μεταξύ τους. Στην Σχήμα 5 παρουσιάζονται οι τιμές συγκέντρωσης προλίνης των μαρουλιών ανά μεταχείριση. Η ταξινόμηση των πειραματικών επιφανειών με βάση τις τιμές συγκέντρωσης προλίνης από μεγαλύτερη προς μικρότερη συγκέντρωση ήταν Pb600 > Pb600bc > Pb300 > Pb300bc > C > Cbc. Οι μεταχειρίσεις C και Cbc εμφάνισαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των άλλων μεταχειρίσεων αλλά όχι μεταξύ τους. Οι μεταχειρίσεις Pb300 και Pb300bc είχαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των άλλων μεταχειρίσεων αλλά όχι μεταξύ τους. Η μεταχείριση Pb600 είχε στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των άλλων μεταχειρίσεων. Η μεταχείριση Pb600bc είχε στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των άλλων μεταχειρίσεων.



Σχήμα 3: Οι μέσοι όροι των τιμών H₂O₂ (μmol g⁻¹) των μαρουλιών ανά μεταχείριση τα τυπικά τους σφάλματα και αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης. Οι μέσοι όροι των μεταχειρίσεων που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικώς μεταξύ τους (p<0,05)



Σχήμα 4: Οι μέσοι όροι των τιμών υπεροξείδωσης λιπιδίων (μmol g⁻¹) των μαρουλιών ανά μεταχείριση τα τυπικά τους σφάλματα και αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης. Οι μέσοι όροι των μεταχειρίσεων που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικώς μεταξύ τους (p<0,05)



Σχήμα 5: Οι μέσοι όροι των τιμών προλίνης ($\mu\text{mol g}^{-1}$) των μαρουλιών ανά μεταχείριση τα τυπικά τους σφάλματα και αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης. Οι μέσοι όροι των μεταχειρίσεων που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικώς μεταξύ τους ($p < 0,05$)

3.5 Φωτοσυνθετικές χρωστικές

Στα Σχήματα 6-9 παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των συγκεντρώσεων των φωτοσυνθετικών χρωστικών από 4 δείγματα ($n=4$) μαρουλιών ανά μεταχείριση. Οι φωτοσυνθετικές χρωστικές που εξετάστηκαν αποτελούν: χλωροφύλλη α, χλωροφύλλη β, ολική χλωροφύλλη, καροτενοειδή. Στον κάθετο άξονα φαίνεται η συγκέντρωση των δεικτών καταπόνησης σε $\mu\text{mol g}^{-1}$ και στον οριζόντιο άξονα οι 6 πειραματικές επιφάνειες των λυσιμέτρων. Επιπλέον παρουσιάζεται το τυπικό σφάλμα και τα αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης για κάθε μεταχείριση.

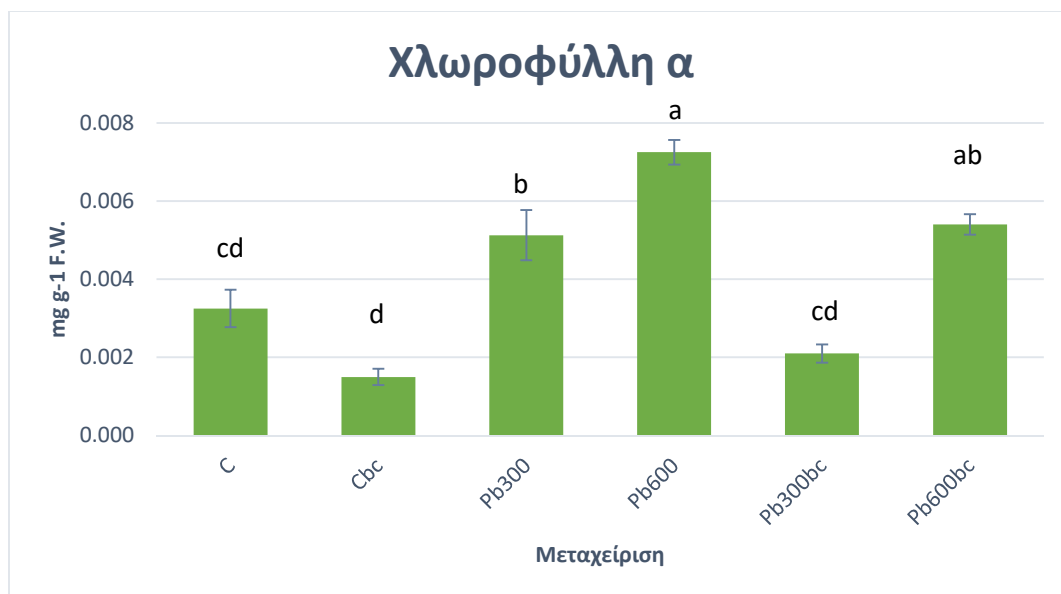
Στην Σχήμα 6 παρουσιάζονται οι τιμές συγκέντρωσης χλωροφύλλης α των μαρουλιών ανά μεταχείριση. Η ταξινόμηση των πειραματικών επιφανειών με βάση τις τιμές συγκέντρωσης χλωροφύλλης α από μεγαλύτερη προς μικρότερη συγκέντρωση ήταν $\text{Pb600} > \text{Pb600bc} > \text{Pb300} > \text{C} > \text{Pb300bc} > \text{Cbc}$. Οι μεταχειρίσεις C και Pb300bc είχαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των άλλων μεταχειρίσεων αλλά όχι μεταξύ τους και εκτός της μεταχείρισης Cbc. Η μεταχείριση Pb600bc εμφάνισε στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων C, Cbc και Pb300bc. Η μεταχείριση Cbc είχε στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων και Pb300, Pb600 και Pb600bc.

Στην Σχήμα 7 παρουσιάζονται οι τιμές συγκέντρωσης χλωροφύλλης β των μαρουλιών ανά μεταχείριση. Η ταξινόμηση των πειραματικών επιφανειών με βάση τις τιμές συγκέντρωσης χλωροφύλλης β από

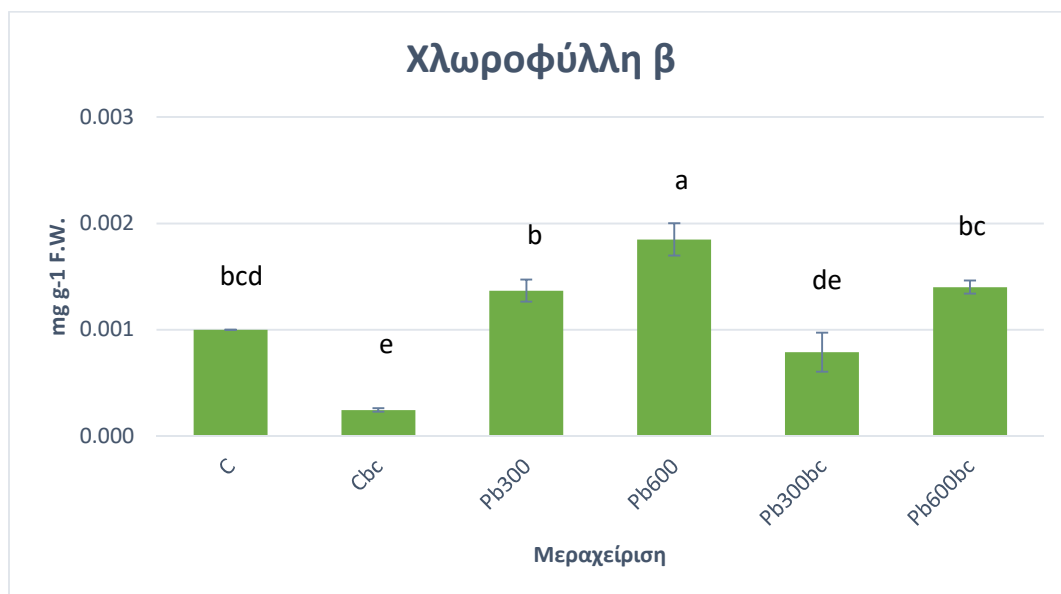
μεγαλύτερη προς μικρότερη συγκέντρωση ήταν $Pb600 > Pb600bc > Pb300 > Pb300bc > C > Cbc$. Η μεταχείριση C είχε στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων Cbc και Pb600. Η μεταχείριση Cbc είχε στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ όλων των μεταχειρίσεων εκτός της μεταχείρισης Pb300bc. Η μεταχείριση Pb300 είχε στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων Cbc, Pb300bc και Pb600. Η μεταχείριση Pb600 είχε στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ όλων των μεταχειρίσεων. Η μεταχείριση Pb300bc είχε στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων Pb300, Pb300bc και Pb600. Η μεταχείριση Pb600bc είχε στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων Cbc, Pb300bc και Pb600.

Στην Σχήμα 8 παρουσιάζονται οι τιμές συγκέντρωσης ολικής χλωροφύλλης των μαρουλιών ανά μεταχείριση. Η ταξινόμηση των πειραματικών επιφανειών με βάση τις τιμές συγκέντρωσης ολικής χλωροφύλλης από μεγαλύτερη προς μικρότερη συγκέντρωση ήταν $Pb600 > Pb300 > Pb600bc > C > Pb300bc > Cbc$. Οι μεταχειρίσεις C και Pb300bc είχαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων Cbc και Pb600. Η μεταχείριση Cbc είχε στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ όλων των μεταχειρίσεων. Οι μεταχειρίσεις Pb300 και Pb600bc είχαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μόνο με την μεταχείριση Cbc. Η μεταχείριση Pb600 είχε στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων C, Cbc και Pb300bc.

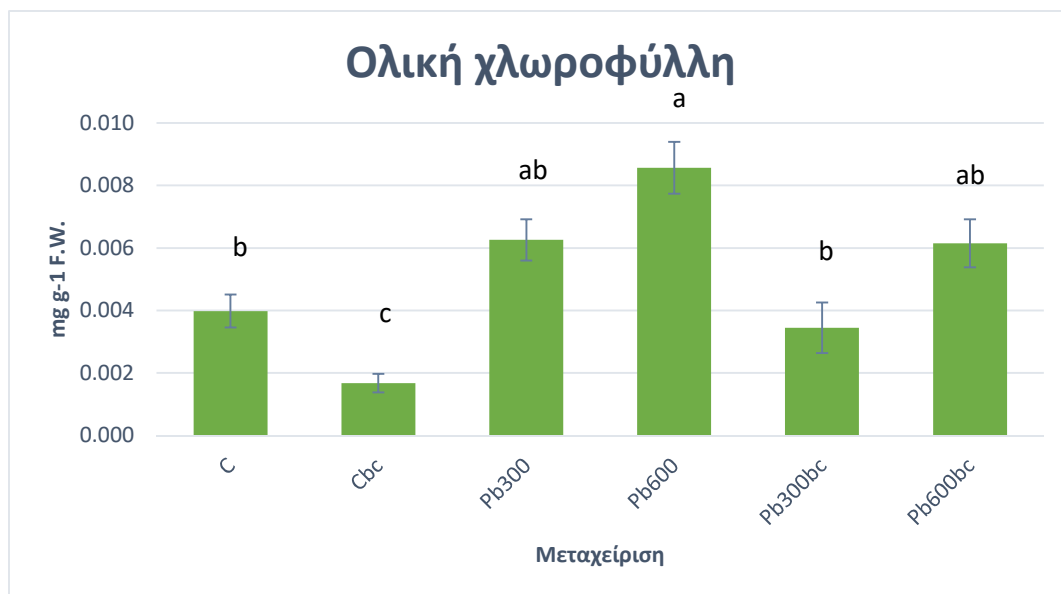
Στην Σχήμα 9 παρουσιάζονται οι τιμές συγκέντρωσης σε καροτενοειδή των μαρουλιών ανά μεταχείριση. Η ταξινόμηση των πειραματικών επιφανειών με βάση τις τιμές σε συγκέντρωσης καροτενοειδή από μεγαλύτερη προς μικρότερη συγκέντρωση ήταν $Pb600 > Pb600bc > Pb300 > C > Pb300bc > Cbc$. Η μεταχείριση C και Pb300bc είχε στατιστικώς σημαντικές διαφορές με την μεταχείριση Pb600 και Pb600bc. Η μεταχείριση Cbc είχε στατιστικώς σημαντικές διαφορές με τις μεταχειρίσεις Pb300, Pb600 και Pb600bc. Η μεταχείριση Pb300 είχε στατιστικώς σημαντικές διαφορές μόνο με τη μεταχείριση Cbc. Η μεταχείριση Pb600 είχε στατιστικώς σημαντικές διαφορές με τις μεταχειρίσεις C, Cbc και Pb300bc. Η μεταχείριση Pb600bc είχε στατιστικώς σημαντικές διαφορές με τις μεταχειρίσεις C, Cbc και Pb300bc.



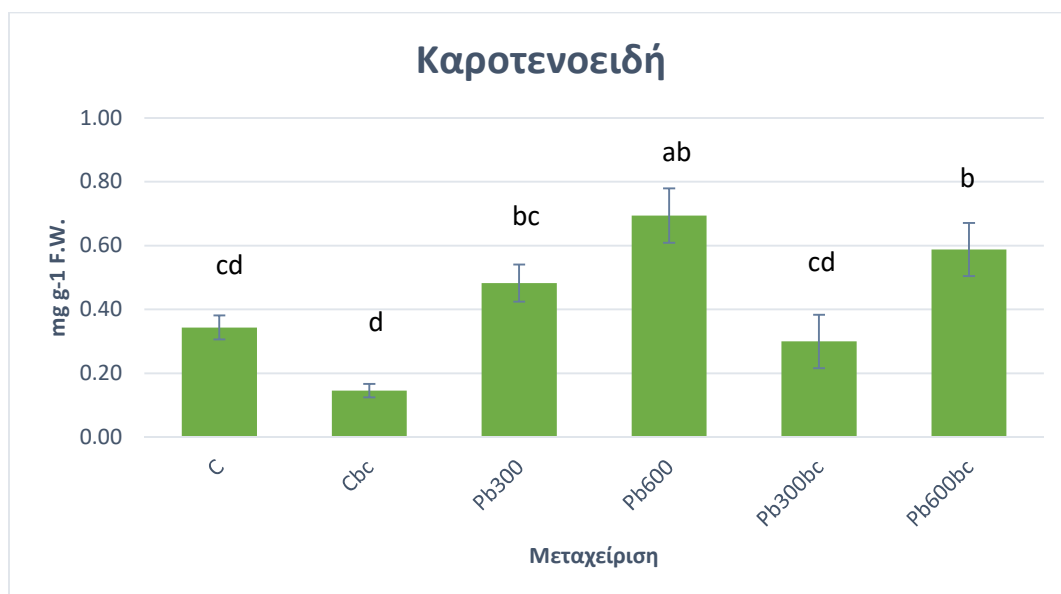
Σχήμα 6: Οι μέσοι όροι των τιμών χλωροφύλλης α ($\mu\text{mol g}^{-1}$) των μαρουλιών ανά μεταχείριση τα τυπικά τους σφάλματα και αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης. Οι μέσοι όροι των μεταχειρίσεων που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικώς μεταξύ τους ($p < 0,05$).



Σχήμα 7: Οι μέσοι όροι των τιμών χλωροφύλλης β ($\mu\text{mol g}^{-1}$) των μαρουλιών ανά μεταχείριση τα τυπικά τους σφάλματα και αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης. Οι μέσοι όροι των μεταχειρίσεων που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικώς μεταξύ τους ($p < 0,05$).



Σχήμα 8: Οι μέσοι όροι των τιμών ολικής χλωροφύλλης ($\mu\text{mol g}^{-1}$) των μαρουλιών ανά μεταχείριση τα τυπικά τους σφάλματα και αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης. Οι μέσοι όροι των μεταχειρίσεων που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικώς μεταξύ τους ($p < 0,05$).



Σχήμα 9: Οι μέσοι όροι των τιμών καροτενοειδών ($\mu\text{mol g}^{-1}$) των μαρουλιών ανά μεταχείριση τα τυπικά τους σφάλματα και αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης. Οι μέσοι όροι των μεταχειρίσεων που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικώς μεταξύ τους ($p < 0,05$).

4. Συζήτηση

Οι παράμετροι ύψους x πλάτους και ξηρής βιομάζας των φυτών δεν επηρεάστηκαν από την προσθήκη Pb στο έδαφος, καθώς δεν έδειξαν να διαφέρουν σημαντικά με το μάρτυρα χωρίς βιοεξανθράκωμα. Σημαντική μείωση δεν παρατηρήθηκε ούτε στην χορήγηση των 600 mg/kg Pb χωρίς βιοεξανθράκωμα. Αυτό ενδεχομένως οφείλεται στο γεγονός ότι ο Pb δεν προστέθηκε σε πολύ υψηλή συγκέντρωση έτσι ώστε να επηρεάσει τις αναπτυξιολογικές παραμέτρους του μαρουλιού. Πράγματι, αυτό το εύρημα συμφωνεί με τους Antoniadis et al. (2017), οι οποίοι σε ένα έδαφος με υψηλή αρχική συγκέντρωση, παρόμοια με την δική μας υψηλή χορήγηση, βρήκαν ότι δεν υπήρχε μείωση στην βιομάζα σε φυτά μαρουλιού. Παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές όσο αφορά το ύψος και πλάτος των μαρουλιών μόνο στις μεταχειρίσεις μάρτυρα (Cbc), ενώ οι υπόλοιπες μεταχειρίσεις δεν εμφάνισαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές. Επίσης φαίνεται ότι στο ξηρό βάρος η μεταχείριση Cbc εμφανίζει στατιστικώς σημαντικές διαφορές με τις άλλες μεταχειρίσεις, ενώ οι υπόλοιπες μεταχειρίσεις είναι χωρίς διαφορές. Με την χορήγηση βιοεξανθρακώματος στο έδαφος, αυξήθηκε σημαντικά η βιομάζα και το ύψος του μαρουλιού. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στην επιπλέον χορήγηση θρεπτικών που εμπεριέχονται στο βιοεξανθράκωμα. Αυτό συμφωνεί με τους Carter et al. (2013), οι οποίοι βρήκαν παρόμοια αύξηση βιομάζας με την απλή χορήγηση βιοεξανθρακώματος στο έδαφος: Σε πείραμα που διεξήγαγαν με την προσθήκη βιοεξανθρακώματος σε μοσχεύματα μαρουλιών (*Lactuca sativa*) και κινέζικου λάχανου (*Brassica chinensis*), διαπιστώσαν ότι με την εφαρμογή βιοεξανθρακώματος αυξήθηκε η τελική βιομάζα των φυτών, η βιομάζα των ριζών, το ύψος του φυτού και ο αριθμός των φύλλων σε σύγκριση με τις τα φυτά στα οποία δεν χορηγήθηκε βιοεξανθράκωμα.

Η υγρασία των φυτών δεν μεταβλήθηκε με την προσθήκη Pb στο έδαφος, καθώς δεν διέφεραν σημαντικά τα ποσοστά υγρασίας μεταξύ των μεταχειρίσεων και του μάρτυρα. Πρόκειται για μια παράμετρο που αποτελεί πιθανό δείκτη καταπόνησης. Μείωση δεν παρατηρήθηκε ούτε στην χορήγηση 300 mg/kg Pb και 600 mg/kg Pb χωρίς βιοεξανθράκωμα. Σύμφωνα με τους Barceló and Poschenrieder (1990) και Patra et al. (2004), η έκθεση φυτών σε συγκεντρώσεις μόλυβδου οδηγούν σε μείωση της διαπνοής καθώς και σε μείωση της περιεκτικότητάς τους σε υγρασία. Η μειωμένη διαπνοή μπορεί να προκύψει από την μείωση επιφάνειας των φύλλων, λόγω της μείωσης της ανάπτυξης τους. Ενδεχόμενος να μην παρατηρήθηκε μείωση της περιεκτικότητας της υγρασίας στα δικά μας φυτά, αφού δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές όσο αφορά τις παραμέτρους ύψους x πλάτους και ξηρής βιομάζας μεταξύ των μεταχειρίσεων.

Η στοματική αγωγιμότητα

επηρεάστηκε από την προσθήκη Pb στο έδαφος, καθώς διέφεραν στατιστικά σημαντικά οι μεταχειρίσεις με το μάρτυρα χωρίς βιοεξανθράκωμα. Η προσθήκη μόλυβδου ανεξάρτητα με την χορήγηση βιοεξανθρακώματος μείωσε την στοματική αγωγιμότητα των φυτών, αποδεικνύοντας την παρουσία

καταπόνησης στα φυτά. Η στοματική αγωγιμότητα στην μεταχείριση του μάρτυρα με βιοεξανθράκωμα (Cbc) δεν παρουσίασε στατιστικώς σημαντική διαφορά με τις άλλες μεταχειρίσεις, κάτι που αποτελεί μη αναμενόμενο εύρημα, αφού δεν φαίνεται να συμφωνεί με την βιβλιογραφία. Η μεταχείριση του μάρτυρα χωρίς βιοεξανθράκωμα εμφανίζει στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των άλλων μεταχειρίσεων. Πράγματι, αυτό το εύρημα συμφωνεί με τους Parys et al. (1998), οι οποίοι μελέτησαν την φωτοσύνθεση και ρυθμό διαπνοής φύλλων μπιζελιού (*Pisum sativum* L.), τα οποία εκτέθηκαν σε διάλυμα $Pb(NO_3)_2$. Σύμφωνα με τα ευρήματα τους, η παρουσία ιόντων Pb^{2+} οδηγεί σε κλείσιμο των στομάτων των φυτών. Αυτό συμβαίνει γιατί η παρουσία ιόντων Pb^{2+} προκαλεί μεγάλη συσσώρευση αποσυστικού οξέως στις ρίζες και μέρη του εναέριου φυτού, το οποίο αποτελεί φυτοορμόνη και ελέγχει το άνοιγμα/κλείσιμο των στομάτων των φυτών. Έτσι, το στοματικό κλείσιμο περιορίζει δραματικά την ανταλλαγή αερίων με την ατμόσφαιρα και την απώλεια νερού μέσω της διαπνοής. Με το εύρημα αυτό συμφωνούν επίσης οι Weryszko et al (2005), οι οποίοι βρήκαν μείωση της στοματικής αναπνοής σε φύλλα σόγιας (*Glycine max* L.) με την έκθεση των φυτών σε μόλυβδο ($PbCl_2$). Σύμφωνα με τα ευρήματα τους, η αναπνοή στα φύλλα των φυτών μειώνεται λόγω (α) της έκθεσης στον μόλυβδο, (β) του γεγονότος ότι επηρεάζεται η εναπόθεση ενός στρώματος επιδερμίδας στις επιφάνειες των φύλλων, καθώς (γ) της πρόκλησης αναπνευστικών διαταραχών λόγω ανισορροπίας του λόγου CO_2/O_2 στα φυτά.

Η συγκέντρωση μόλυβδου στα φυτά μαρουλιού επηρεάστηκε από την προσθήκη Pb στο έδαφος. Στις μεταχειρίσεις με βιοεξανθράκωμα παρατηρήθηκε μια τάση μείωσης στην συγκέντρωση μόλυβδου στα φυτά η οποία όμως δεν ήταν στατιστικώς σημαντική. Αυτό ενδεχομένως οφείλεται στο γεγονός ότι μπορεί η ιοντοεναλλακτική ικανότητα του βιοεξανθρακώματος να ήταν σχετικά χαμηλή ή να χρειαζόταν προσθήκη μεγαλύτερης ποσότητας βιοεξανθρακώματος. Τα ανώτατα επιτρεπτά επίπεδα συγκέντρωσης μόλυβδου σύμφωνα με τον Κανονισμό 1881/2006/EK είναι 0,30 mg/kg νωπού βάρους (περίπου ίσα με 3,0 mg/kg ξηρού βάρους για υγρασία ιστού ίση με 90%). Στις μεταχειρίσεις με προσθήκη 300 mg/kg Pb και 600 mg/kg Pb, ξεπεράστηκε το συγκεκριμένο ανώτατο επιτρεπτό όριο στα φύλλα μαρουλιού. Πράγματι, αυτό το εύρημα συμφωνεί με τους Malar et al. (2014) και τους Antoniadis et al. (2017).

Η συγκέντρωση μόλυβδου στο έδαφος επίσης επηρεάστηκε από την προσθήκη Pb στο έδαφος. Η τάση που παρατηρήθηκε ήταν η μείωση της συγκέντρωσης μόλυβδου με το βάθος. Ασφαλές επιτρεπτό επίπεδο συγκέντρωσης μόλυβδου στο έδαφος αποτελούν τα 600 mg/kg (Madhavan et al., 1989). Σύμφωνα με τους Cohen et al. (2012), από την συλλογή δειγμάτων από μεγάλο τμήμα της Κύπρου, ο μέσος όρος συγκέντρωσης μόλυβδου στα 0-25 cm ήταν 11 mg/kg και στα 25-50 cm 7 mg/kg. Γενικά, οι συγκεντρώσεις μόλυβδου στο έδαφος ήταν σε ασφαλές επιτρεπτό επίπεδο συγκέντρωσης, εκτός από το δείγμα που συλλέχθηκε στην μεταχείριση Pb600bc στα 0-25 cm, η οποία ήταν πολύ υψηλή λόγω του συγκεκριμένου

δείγματος το οποίο πιθανόν να περιείχε βιοεξανθράκωμα που είχε δεσμεύσει Pb. Στα 0-25 cm βάθος η συγκέντρωση μόλυβδου ήταν πολύ υψηλή. Στα 26-50 cm βάθος η συγκέντρωση μολυβδου μειώθηκε ενώ στα 51-75 cm οι συγκεντρώσεις μόλυβδου στο έδαφος ήταν πολύ χαμηλές και κάτω από το όριο ανίχνευσης. Πράγματι, αυτό το εύρημα συμφωνεί με τους Atafar et al. (2010): πράγματι, ο μόλυβδος αποτελεί αργοκίνητο μέταλλο, έτσι οι συγκεντρώσεις του ανά βάθος είναι αναμενόμενο να μειώνονται. Όσο αφορά τη συγκέντρωση μόλυβδου στο έκπλυμα επηρεάστηκε από την προσθήκη Pb στο έδαφος. Ασφαλές επιτρεπτό επίπεδο συγκέντρωσης μόλυβδου στο νερό αποτελούν τα 10 µg/L (ppb). Παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης μόλυβδου στις μεταχειρίσεις με βιοεξανθράκωμα, ενδεχομένως λόγω της δέσμευσης του μόλυβδου σε αυτό (Vilagines and Leroy, 1995).

Η συγκέντρωση H₂O₂ στα φυτά επηρεάστηκε από την προσθήκη Pb στο έδαφος, καθώς στις μεταχειρίσεις με προσθήκη μόλυβδου παρατηρήθηκε αύξηση επιπέδων H₂O₂. Μεγαλύτερη αύξηση παρατηρήθηκε στην χορήγηση 600 mg/kg Pb χωρίς βιοεξανθράκωμα. Στις μεταχειρίσεις με βιοεξανθράκωμα δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των μεταχειρίσεων με προσθήκη μόλυβδου, γιατί πιθανόν να χρειαζόταν προσθήκη μεγαλύτερης ποσότητας βιοεξανθρακώματος. Πράγματι, αυτό το εύρημα συμφωνεί με τους Jing et al. (2007), οι οποίοι με την προσθήκη μόλυβδου παρατήρησαν αύξηση στη συγκέντρωση επιπέδων H₂O₂ σε φυτά ρυζιού, το οποίο λειτουργεί ως κεντρικός παράγοντας μονοπατιών μεταγωγής σήματος στα φυτά. Αυτά τα μονοπάτια ενεργοποιούν πολλαπλές αποκρίσεις που ενισχύουν την αντίσταση σε διάφορους στρεσογόνους παράγοντες, όπως συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων.

Η συγκέντρωση μαλονδιαλδεϋδης (MDA) στα φυτά επηρεάστηκε από την προσθήκη Pb στο έδαφος, καθώς με την χορήγηση 600 mg/kg Pb παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση. Στις μεταχειρίσεις με βιοεξανθράκωμα δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά με προσθήκη μόλυβδου γιατί πιθανόν να χρειαζόταν προσθήκη μεγαλύτερης ποσότητας βιοεξανθρακώματος. Πράγματι, αυτό το εύρημα συμφωνεί με τους Singh et al. (2010), οι οποίοι με την χορήγηση μόλυβδου σε φυτά *Najas indica* παρατήρησαν αυξημένα επίπεδα υπεροξειδίων των λιπιδίων από τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, καθώς και αύξηση συγκέντρωσης μαλονδιαλδεϋδης (MDA), η οποία αποτελεί προϊόν διάσπασης των ασταθών υπεροξειδίων των λιπιδίων. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί επίσης με τους Verma and Dubey (2003), οι οποίοι με την χορήγηση Pb(NO₃)₂ σε φυτά ρυζιού (*Oryza sativa* L.) βρήκαν αυξημένα επίπεδα υπεροξειδίων λιπιδίων με ταυτόχρονη αύξηση των δραστηριοτήτων των ενζύμων υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD), υπεροξειδάσης γουαϊακόλης, ασκορβικής υπεροξειδάσης και αναγωγάσης γλουταθειόνης σε σύγκριση με τους μάρτυρες.

Όσο αφορά την προλίνη, αυξήθηκε με την χορήγηση 300 mg/kg Pb και 600 mg/kg Pb παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση. Στις μεταχειρίσεις με βιοεξανθράκωμα δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των μεταχειρίσεων με προσθήκη μόλυβδου. Πράγματι, αυτό το εύρημα συμφωνεί με τους Qureshi et al. (2007), οι οποίοι βρήκαν αύξηση επιπέδων ελεύθερης προλίνης σε φυτά *Cassia angustifolia* με την χορήγηση μόλυβδου. Η αύξηση συσσώρευσης προλίνης συμβαίνει ως απόκριση στην καταπόνηση: Η προλίνη βοηθά στην απενεργοποίηση των ελεύθερων ριζών, δρα ως πηγή ενέργειας και αζώτου, ρυθμίζει τα εν δυνάμει δυναμικά κάτω από συνθήκες καταπόνησης και αποτελεί σημαντικό συστατικό των πρωτεϊνών στα κυτταρικά τοιχώματα.

Όσο αφορά την χλωροφύλλη a, χλωροφύλλη b και ολική χλωροφύλλη (a+b), αυξήθηκαν με την χορήγηση 300 mg/kg Pb και 600 mg/kg Pb. Γενικά τα επίπεδα χλωροφύλλης στις μεταχειρίσεις με βιοεξανθράκωμα ήταν μειωμένα σε σύγκριση με τις μεταχειρίσεις με μόνο μόλυβδο. Αναμέναμε τα ποσοστά χλωροφυλλών να μειωθούν, ωστόσο τα αποτελέσματα των μετρήσεων δεν συμφωνούν με τα αναμενόμενα. Το εύρημα δεν συμφωνεί με τους Xiong et al. (2006), οι οποίοι με την χορήγηση μόλυβδου σε κινέζικα λάχανα (*Brassica pekinensis*) παρατήρησαν μείωση των χλωροφυλλών και ιδιαίτερα μείωση στην χλωροφύλλη b ως πιο ευαίσθητης λόγω αναστολής της φωτοσύνθεσης που προκύπτει από έμμεσες επιδράσεις του μολύβδου στα φυτά. Με την παραπάνω έρευνα συμφωνεί επίσης ο Bharwana et al (2013), ο οποίος με την χορήγηση μόλυβδου σε φυτά βαμβακιού παρατήρησε μείωση στα επίπεδα χλωροφύλλης a, χλωροφύλλης b και ολικής χλωροφύλλης, κάτι που προκάλεσε αναστολή της φωτοσύνθεσης. Η αναστολή της φωτοσύνθεσης προκύπτει από έμμεσες επιδράσεις του μόλυβδου. Αυτές οι επιδράσεις είναι η παραμόρφωση της δομής του χλωροπλάστη λόγω συγγένειας με υπομονάδες N και S των πρωτεϊνών, η μειωμένη δραστηριότητα φερρεδοξίνης NADP⁺ ρεδοκτάσης και δελταμινολεβουλινικού οξέος (ALAD) στην αρχή της αναστολής σύνθεσης χλωροφύλλης, η αναστολή της σύνθεσης πλαστοκινόνης και καρροτενοειδών, η απόφραξη του συστήματος μεταφοράς ηλεκτρονίων, η ανεπαρκής συγκέντρωση διοξειδίου του άνθρακα λόγω κλείσιμου των στομάτων, η διαταραγμένη πρόσληψη βασικών στοιχείων όπως τα Mn και Fe, η αποκατάσταση δισθενών κατιόντων από τον μόλυβδο, η αναστολή της ενζυματικής κατάλυσης του κύκλου Calvin, και αυξημένη δραστηριότητα χλωροφυλλάσης (Pourrut et al., 2011). Επίσης, αντίθετα με τα δικά μας ευρήματα, σύμφωνα με τους Xu et al. (2015), η χορήγηση βιοεξανθρακώματος οδήγησε σε αύξηση του ρυθμού φωτοσύνθεσης και κατ' επέκταση σε αύξηση των επιπέδων χλωροφύλλης.

Παρόμοια, οι συγκεντρώσεις καρροτενοειδών στα φυτά αυξήθηκαν με την χορήγηση 300 mg/kg Pb και 600 mg/kg Pb. Στις μεταχειρίσεις με βιοεξανθράκωμα δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των μεταχειρίσεων με προσθήκη μόλυβδου. Αυτό το εύρημα συμφωνεί με τους Kumar et al. (2012),

οι οποίοι χορήγησαν μόλυβδο σε φυτά *Talinum triangulare* και παρατήρησαν αύξηση καροτενοειδών, ως αρχική απόκριση στην τοξικότητα του μόλυβδου, αφού τα καροτενοειδή δρούν ως αντιοξειδωτικά ενάντια στις ελεύθερες ρίζες και τις φωτοχημικές βλάβες. Ωστόσο, σύμφωνα με τους Roberts et al. (2014), συνήθως τα επίπεδα καροτενοειδών μπορεί να αυξηθούν ως απόκριση λίγο μετά την πρόσληψη των φυτών του Pb, αλλά συνήθως στην συνέχεια τα επίπεδα των καροτενοειδών στα φυτά μειώνονται. Αυτό δεν συμφωνεί με τα δικά μας ευρήματα και αυτό ενδεχομένως να δείχνει ότι για να εξάγουμε ασφαλέστερα συμπεράσματα θα έπρεπε να χορηγηθεί ο μόλυβδος για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

Φαινοτυπικά, στα φυτά μαρουλιού παρατηρήθηκε μείωση έντονου πράσινου χρώματος και εμφάνιση στιγμάτων κυρίως στις μεταχειρίσεις που χορηγήθηκε 600 mg/kg Pb χωρίς βιοεξανθράκωμα. Σύμφωνα με τους Harpaz-Saad et al. (2007), η απώλεια τυπικού πράσινου χρώματος χλωροφύλλης συμβαίνει λόγω διάσπασης δακτυλίου πορφυρίνης, η οποία αποτελεί προϊόν της διάσπασης της χλωροφύλλης μέσω της χλωροφυλλάσης λόγω της τοξικότητας του μόλυβδου. Επιπλέον πιθανόν η εμφάνιση στιγμάτων στα παλαιότερα (κάτω) φύλλα μαρουλιών να οφείλεται στο γεγονός ότι ο μόλυβδος αποτελεί ένα μη ευκίνητο μέταλλο το οποίο μεταφέρεται μέσω του ξυλώματος των φυτών από τις ρίζες στους βλαστούς και τελικά καταλήγει στα φύλλα (Sharma and Dubey., 2005).

5. Συμπεράσματα

- Η προσθήκη Pb στο έδαφος επηρέασε σημαντικά την συγκέντρωση Pb στα φύλλα των μαρουλιών. Τα ανώτατα επιτρεπτά επίπεδα συγκέντρωσης μόλυβδου στα φυλλώδη λαχανικά σύμφωνα με τον Κανονισμό 1881/2006/EK είναι 0,30 mg/kg ξηρού βάρους, επίπεδο το οποίο στις μεταχειρίσεις με προσθήκη 300 mg/kg Pb και 600 mg/kg Pb ξεπεράστηκε.
- Η χορήγηση 300 mg kg⁻¹ και 600 mg kg⁻¹ Pb στο έδαφος δεν επηρέασε σημαντικά τις αναπτυξιολογικές παραμέτρους των φυτών μαρουλιού (*Lactuca sativa*). Ωστόσο, οι δείκτες καταπόνησης, στοματικής αγωγιμότητας, καροτενοειδών και παρατήρηση συγκεκριμένων φαινοτυπικών χαρακτηριστικών (χρώμα, παρουσία στιγμάτων) αποδεικνύουν την πρόκληση καταπόνησης στα φυτά μετά από την χορήγηση των συγκεκριμένων συγκεντρώσεων Pb.
- Η χορήγηση βιοεξανθράκωματος στο έδαφος αύξησε σημαντικά τη βιομάζα και το ύψος των μαρουλιών, πιθανόν λόγω της επιπλέον χορήγησης θρεπτικών που εμπεριέχονται στο βιοεξανθράκωμα. Ωστόσο, η προσθήκη βιοεξανθράκωματος δεν επηρέασε σημαντικά τη στοματική αγωγιμότητα, τους δείκτες καταπόνησης και τα καροτενοειδή, ενώ στις μεταχειρίσεις με βιοεξανθράκωμα παρατηρήθηκε μια τάση μείωσης στην συγκέντρωση μόλυβδου στα φυτά η οποία όμως δεν καθίστανται στατιστικώς σημαντική.

- Συμπεραίνουμε ότι εδάφη με επίπεδα Pb στα 600 mg/kg προκαλούν καταπόνηση σε φυτά μαρουλιού, τα οποία, λόγω της συγκέντρωσης επικίνδυνα υψηλών συγκεντρώσεων Pb, δεν μπορούν πλέον να καταναλωθούν.

6.Βιβλιογραφία

Abadin, H., Ashizawa, A., Stevens, Y., Lladós, F., Diamond, G. & Sage, G. 2016, *Toxicological Profile for Lead. Atlanta (GA): Agency for Toxic Substances and Disease Registry (US); Aug, 2007.*

Ahmed, A. & Tajmir-Riahi, H. 1993, "Interaction of toxic metal ions Cd²⁺, Hg²⁺, and Pb²⁺ with light-harvesting proteins of chloroplast thylakoid membranes. An FTIR spectroscopic study", *Journal of inorganic biochemistry*, vol. 50, no. 4, pp. 235-243.

Alloway, B. 1995, "Heavy metals in soils. Blackie Academic and Professional", *An Imprint of Chapman & Hall. Glasgow, .*

Antoniadis, V., Shaheen, S.M., Boersch, J., Frohne, T., Du Laing, G. & Rinklebe, J. 2017, "Bioavailability and risk assessment of potentially toxic elements in garden edible vegetables and soils around a highly contaminated former mining area in Germany", *Journal of environmental management*, vol. 186, pp. 192-200.

Arazi, T., Sunkar, R., Kaplan, B. & Fromm, H. 1999, "A tobacco plasma membrane calmodulin-binding transporter confers Ni²⁺ tolerance and Pb²⁺ hypersensitivity in transgenic plants", *The Plant Journal*, vol. 20, no. 2, pp. 171-182.

Arnon, D.I. 1949, "Copper Enzymes in Isolated Chloroplasts. Polyphenoloxidase in Beta Vulgaris", *Plant Physiology*, vol. 24, no. 1, pp. 1-15.

Atafar, Z., Mesdaghinia, A., Nouri, J., Homaei, M., Yunesian, M., Ahmadimoghaddam, M. & Mahvi, A.H. 2010, "Effect of fertilizer application on soil heavy metal concentration", *Environmental monitoring and assessment*, vol. 160, no. 1, pp. 83-89.

Barceló, J. & Poschenrieder, C. 1990, "Plant water relations as affected by heavy metal stress: a review", *Journal of Plant Nutrition*, vol. 13, no. 1, pp. 1-37.

Bates, L., Waldren, R. Teare I 1973, "Rapid determination of free proline for water-stress studies", *Plant and Soil*, vol. 39, no. 1, pp. 205-207.

Beesley, L., Moreno-Jiménez, E., Gomez-Eyles, J.L., Harris, E., Robinson, B. & Sizmur, T. 2011, "A review of biochars' potential role in the remediation, revegetation and restoration of contaminated soils", *Environmental pollution*, vol. 159, no. 12, pp. 3269-3282.

Bharwana, S., Ali, S., Farooq, M., Iqbal, N., Abbas, F. & Ahmad, M. 2013, "Alleviation of lead toxicity by silicon is related to elevated photosynthesis, antioxidant enzymes suppressed lead uptake and oxidative stress in cotton", *J.Bioremed.Biodeg.*, vol. 4, no. 4, pp. 187.

Bian, R., Joseph, S., Cui, L., Pan, G., Li, L., Liu, X., Zhang, A., Rutledge, H., Wong, S. & Chia, C. 2014, "A three-year experiment confirms continuous immobilization of cadmium and lead in contaminated paddy field with biochar amendment", *Journal of hazardous materials*, vol. 272, pp. 121-128.

Carter, S., Shackley, S., Sohi, S., Suy, T.B. & Haefele, S. 2013, "The impact of biochar application on soil properties and plant growth of pot grown lettuce (*Lactuca sativa*) and cabbage (*Brassica chinensis*)", *Agronomy*, vol. 3, no. 2, pp. 404-418.

Cecchi, M., Dumat, C., Alric, A., Felix-Faure, B., Pradère, P. & Guiesse, M. 2008, "Multi-metal contamination of a calcic cambisol by fallout from a lead-recycling plant", *Geoderma*, vol. 144, no. 1-2, pp. 287-298.

Cenkci, S., Ciğerci, İ.H., Yıldız, M., Özay, C., Bozdağ, A. & Terzi, H. 2010, "Lead contamination reduces chlorophyll biosynthesis and genomic template stability in *Brassica rapa* L.", *Environmental and experimental botany*, vol. 67, no. 3, pp. 467-473.

Chatterjee, C., Dube, B., Sinha, P. & Srivastava, P. 2004, "Detrimental effects of lead phytotoxicity on growth, yield, and metabolism of rice", *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, vol. 35, no. 1-2, pp. 255-265.

Choudhury, S. & Panda, S.K. 2005, "Toxic effects, oxidative stress and ultrastructural changes in moss *Taxithelium nepalense* (Schwaegr.) Broth. under chromium and lead phytotoxicity", *Water, air, and soil pollution*, vol. 167, no. 1, pp. 73-90.

Christou, A., Manganaris, G.A., Papadopoulos, I. & Fotopoulos, V. 2013, "Hydrogen sulfide induces systemic tolerance to salinity and non-ionic osmotic stress in strawberry plants through modification of reactive species biosynthesis and transcriptional regulation of multiple defence pathways", *Journal of experimental botany*, vol. 64, no. 7, pp. 1953-1966.

Cohen, D.R., Rutherford, N.F., Morisseau, E. & Zissimos, A.M. 2012, "Geochemical patterns in the soils of Cyprus", *Science of the Total Environment*, vol. 420, pp. 250-262.

Concha, G., Eneroth, H., Hallström, H. & Sand, S. 2013, "Contaminants and minerals in foods for infants and young children", *National Food Agency: Uppsala, Sweden*, .

Cui, L., Pan, G., Li, L., Bian, R., Liu, X., Yan, J., Quan, G., Ding, C., Chen, T. & Liu, Y. 2016, "Continuous immobilization of cadmium and lead in biochar amended contaminated paddy soil: a five-year field experiment", *Ecological Engineering*, vol. 93, pp. 1-8.

Davidson, C.I. & Rabinowitz, M. 1992, "Lead in the environment: from sources to human receptors", *Human lead exposure*, , pp. 65-86.

De Gara, L., Locato, V., Dipierro, S. & de Pinto, M.C. 2010, "Redox homeostasis in plants. The challenge of living with endogenous oxygen production", *Respiratory Physiology & Neurobiology*, vol. 173, pp. S13-S19.

Dey, S.K., Dey, J., Patra, S. & Pothal, D. 2007, "Changes in the antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in wheat seedlings exposed to cadmium and lead stress", *Brazilian Journal of Plant Physiology*, vol. 19, no. 1, pp. 53-60.

Dongre, N.N., Suryakar, A.N., Patil, A.J., Ambekar, J.G. & Rathi, D.B. 2011, "Biochemical effects of lead exposure on systolic & diastolic blood pressure, heme biosynthesis and hematological parameters in automobile workers of north karnataka (India)", *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, vol. 26, no. 4, pp. 400-406.

Emsley, J. 2011, *Nature's building blocks: an AZ guide to the elements*, Oxford University Press.

Emsley, J. 2011, *Nature's building blocks: an AZ guide to the elements*, Oxford University Press.

Flora, S. 2002, "Nutritional components modify metal absorption, toxic response and chelation therapy", *Journal of nutritional & environmental medicine*, vol. 12, no. 1, pp. 53-67.

Garland, C. & Wilkins, D. 1981, "Effect of calcium on the uptake and toxicity of lead in *Hordeum vulgare* L. and *Festuca ovina* L.", *New Phytologist*, vol. 87, no. 3, pp. 581-593.

Gopal, R. & Rizvi, A.H. 2008, "Excess lead alters growth, metabolism and translocation of certain nutrients in radish", *Chemosphere*, vol. 70, no. 9, pp. 1539-1544.

Gopal, R. & Rizvi, A.H. 2008, "Excess lead alters growth, metabolism and translocation of certain nutrients in radish", *Chemosphere*, vol. 70, no. 9, pp. 1539-1544.

Grover, P., Rekhadevi, P., Danadevi, K., Vuyyuri, S., Mahboob, M. & Rahman, M. 2010, "Genotoxicity evaluation in workers occupationally exposed to lead", *International journal of hygiene and environmental health*, vol. 213, no. 2, pp. 99-106.

Gunduz, S., Uygur, F.N. & Kahramanoğlu, I. 2012, "Heavy metal Phytoremediation potentials of *Lepidum sativum* L., *Lactuca sativa* L., *Spinacia oleracea* L. and *Raphanus sativus* L", *Her.J.Agric.Food Sci.Res*, vol. 1, pp. 1-5.

Gupta, D., Huang, H., Yang, X., Razafindrabe, B. & Inouhe, M. 2010, "The detoxification of lead in *Sedum alfredii* H. is not related to phytochelatin but the glutathione", *Journal of hazardous materials*, vol. 177, no. 1-3, pp. 437-444.

Gupta, D., Nicoloso, F., Schetinger, M., Rossato, L., Pereira, L., Castro, G., Srivastava, S. & Tripathi, R. 2009, "Antioxidant defense mechanism in hydroponically grown *Zea mays* seedlings under moderate lead stress", *Journal of hazardous materials*, vol. 172, no. 1, pp. 479-484.

Haider, M., Jafar Jaskani, M. and Fang, J 2021, "Bioc Agents and Secondary Metabolites: Applications and Immunization for Plant Growth and Protection", *Karnatak University, Dharwad, Karnataka, India: Woodhead Publishing*, , pp. 347-382.

Hare, P., Cress, W. & Van Staden, J. 1999, "Proline synthesis and degradation: a model system for elucidating stress-related signal transduction", *Journal of experimental botany*, vol. 50, no. 333, pp. 413-434.

Harpaz-Saad, S., Azoulay, T., Arazi, T., Ben-Yaakov, E., Mett, A., Shibolet, Y.M., Hörtensteiner, S., Gidoni, D., Gal-On, A. & Goldschmidt, E.E. 2007, "Chlorophyllase is a rate-limiting enzyme in chlorophyll catabolism and is posttranslationally regulated", *The Plant Cell*, vol. 19, no. 3, pp. 1007-1022.

Heath, R.L. & Packer, L. 1968, "Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 125, no. 1, pp. 189-198.

Hirsch, R.E., Lewis, B.D., Spalding, E.P. & Sussman, M.R. 1998, "A role for the AKT1 potassium channel in plant nutrition", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 280, no. 5365, pp. 918-921.

Hiscox, J. & Israelstam, G. 1979, "A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration", *Canadian journal of botany*, vol. 57, no. 12, pp. 1332-1334.

Hossain, M.A., Bhattacharjee, S., Armin, S., Qian, P., Xin, W., Li, H., Burritt, D.J., Fujita, M. & Tran, L.P. 2015, "Hydrogen peroxide priming modulates abiotic oxidative stress tolerance: insights from ROS detoxification and scavenging", *Frontiers in plant science*, vol. 6, pp. 420.

Houben, D., Evrard, L. & Sonnet, P. 2013, "Mobility, bioavailability and pH-dependent leaching of cadmium, zinc and lead in a contaminated soil amended with biochar", *Chemosphere*, vol. 92, no. 11, pp. 1450-1457.

Huang, J. & Cunningham, S. 1996, "Lead phytoextraction: species variation in lead uptake and translocation", *New Phytologist*, vol. 134, no. 1, pp. 75-84.

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*", *Journal of hazardous materials*, vol. 154, no. 1-3, pp. 914-926.

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*", *Journal of hazardous materials*, vol. 147, no. 3, pp. 806-816.

Jiang, W. & Liu, D. 2010, "Pb-induced cellular defense system in the root meristematic cells of *Allium sativum* L", *BMC Plant Biology*, vol. 10, no. 1, pp. 1-8.

Jing, C., Cheng, Z., Li, L., Sun, Z. & Pan, X. 2007, "Effects of exogenous salicylic acid on growth and H₂O₂-metabolizing enzymes in rice seedlings under lead stress", *Journal of Environmental sciences*, vol. 19, no. 1, pp. 44-49.

Jing, C., Cheng, Z., Li, L., Sun, Z. & Pan, X. 2007, "Effects of exogenous salicylic acid on growth and H₂O₂-metabolizing enzymes in rice seedlings under lead stress", *Journal of Environmental sciences*, vol. 19, no. 1, pp. 44-49.

Kim, Y., Yang, Y. & Lee, Y. 2002, "Pb and Cd uptake in rice roots", *Physiologia Plantarum*, vol. 116, no. 3, pp. 368-372.

Köhler, C., Merkle, T. & Neuhaus, G. 1999, "Characterisation of a novel gene family of putative cyclic nucleotide- and calmodulin-regulated ion channels in *Arabidopsis thaliana*", *The Plant Journal*, vol. 18, no. 1, pp. 97-104.

Kopittke, P.M., Asher, C.J., Kopittke, R.A. & Menzies, N.W. 2007, "Toxic effects of Pb²⁺ on growth of cowpea (*Vigna unguiculata*)", *Environmental pollution*, vol. 150, no. 2, pp. 280-287.

Kovalchuk I, Titov V, Hohn B, Kovalchuk O 2005, " Transcriptome profiling reveals similarities and differences in plant responses to cadmium and lead. *Mutat Res: Fundam Mol Mech Mutagen* 570(2):149–161", .

Kovalchuk, I., Titov, V., Hohn, B. & Kovalchuk, O. 2005, "Transcriptome profiling reveals similarities and differences in plant responses to cadmium and lead", *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, vol. 570, no. 2, pp. 149-161.

Krzesłowska, M., Lenartowska, M., Samardakiewicz, S., Bilski, H. & Woźny, A. 2010, "Lead deposited in the cell wall of *Funaria hygrometrica* protonemata is not stable—a remobilization can occur", *Environmental Pollution*, vol. 158, no. 1, pp. 325-338.

Kumar, A., Prasad, M. & Sytar, O. 2012, "Lead toxicity, defense strategies and associated indicative biomarkers in *Talinum triangulare* grown hydroponically", *Chemosphere*, vol. 89, no. 9, pp. 1056-1065.

Kumar, A., MMS, C., Chaturvedi, A.K., Shabnam, A.A., Subrahmanyam, G., Mondal, R., Gupta, D.K., Malyan, S.K., Kumar, S.S. & A Khan, S. 2020, "Lead toxicity: health hazards, influence on food chain, and sustainable remediation approaches", *International journal of environmental research and public health*, vol. 17, no. 7, pp. 2179.

Lane, S. & Martin, E. 1977, "A histochemical investigation of lead uptake in *Raphanus sativus*", *New Phytologist*, vol. 79, no. 2, pp. 281-286.

- Lehmann, J. & Joseph, S. 2015, *Biochar for environmental management: an introduction*, Routledge.
- Li, S., Li, Z., Feng, X., Zhou, F., Wang, J. & Li, Y. 2021, "Effects of biochar additions on the soil chemical properties, bacterial community structure and rape growth in an acid purple soil", *Plant, Soil and Environment*, vol. 67, no. 3, pp. 121-129.
- 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 alfredii*", *Journal of integrative plant biology*, vol. 50, no. 2, pp. 129-140.
- 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 alfredii*", *Journal of integrative plant biology*, vol. 50, no. 2, pp. 129-140.
- Madhavan, S., Rosenman, K.D. & Shehata, T. 1989, "Lead in soil: recommended maximum permissible levels", *Environmental research*, vol. 49, no. 1, pp. 136-142.
- Malar, S., Manikandan, R., Favas, P.J., Sahi, S.V. & Venkatachalam, P. 2014, "Effect of lead on phytotoxicity, growth, biochemical alterations and its role on genomic template stability in *Sesbania grandiflora*: a potential plant for phytoremediation", *Ecotoxicology and environmental safety*, vol. 108, pp. 249-257.
- Małecka, A., Piechalak, A., Morkunas, I. & Tomaszewska, B. 2008, "Accumulation of lead in root cells of *Pisum sativum*", *Acta Physiologiae Plantarum*, vol. 30, no. 5, pp. 629-637.
- Małkowski, E., Kita, A., Galas, W., Karcz, W. & Kuperberg, J.M. 2002, "Lead distribution in corn seedlings (*Zea mays* L.) and its effect on growth and the concentrations of potassium and calcium", *Plant Growth Regulation*, vol. 37, no. 1, pp. 69-76.
- McCumber, A. & Strevett, K. 2017, "A geospatial analysis of soil lead concentrations around regional Oklahoma airports", *Chemosphere*, vol. 167, pp. 62-70.
- Meier, S., Moore, F., Gonzalez, M., Medina, J., Campos, P., Khan, N., Cumming, J., Sanhueza, M., Mejias, J. & Morales, A. 2021, "Effects of three biochars on copper immobilization and soil microbial communities in a metal-contaminated soil using a metallophyte and two agricultural plants", *Environmental Geochemistry and Health*, vol. 43, no. 4, pp. 1441-1456.

- Merian, E. 1980, "Toxicity of heavy metals in the environment", *Chemosphere*, vol. 9, no. 2, pp. N8-N9.
- Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R., Kumar, R., Seth, C. & Gupta, D. 2006, "Lead detoxification by coontail (*Ceratophyllum demersum* L.) involves induction of phytochelatins and antioxidant system in response to its accumulation", *Chemosphere*, vol. 65, no. 6, pp. 1027-1039.
- Mohan, B. & Hosetti, B. 1997, "Potential phytotoxicity of lead and cadmium to *Lemna minor* grown in sewage stabilization ponds", *Environmental pollution*, vol. 98, no. 2, pp. 233-238.
- Moreno-Jiménez, E., Fernández, J.M., Puschenreiter, M., Williams, P.N. & Plaza, C. 2016, "Availability and transfer to grain of As, Cd, Cu, Ni, Pb and Zn in a barley agri-system: Impact of biochar, organic and mineral fertilizers", *Agriculture, Ecosystems & Environment*, vol. 219, pp. 171-178.
- Nie, C., Yang, X., Niazi, N.K., Xu, X., Wen, Y., Rinklebe, J., Ok, Y.S., Xu, S. & Wang, H. 2018, "Impact of sugarcane bagasse-derived biochar on heavy metal availability and microbial activity: a field study", *Chemosphere*, vol. 200, pp. 274-282.
- NogueiraA, T.A.R., JuniorA, C.H.A., AlleoniB, L.R.F., TrombetaA, A.L.B. & HeC, Z.L. 2010, "Uptake of cadmium by lettuce in tropical contaminated soils", *Proceedings of the 19th World Congress of Soil Science: Soil solutions for a changing world, Brisbane, Australia, 1-6 August 2010. Division Symposium 4.2 Soils and human health* International Union of Soil Sciences (IUSS), c/o Institut für Bodenforschung ..., , pp. 37.
- Onianwa, P. & Fakayode, S.O. 2000, "Lead contamination of topsoil and vegetation in the vicinity of a battery factory in Nigeria", *Environmental Geochemistry and Health*, vol. 22, no. 3, pp. 211-218.
- Pais, I. & Jones Jr, J.B. 1997, *The handbook of trace elements*, Crc Press.
- Parys, E., Romanowska, E., Siedlecka, M. & Poskuta, J.W. 1998, "The effect of lead on photosynthesis and respiration in detached leaves and in mesophyll protoplasts of *Pisum sativum*", *Acta Physiologiae Plantarum*, vol. 20, no. 3, pp. 313-322.
- Parys, E., Romanowska, E., Siedlecka, M. & Poskuta, J.W. 1998, "The effect of lead on photosynthesis and respiration in detached leaves and in mesophyll protoplasts of *Pisum sativum*", *Acta Physiologiae Plantarum*, vol. 20, no. 3, pp. 313-322.

- 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", *Environmental and experimental botany*, vol. 52, no. 3, pp. 199-223.
- Pichtel, J., Kuroiwa, K. & Sawyerr, H. 2000, "Distribution of Pb, Cd and Ba in soils and plants of two contaminated sites", *Environmental pollution*, vol. 110, no. 1, pp. 171-178.
- Piotrowska, A., Bajguz, A., Godlewska-Żyłkiewicz, B., Czerpak, R. & Kamińska, M. 2009, "Jasmonic acid as modulator of lead toxicity in aquatic plant *Wolffia arrhiza* (Lemnaceae)", *Environmental and experimental botany*, vol. 66, no. 3, pp. 507-513.
- Pourrut, B., Perchet, G., Silvestre, J., Cecchi, M., Guisresse, M. & Pinelli, E. 2008, "Potential role of NADPH-oxidase in early steps of lead-induced oxidative burst in *Vicia faba* roots", *Journal of Plant Physiology*, vol. 165, no. 6, pp. 571-579.
- Pourrut, B., Shahid, M., Dumat, C., Winterton, P. & Pinelli, E. 2011, "Lead uptake, toxicity, and detoxification in plants", *Reviews of environmental contamination and toxicology volume 213*, pp. 113-136.
- Pryor, W.A. 1991, "The antioxidant nutrients and disease prevention--what do we know and what do we need to find out?", *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 53, no. 1, pp. 391S-393S.
- Qureshi, M., Abdin, M., Qadir, S. & Iqbal, M. 2007, "Lead-induced oxidative stress and metabolic alterations in *Cassia angustifolia* Vahl.", *Biologia Plantarum*, vol. 51, no. 1, pp. 121-128.
- Richardson, A.D., Duigan, S.P. & Berlyn, G.P. 2002, "An evaluation of noninvasive methods to estimate foliar chlorophyll content", *New Phytologist*, vol. 153, no. 1, pp. 185-194.
- Roberts, A.E., Boylen, C.W. & Nierzwicki-Bauer, S.A. 2014, "Effects of lead accumulation on the *Azolla caroliniana*–*Anabaena* association", *Ecotoxicology and environmental safety*, vol. 102, pp. 100-104.
- Roelfsema, M.R.G. & Hedrich, R. 2005, "In the light of stomatal opening: new insights into ‘the Watergate’", *New Phytologist*, vol. 167, no. 3, pp. 665-691.
- Rooney, C., McLaren, R. & Cresswell, R. 1999, "Distribution and phytoavailability of lead in a soil contaminated with lead shot", *Water, air, and soil pollution*, vol. 116, no. 3, pp. 535-548.

Rumbeiha, W.K., Braselton, W.E. & Donch, D. 2001, "A retrospective study on the disappearance of blood lead in cattle with accidental lead toxicosis", *Journal of veterinary diagnostic investigation*, vol. 13, no. 5, pp. 373-378.

Seregin, I. & Ivanov, V. 2001, "Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants", *Russian journal of plant physiology*, vol. 48, no. 4, pp. 523-544.

Seregin, I., Shpigun, L. & Ivanov, V. 2004, "Distribution and toxic effects of cadmium and lead on maize roots", *Russian Journal of Plant Physiology*, vol. 51, no. 4, pp. 525-533.

Sharma, P. & Dubey, R.S. 2005, "Lead toxicity in plants", *Brazilian journal of plant physiology*, vol. 17, pp. 35-52.

Silbergeld, E.K., Waalkes, M. & Rice, J.M. 2000, "Lead as a carcinogen: experimental evidence and mechanisms of action", *American Journal of Industrial Medicine*, vol. 38, no. 3, pp. 316-323.

Singh, R., Tripathi, R., Dwivedi, S., Kumar, A., Trivedi, P. & Chakrabarty, D. 2010, "Lead bioaccumulation potential of an aquatic macrophyte *Najas indica* are related to antioxidant system", *Bioresource technology*, vol. 101, no. 9, pp. 3025-3032.

Skoog A., Holler F.J. & Crouch S.R. (ed) 2007, 'Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης', Κεφάλαιο 11: Φασματοσκοπία Ατομικών Μαζών, 6th edn, Εκδόσεις Κωσσταράκη.

Soil & Plant Analysis Laboratory University of Wisconsin– Madison 2005, , *Analysis of Major, Minor and Trace Elements in Soil and Sediment Samples with ICP-OES and ICP-MS*. Available: https://uwlab.soils.wisc.edu/wp-content/uploads/sites/17/2015/09/plant_icp.pdf [2021, 15 August].

Thomas R 2001, "A Beginner's Guide to ICP-MS, Part II: The Sample Introduction System", vol. Spectroscopy Tutorial, 16 (5).

Tung, G. & Temple, P.J. 1996, "Uptake and localization of lead in corn (*Zea mays* L.) seedlings, a study by histochemical and electron microscopy", *Science of the total environment*, vol. 188, no. 2-3, pp. 71-85.

US EPA, 5 August 2021,, *Learn about Lead* . Available: <https://www.epa.gov/lead/learn-about-lead>.

Uzu, G., Sobanska, S., Aliouane, Y., Pradere, P. & Dumat, C. 2009, "Study of lead phytoavailability for atmospheric industrial micronic and sub-micronic particles in relation with lead speciation", *environmental pollution*, vol. 157, no. 4, pp. 1178-1185.

Vadas, T.M. & Ahner, B.A. 2009, "Cysteine-and glutathione-mediated uptake of lead and cadmium into *Zea mays* and *Brassica napus* roots", *Environmental pollution*, vol. 157, no. 8-9, pp. 2558-2563.

Verma, S. & Dubey, R. 2003, "Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants", *Plant Science*, vol. 164, no. 4, pp. 645-655.

Vilagines, R. & Leroy, P. 1995, "Lead in drinking water, determination of its concentration and effects of new recommendations of the World Health Organization (WHO) on public and private networks management", *Bulletin de l'Academie nationale de medecine*, vol. 179, no. 7, pp. 1393-1408.

Wang, H., Shan, X., Wen, B., Owens, G., Fang, J. & Zhang, S. 2007, "Effect of indole-3-acetic acid on lead accumulation in maize (*Zea mays* L.) seedlings and the relevant antioxidant response", *Environmental and experimental botany*, vol. 61, no. 3, pp. 246-253.

Weryszko-Chmielewska, E. & Chwil, M. 2005, "Lead-Induced Histological and Ultrastructural Changes in the Leaves of Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.)", *Soil Science & Plant Nutrition*, vol. 51, no. 2, pp. 203-212.

Weryszko-Chmielewska, E. & Chwil, M. 2005, "Lead-Induced Histological and Ultrastructural Changes in the Leaves of Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.)", *Soil Science & Plant Nutrition*, vol. 51, no. 2, pp. 203-212.

Who.int 2019 , *Lead poisoning and health* . Available: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/lead-poisoning-and-health> [2021, July 27].

Wojas, S., Ruszczynska, A., Bulska, E., Wojciechowski, M. & Antosiewicz, D. 2007, "Ca²⁺-dependent plant response to Pb²⁺ is regulated by LCT1", *Environmental Pollution*, vol. 147, no. 3, pp. 584-592.

Xiong, Z., Zhao, F. & Li, M. 2006, "Lead toxicity in *Brassica pekinensis* Rupr.: effect on nitrate assimilation and growth", *Environmental Toxicology: An International Journal*, vol. 21, no. 2, pp. 147-153.

Xu, C., Hosseini-Bai, S., Hao, Y., Rachaputi, R.C., Wang, H., Xu, Z. & Wallace, H. 2015, "Effect of biochar amendment on yield and photosynthesis of peanut on two types of soils", *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 22, no. 8, pp. 6112-6125.

Yan, Z.Z., Ke, L. & Tam, N.F.Y. 2010, "Lead stress in seedlings of *Avicennia marina*, a common mangrove species in South China, with and without cotyledons", *Aquatic Botany*, vol. 92, no. 2, pp. 112-118.

Yuan, G., Dai, S., Yin, Z., Lu, H., Jia, R., Xu, J., Song, X., Li, L., Shu, Y. & Zhao, X. 2014, "Toxicological assessment of combined lead and cadmium: acute and sub-chronic toxicity study in rats", *Food and chemical toxicology*, vol. 65, pp. 260-268.

ΒΟΥΤΣΙΝΟΣ, Γ. 2009, *Διαχείριση Φυσικών Πόρων - Ηλεκτρονικό Βιβλίο*.

Κουδουνάς, Χ. 2001, "Εδάφη και Γεωργικές καλλιέργειες στην Κύπρο", *Λευκωσία: Έκδοση 6*.

ΣΙΔΗΡΑΣ, Ν. 1994, " Εδαφικό περιβάλλον" in , ed. Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, pp. 55-75.

7. Παράρτημα:



Εικόνα 3: Φωτογραφίες των μαρουλιών ανά μεταχείριση στις 30 ημέρες μετά την μεταφύτευση.



C

Cbc

Pb300

Pb600

Pb300bc

Pb600bc

Εικόνα 4: Φωτογραφίες των μαρουλιών ανά μεταχείριση στις 40 ημέρες μετά την μεταφύτευση και την 42^η ημέρα κατά την συλλογή