

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

**ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

**Επίδραση των βαρέων μετάλλων καδμίου,  
ψευδαργύρου και νικελίου στην ανάπτυξη και το  
μεταβολισμό καλλιεργούμενων (*Nicotiana tabacum*)  
και άγριων (*Nicotiana glauca*) φυτών καπνού**

**ΚΟΝΣΟΛΑΚΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΣΤΕΦΑΝΟΥ ΕΥΡΙΠΙΔΗΣ,**  
**ΣΥΝΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΛΟΥΛΑΚΑΚΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ**

**ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2010**

**UNIVERSITY OF CRETE**  
**SCHOOL OF SCIENCES & ENGINEERING**  
**DEPARTMENT OF CHEMISTRY**

**Graduate Program in**  
**Environmental Protection Technologies**

**M.Sc. Thesis**

**Effect of heavy metals, cadmium, nickel and zinc on growth and  
metabolism of cultivated (*Nicotiana tabacum*) and wild type  
(*Nicotiana glauca*) tobacco plants**

**Konsolakis Georgios**

Supervisor Prof.: **E Stefanou**

Co-Supervisor: Prof. **K. Loulakakis**

**Heraklion 2010**

---

Υποβλήθηκε στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης

Ημερομηνία Προφορικής Εξέτασης: 4 Ιουνίου 2010

**Εξεταστική Επιτροπή**

**Ε. Στεφάνου**, Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

**Σ. Περγαντής**, Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

**Κ. Λουλακάκης**, Καθηγητής Σχολής Τεχνολογίας Γεωπονίας ΤΕΙ Κρήτης

*Στους γονείς μου...*

Με το τέλος αυτής της διατριβής φαντάζει πολύ δύσκολο να θυμηθεί κανείς όλους εκείνους τους ανθρώπους που συνέβαλαν στην αποπεράτωση της.

Καταρχήν, αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω ολόψυχα τον καθηγητή κ. Κώστα Λουλακάκη, για τη συνεχή και εποικοδομητική καθοδήγηση και την άψογη συνεργασία μας καθ' όλη την διάρκεια εκπόνησης της παρούσας διατριβής καθώς και για την πολύτιμη γνώση που μου προσέφερε απλόχερα.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή κ. Ευριπίδη Στεφάνου για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε στην ανάθεση αυτού του θέματος, αλλά και τον αναπληρωτή καθηγητή κ. Σπύρο Περγαντή, που δέχτηκε να συμμετέχει στην Εξεταστική Επιτροπή.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω επίσης στους συναδέλφους και συνεργάτες Μαρία Χριστοφάκη, Αναστασία Παπαδάκη, Κώστα Πασχαλίδη και Γιάννη Παπαδάκη, για την πολύτιμη βοήθεια τους. Παράλληλα ευχαριστώ την επίκουρο καθηγήτρια κα Μαγδαληνή Δραγασάκη και τον καθηγητή κ Μιχάλη Παπαδημητρίου για την φιλοξενία του πειράματος στο χώρο του θερμοκηπίου στο Αγρόκτημα του ΤΕΙ Κρήτης .

Τέλος ευχαριστώ τους συναδέλφους μου Κέλυ Βέτσικα και Αγγουράκη Δέσποινα καθώς και τον καθηγητή κ. Βασίλειο Γεωργούλια για την υπομονή και την υποστήριξη τους κατά το διάστημα της εκπόνησης της διατριβής αυτής.

## Περίληψη

Η αποκατάσταση ρυπασμένων από βαρέα μέταλλα εδαφών με χρήση φυτών, αποτελεί μια σύγχρονη και πολλά υποσχόμενη τεχνολογία, η οποία υπερτερεί των καθιερωμένων μεθόδων αποκατάστασης. Πρόκειται για μια τεχνολογία οικονομικά αποδοτική, φιλική προς το περιβάλλον και με ευρύ πεδίο εφαρμογής. Όπως είναι κατανοητό, καθοριστικός παράγοντας προς αυτήν την κατεύθυνση δεν είναι άλλος από την δυνατότητα των φυτών να επιβιώνουν σε εδάφη με μεγάλες συγκεντρώσεις τοξικών μετάλλων αλλά και η ικανότητά τους να συσσωρεύουν στη μάζα τους όσο το δυνατόν μεγαλύτερες ποσότητες από αυτά. Το πεδίο έρευνας της παρούσας εργασίας εστιάζεται στη συγκριτική μελέτη της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων ψευδαργύρου (Zn), νικελίου (Ni) και καδμίου (Cd) στα μορφολογικά χαρακτηριστικά της ανάπτυξης, στην πρόσληψη και κατανομή του μετάλλου στους ιστούς καθώς και σε σειρά παραμέτρων που σχετίζονται με την φωτοσύνθεση και την οξειδωτική καταπόνηση των φυτικών ειδών *Nicotiana tabacum* και *N. glauca*.

Τα είδη αυτά, λόγω διαφόρων χαρακτηριστικών τους, όπως πλούσια βιομάζα, βαθύ ριζικό σύστημα, ανοχή σε βαρέα μέταλλα, παρουσιάζουν ενδιαφέρον για αξιοποίηση σε εφαρμογές αποκατάστασης υποβαθμισμένων περιοχών. Φυτά *N. tabacum* και *N. glauca* εγκαταστάθηκαν σε γλάστρες με τεχνητό υπόστρωμα σε συνθήκες θερμοκηπίου και καλλιεργήθηκαν για 42 ημέρες παρουσία 0-5 mM Zn ή 0-1 mM Ni ή 0-2 mM Cd. Οι επεμβάσεις με τις υψηλές συγκεντρώσεις μετάλλων επηρέασαν αρνητικά τα μορφολογικά χαρακτηριστικά της ανάπτυξης των φυτών τα οποία έδειξαν συμπτώματα τοξικότητας. Με την αύξηση των συγκεντρώσεων των μετάλλων στο υπόστρωμα καλλιέργειας αυξήθηκε η συσσώρευση μετάλλων στους φυτικούς ιστούς των *N. tabacum*, και *N. glauca* ιδιαίτερα στη ρίζα, και στα γηραιότερα φύλλα. Οι φωτοσυνθετικές παράμετροι που μελετήθηκαν όπως, το

περιεχόμενο χλωροφυλλών, ο επαγωγικός φθορισμός των χλωροφυλλών (Fv/Fm) και η ένταση της φωτοσύνθεσης, έδειξαν αρνητική συσχέτιση με τη συγκέντρωση των μετάλλων. Διαφορική ήταν η επίδραση των μετάλλων σε δείκτες που συνδέονται με την οξειδωτική καταπόνηση. Ειδικότερα και στα δύο φυτικά είδη που μελετήθηκαν παρατηρήθηκε αύξηση της λιπιδικής υπεροξειδωσης και απόκριση του μη ενζυμικού αντιοξειδωτικού μηχανισμού, με αύξηση της προλίνης και συνολικά της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Αντίθετα, όσον αφορά τον ενζυμικό μηχανισμό η καταπόνηση των βαρέων μετάλλων οδήγησε σε καταστολή των μελετώμενων αντιοξειδωτικών ενζύμων στο *N. tabacum* και την επαγωγή τους στο *N. glauca*. Από τα αποτελέσματα της εργασίας γίνεται φανερό ότι και τα δύο μελετούμενα είδη ανέχονται σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις των μετάλλων Zn, Ni και Cd και συσσωρεύουν αξιόλογες ποσότητες στους ιστούς τους, ιδιότητες ιδιαίτερα σημαντικές για την μελλοντική αξιοποίηση των *N. tabacum* και *N. glauca*.

## Abstract

Phytoremediation of contaminated soils by heavy metals is a modern and promising technology. The present study focuses on the comparative study on the effects of different concentrations of Zn, Ni, Cd in the growth characteristics of *Nicotiana tabacum* and *N. glauca* species, their recruitment and distribution of these metals in their tissues and the parameters related to photosynthesis and oxidative stress.

These species, due to several features, (e.g. high biomass, deep root system, tolerance to heavy metals) are of great interest in remediation of soil. *N. tabacum* and *N. glauca* settled in pots with artificial substrate in greenhouse conditions and grown for 42 days in the presence 0 - 5 mM Zn or 0 - 1 mM Ni or 0 - 2 mM Cd.

High metal concentrations showed plant growth inhibition. Increasing metal concentrations in the culture medium resulted in higher metals accumulation in tissues of *N. tabacum* and *N. glauca*, especially in the root and the older leaves. The photosynthetic parameters studied (chlorophyll, induction of chlorophyll fluorescence, intensity of photosynthesis) showed no correlation with the concentration of metals. An increase of lipid peroxidation and response of non-enzymatic antioxidant mechanism observed after proline and total antioxidant capacity increment, in the plants studied. Concerning the enzymatic mechanism, stress of heavy metals resulted in suppression of the antioxidant enzymes studied in *N. tabacum* and induction in *N. glauca*. The results showed that both species used, can resist relatively high concentrations of metals Zn, Ni and Cd and accumulate significant quantities in their tissues. These properties are essential for the future development of the *N. tabacum* and *N. glauca*.



## Συντομογραφίες

A	Assimilation rate	Ρυθμός αφομοίωσης
AA	Ascorbic Acid	Ασκορβικό οξύ
ABA	Absciscic acid	Αποσκισικό οξύ
ABTS	2,2'azinobis-(3-ethylbenzothiaziline-6-sulfonate)	3-αιθυλοβενζοθειαζοζίνη-6-σουλφονίδιο
APX	Ascorbate Peroxidase	Ασκορβική Υπεροξειδάση
ATP	Adenosine 5'-TriPhosphate	Τριφωσφορική αδενοσίνη
CAT	Catalase	Καταλάση
Cd	Cadmium	Κάδμιο
CE	Carboxylation Efficiency	Αποτελεσματικότητα καρβοξυλίωσης
Ci	Substomatal CO <sub>2</sub> concentration	Συγκέντρωση CO <sub>2</sub> στην υποστοματική κοιλότητα
DW	Dry Weight	Ξηρό βάρος
E	Transpiration rate	Ρυθμός διαπνοής
FW	Fresh Weight	Νωπό βάρος
Fv/Fm	PSII photochemical efficiency	Φωτοχημική αποτελεσματικότητα φωτοσυστήματος II
GPx	Guaiacol Peroxidase	Υπεροξειδάσης της γουαϊακόλλης
GR	Glutathione Reductase	Αναγωγή της γλουταθειόνης
gs	Stomatal conductance	Στοματική αγωγιμότητα
GSH	N-(N-L-gamma-glutamyl-L-cysteinyl) glycine/reduced glutathione	Ανηγμένη γλουταθειόνη
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hydrogen peroxide	Υπεροξείδιο του υδρογόνου
MDA	MalonDiAldehyde	Μαλονδιαλδεΐδη

Ni	Nickel	Νικέλιο
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Superoxide radical	Ρίζα του σουπεροξειδίου
PC	PhytoChelatins	Φυτοχηλικές ενώσεις
PEP	PhosphoEnolPyruvate	Φωσφοενολική μορφή του πυροσταφυλικού οξέος
POD	PerOxiDase	Υπεροξειδάση
PSI	Photosystem I	Φωτοσύστημα I
PSII	Photosystem II	Φωτοσύστημα II
PUFAs	PolyUnsaturated Fatty Acids	Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα
PVPP	PolyVinylPolyPyrrolidone	Πολυβινυλοπολυπυρρολιδινίο
ROS	Reactive Oxygen Species	Ενεργές μορφές οξυγόνου
Rubisco	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase	Καρβοξυλάση της 1,5-διφωσφορικής ριβουλόζης
SOD	SuperOxide Dismutase	Υπεροξειδική δισμουτάση
TBARS	TBA Reactive Substances	Ενώσεις αντιδρούσες με TBA
TCA	Trichloro Acetic Acid	Τριχλωροοξικό οξύ
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity	Αντιοξειδωτική ικανότητα σε ισοδύναμα Trolox
Trolox	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid	Συνθετικό παράγωγο της βιταμίνης E
TBA	ThioBarbituric Acid	Θειοβαρβιτουρικό οξύ
Zn	Zinc	Ψευδάργυρος

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....	<b>i</b>
Abstract.....	<b>iii</b>
Συντομογραφίες .....	<b>iv</b>
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	<b>vi</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ</b>	
Εισαγωγή.....	<b>1</b>
1.1 Προσέγγιση στο θέμα .....	2
1.2 Βαρέα μέταλλα και περιβάλλον .....	3
1.2.1 Πηγές, μορφές και δράση ψευδαργύρου, νικελίου και καδμίου .....	6
1.2.2 Ρύπανση με βαρέα μέταλλα στην Ελλάδα.....	12
1.3 Τεχνολογίες αποκατάστασης εδαφών .....	13
1.3.1 Η τεχνολογία της φυτοεξυγίανσης .....	15
1.3.1.1 Τεχνικές φυτοεξυγίανσης .....	16
1.3.1.2 Φυτοσυσσώρευση.....	23
1.3.1.3 Συγκομιδή, επεξεργασία και διάθεση των φυτών.....	28
1.3.1.4 Πρόσληψη μετάλλων από τα φυτά.....	28
1.3.1.5 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της φυτοαποκατάστασης.....	32
1.4 Παράγοντες καταπόνησης και αντιμετώπισή τους από τα φυτά.....	33
1.4.1 Καταπόνηση βαρέων μετάλλων στα φυτά.....	35
1.4.1.1 Μηχανισμοί ανθεκτικότητας των φυτών στα βαρέα μέταλλα.....	38
1.4.2 Οξειδωτική καταπόνηση .....	46
1.4.2.1 Αντιοξειδωτικός μηχανισμός στα φυτά.....	51
1.5 Βοτανικά χαρακτηριστικά των φυτών <i>Nicotiana tabacum</i> και <i>N. glauca</i> ....	53

1.5.1 <i>Nicotiana tabacum</i> (Νικοτιανή - κοινός καπνός ) .....	53
1.5.2 <i>Nicotiana glauca</i> (Νικοτιάνα η γλαυκή) .....	54
1.6 Σκοπός της εργασίας .....	56
1.6.1 Επιλογή φυτών .....	56
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ</b>	
<b>Υλικά &amp; Μεθοδολογία.....</b>	<b>59</b>
2.1 Γενικά .....	60
2.2 Προετοιμασία φυτικού υλικού (πολλαπλασιασμός- προσαρμογή) .....	60
2.3 Πειραματική διαδικασία και μεταχειρίσεις.....	61
2.4 Πειραματικές μετρήσεις.....	64
2.4.1 Φυσιολογικές Παράμετροι .....	64
2.4.1.1 Διαπνοή .....	64
2.4.1.2 Στοματική Αγωγιμότητα .....	65
2.4.1.3 Ρυθμός φωτοσύνθεσης .....	65
2.4.1.4 Εσωτερική συγκέντρωση CO <sub>2</sub> .....	67
2.4.2 Φωτοχημικές Παράμετροι .....	68
2.4.2.1 Προσδιορισμός επαγωγικού φθορισμού χλωροφύλλης.....	68
2.4.2.2 Μέτρηση ολικών χλωροφυλλών .....	70
2.4.3 Χημικές - Βιοχημικές Αναλύσεις.....	71
2.4.3.1 Προσδιορισμός συγκέντρωσης Zn, Ni και Cd στους φυτικούς ιστούς.....	71
2.4.3.2 Μέτρηση υπεροξειδωσής λιπιδίων με τη μέθοδο TBARS .....	72
2.4.3.3 Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας (Δοκιμή TEAC - Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) .....	73
2.4.3.4 Μέτρηση συγκέντρωσης προλίνης (Αντίδραση Νινυδρίνης) .....	75
2.4.4 Ενζυμικές αναλύσεις .....	76
2.4.4.1 Δοκιμή της δράσης της ασκορβικής υπεροξειδάσης (APX).....	76

2.4.4.2 Προσδιορισμός της δραστηριότητας της υπεροξειδάσης (POD) .....	77
2.5 Στατιστική ανάλυση.....	77
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ</b>	
<b>Αποτελέσματα &amp; Συζήτηση.....</b>	<b>79</b>
3.1 Επίδραση ψευδαργύρου στην ανάπτυξη και το μεταβολισμό των <i>N. tabacum</i> και <i>N. glauca</i> .....	80
3.1.2 Επίδραση ψευδαργύρου στα μορφολογικά χαρακτηριστικά των φυτικών ειδών <i>N. tabacum</i> και <i>N. glauca</i> .....	84
3.1.3 Επίδραση ψευδαργύρου (Zn) σε παραμέτρους της φωτοσύνθεσης .....	88
3.1.4 Επίδραση του ψευδαργύρου στον αντιοξειδωτικό μηχανισμό των <i>N. tabacum</i> και <i>N. glauca</i> .....	97
3.1.4.1 Μη ενζυμικός αντιοξειδωτικός μηχανισμός.....	97
3.1.4.2 Ενζυμικός αντιοξειδωτικός μηχανισμός .....	101
3.2 Επίδραση νικελίου στην ανάπτυξη και το μεταβολισμό των <i>N. tabacum</i> και <i>N. glauca</i> .....	103
3.2.2 Επίδραση νικελίου στα μορφολογικά χαρακτηριστικά των φυτικών ειδών <i>N. tabacum</i> και <i>N. glauca</i> .....	107
3.2.3 Επίδραση νικελίου (Ni) σε παραμέτρους της φωτοσύνθεσης .....	111
3.2.4 Οξειδωτική καταπόνηση.....	116
3.2.4.1 Μη ενζυμικός αντιοξειδωτικός μηχανισμός.....	117
3.2.4.2 Ενζυμικός αντιοξειδωτικός μηχανισμός .....	120
3.3 Κάδμιο (Cd).....	122
3.3.1 Συσσώρευση καδμίου στους φυτικούς ιστούς .....	122
3.3.2 Επίδραση του καδμίου στα μορφολογικά χαρακτηριστικά των φυτικών ειδών <i>N. tabacum</i> και <i>N. glauca</i> .....	127
3.3.3 Επίδραση καδμίου σε παραμέτρους της φωτοσύνθεσης.....	131
3.3.4 Οξειδωτική καταπόνηση.....	136

3.3.4.1 Μη ενζυμικός αντιοξειδωτικός μηχανισμός.....	137
3.3.4.2 Ενζυμικός αντιοξειδωτικός μηχανισμός .....	139
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ</b>	
<b>Συμπεράσματα &amp; Προοπτικές.....</b>	<b>141</b>
4.1 Συμπεράσματα-προοπτικές.....	142
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>145</b>

---

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

Εισαγωγή

---

## 1.1 Προσέγγιση στο θέμα

Ιδιαίτερος σημαντικό περιβαλλοντικό πρόβλημα αποτελεί η ρύπανση του εδάφους και των υπόγειων υδάτων με βαρέα μέταλλα. Τον περασμένο αιώνα το πρόβλημα μεγεθύνθηκε εντυπωσιακά λόγω της παγκόσμιας βιομηχανικής ανάπτυξης και της μη τήρησης των κανόνων που διέπουν την προστασία του περιβάλλοντος. Η ρύπανση αυτή εγκυμονεί σοβαρούς κινδύνους για το περιβάλλον και την ανθρώπινη υγεία και συνεπώς δεν επαρκεί απλά ο περιορισμός των ρύπων στην πηγή τους, αλλά επιβάλλεται και η εξυγίανση των ήδη ρυπασμένων περιοχών.

Η αποκατάσταση των ρυπασμένων με μέταλλα εδαφών, αντιμετωπίζει μια ιδιαίτερη πρόκληση, σε σύγκριση με άλλους εδαφικούς ρυπαντές (οργανικές ενώσεις, λιπάσματα, φαινόλες, ζιζανιοκτόνα) που οφείλεται στην απουσία φυσικής αποδόμησης των βαρέων μετάλλων. Κατά συνέπεια οι μέθοδοι ανάκτησης των ρυπασμένων εδαφών βασίζονται αποκλειστικά στην απομάκρυνση ή στην καθήλωση των τοξικών μετάλλων. Σήμερα χρησιμοποιούνται αρκετές τεχνολογίες αποκατάστασης εδαφών που ενώ έχουν αποδειχτεί αποδοτικές για μερικές περιπτώσεις (π.χ. μικρής έκτασης περιοχές με υψηλές συγκεντρώσεις ρυπαντών), παρουσιάζουν αρκετές αδυναμίες (χώροι εναπόθεσης, υψηλό κόστος, περιβαλλοντικές διαταραχές κ.α.).

Τα τελευταία χρόνια έχει εισαχθεί μια ταχύτατα αναπτυσσόμενη εναλλακτική βιοτεχνολογική προσέγγιση του προβλήματος που χρησιμοποιεί φυτά για την απορρύπανση εδαφών, η λεγόμενη φυτοεξυγίανση ή φυτοαποκατάσταση. Σε σύγκριση με άλλες μεθόδους η φυτοεξυγίανση είναι μια φυσική, χαμηλού κόστους (έως και 1000 φορές φθηνότερη από τις συμβατικές) και υψηλής αποτελεσματικότητας πράσινη τεχνολογία, που επιπλέον είναι αποδεκτή από τις γειτονικές του προς εξυγίανση χώρου, κοινότητες. Για την φυτοεξυγίανση εδαφών από βαρέα



μέταλλα απαιτούνται φυτά ικανά να αντέχουν και να συσσωρεύουν υψηλές συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων στην υπέργεια βιομάζα τους, η οποία είτε απλά απομακρύνεται ή και αξιοποιείται περαιτέρω για την απομόνωση και εμπορική εκμετάλλευση των μετάλλων. Η φυτοεξυγίανση περιλαμβάνει αρκετές τεχνικές οι οποίες διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τον τρόπο με τον οποίο τα φυτά μεταχειρίζονται τους ρυπαντές (αφαίρεση, σταθεροποίηση, διάσπαση) καθώς και στον τύπο του ρυπαντή που στοχεύουν (οργανικοί ή ανόργανοι ρυπαντές).

## 1.2 Βαρέα μέταλλα και περιβάλλον

Βαρέα χαρακτηρίζονται τα μέταλλα με ατομικό βάρος από 63,54 έως 200,59 και με ειδικό βάρος μεγαλύτερο του 4 (Ghosh and Singh, 2005) ενώ σύμφωνα με τους Gardea-Torresdey *et al.* (2005) πρόκειται για μια ομάδα στοιχείων με ατομική πυκνότητα μεγαλύτερη του 6 g/cm. Βέβαια επικρατούν και απόψεις που χαρακτηρίζουν βαρέα τα μέταλλα εκείνα που έχουν τοξική ή και ιδιαίτερα τοξική δράση, ακόμα και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Τα βαρέα μέταλλα είναι φυσικά συστατικά του φλοιού της γης. Δεν μπορούν να διασπαστούν σε απλούστερες μορφές ή να καταστραφούν. Είναι στοιχεία που εύκολα χάνουν ηλεκτρόνια για να σχηματίσουν φορτισμένα ιόντα. Συνήθως είναι καλοί αγωγοί του ηλεκτρισμού και αποτελούν στοιχεία με υψηλή τοξικότητα και μεγάλη πυκνότητα. Η τοξικότητα των βαρέων μετάλλων εξαρτάται από τη συγκέντρωσή τους, το είδος του μετάλλου, την ύπαρξη και συνεργιστική δράση άλλων μετάλλων και το είδος του οργανισμού.

Ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά αυτών των στοιχείων είναι ότι δεν βιοαποικοδομούνται αλλά καθιζάνουν ως δυσδιάλυτα άλατα ή σύμπλοκα με αποτέλεσμα να συσσωρεύονται στο εδαφικό σύστημα με υψηλό pH. Συνήθως μεταφέρονται μέσω των αστικών λυμάτων και βιομηχανικών καταλοίπων με

τα νερά της βροχής ή των ποταμών, ακόμα και σε καλλιεργήσιμα εδάφη όπου παραμένουν για εκατονταετίες μιας και δεν υπάρχει κανένας φυσικός ή βιολογικός τρόπος για την αποδόμησή τους.

Στα βαρέα μέταλλα περιλαμβάνονται τα στοιχεία Cu, Zn, Mn, Mo, Co, Hg, Pb, Cd, Cr, Ni. Ορισμένα από αυτά είναι απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία για τους οργανισμούς ενώ άλλα όχι. Απαραίτητα για τα φυτά είναι τα στοιχεία Cu, Zn, Mn, Mo και Co ενώ για τα ζώα τα στοιχεία Cu, Mn, Ni, Zn και Cr. Η περιεκτικότητα των στοιχείων αυτών, στους ιστούς είναι πολύ χαμηλή σε σύγκριση με άλλα θρεπτικά στοιχεία, όπως C, H, O, N, P, K, ώστε συχνά αποκαλούνται "ιχνοστοιχεία" ή "μικροστοιχεία". Η παρουσία στους οργανισμούς των στοιχείων αυτών, όπως και όλων των άλλων θρεπτικών στοιχείων, σε ποσά κάτω ή πάνω από το άριστο, προκαλεί λειτουργικές ανωμαλίες ή ακόμη και το θάνατο του οργανισμού. Η άριστη συγκέντρωση διαφέρει ανάμεσα στα είδη και τις ποικιλίες ή φυλές του ίδιου είδους. Γενικές διαφορές υπάρχουν επίσης ως προς την ανοχή των οργανισμών στα υψηλά ή χαμηλά επίπεδά τους (Cheng, 2003; Prasad, 2004; Zenk, 1996).

Τα μη απαραίτητα για τη ζωή των οργανισμών βαρέα μέταλλα μπορεί να εισέλθουν στους ιστούς και να προκαλέσουν διαταραχές στις φυσιολογικές λειτουργίες τους, ανάλογα με το στοιχείο, την ποσότητα που εισήλθε και τη γενετική αντοχή ή ανοχή. Φαινόμενα τοξικότητας δεν είναι ασυνήθιστα και μπορεί να προκαλέσουν σοβαρότατες βλάβες στους οργανισμούς, ιδίως των ανωτέρων κρίκων της τροφικής αλυσίδας (Tyler et al., 1989). Ιδιαίτερα για τον άνθρωπο πολύ τοξικά θεωρούνται τα στοιχεία Cu, Zn, Mn, Mo, Co, Hg, Pb, Cd, Cr, και Ni (Callender, 2003).

Η ρύπανση του περιβάλλοντος με βαρέα μέταλλα μπορεί να προκληθεί από σημειακές ή και από μη σημειακές πηγές, οι οποίες μπορεί να είναι φυσικές ή ανθρωπογενείς. Οι φυσικές περιλαμβάνουν κυρίως την ελευθέρωση στο περιβάλλον βαρέων μετάλλων κατά την αποσάθρωση των πετρωμάτων. Σε

αυτήν την περίπτωση, οι συγκεντρώσεις των μετάλλων εξαρτώνται απ' το τύπο του πετρώματος και τις περιβαλλοντικές συνθήκες (Alloway, 1995; Sanità di Torri and Gabbrielli, 1999; Yoon et al., 2006). Οι ανθρωπογενείς προσθήκες μπορούν να διαχωριστούν σε τρεις κατηγορίες. Τις **γεωργικές** που περιλαμβάνουν λιπάσματα, εδαφοβελτιωτικά φυτοπροστατευτικά προϊόντα και κτηνοτροφικά απόβλητα, τις **βιομηχανικές** πηγές στις οποίες εντάσσονται οι μεταλλευτικές δραστηριότητες καθώς και η ανακύκλωση μετάλλων, η επεξεργασία πλαστικών, υφασμάτων, μικροηλεκτρονικών, συντήρηση ξύλου και η επεξεργασία χαρτιού και τέλος τις **αστικές** πηγές με τα λύματα και την ιλύ των μονάδων επεξεργασίας απόβλητων, τους χώρους υγειονομικής ταφής απορριμμάτων, και τα υπολείμματα καύσης άνθρακα, και καυσαερίων αυτοκινήτων. Στους πίνακες που ακολουθούν (Πίνακας 1.1 και Πίνακας 1.2) παρουσιάζονται οι φυσικές τιμές ορισμένων βαρέων μετάλλων στα πετρώματα, στον φλοιό της γης και στο έδαφος καθώς και οι κυριότερες ανθρωπογενείς πηγές τους (Callender, 2003; Gardea-Torresdey et al., 2005).

**Πίνακας 1.1** Μέσες τιμές βαρέων μετάλλων στα πετρώματα και στο έδαφος ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ).

Μέταλλα	Βασάλτης	Γρανίτης	Ιζηματογενή πετρώματα	Φλοιός	Μέση τιμή εδάφους
As	1,5	1,5	7,7	1,5	6
Cd	0,13	0,09	0,17	0,11	0,35
Hg	0,012	0,08	0,19	0,05	0,06
Ni	50	8	65	75	20
Pb	3	24	19	14	19
Se	0,05	0,05	0,42	0,05	0,4
Ti	0,08	1,1	0,95	0,6	0,2
Zn	100	40	80-120	80	50

**Πίνακας 1.2** Πηγές βαρέων μετάλλων που ρυπαίνουν τα εδάφη (Alloway, 1995).

Πηγές	Βαρέα μέταλλα
Πρωτογενείς	
Λιπάσματα	Cd, Pb, As
Άσβεστος	As, Pb
Άρδευση	Cd, Pb, Se
Κοπριά	As, Se
Λυματολάσπη	Cd, Pb, As
Δευτερογενείς	
Καυσαέρια	Pb
Χυτήρια	Pb, Cd, Sb, As, Hg
Περιοχές μεταλλείων	Pb, Cd, As, Hg
Ελαστικά αυτοκινήτων	Cd
Χωματερές	Pb, Cd, As
Καύση λιγνίτη	Pb, Se, Pb,Sb

### 1.2.1 Πηγές, μορφές και δράση ψευδαργύρου, νικελίου και καδμίου

#### Ψευδάργυρος (Zn)

Τα θειούχα ορυκτά, τα ιζηματογενή και τα βασαλτικά πετρώματα αποτελούν τις κυρίες πηγές ψευδαργύρου όσον αφορά τη γεωχημική τους προέλευση. Η λιθόσφαιρα περιλαμβάνει συνήθως 70-80  $\mu\text{g Zn g}^{-1}$ , ενώ τα ιζηματογενή πετρώματα περιέχουν 10-120  $\mu\text{g Zn g}^{-1}$  (Alloway, 1995; Broadley et al., 2007). Οι μέσες συγκεντρώσεις για τα περισσότερα γεωργικά εδάφη κυμαίνονται περίπου από 10 έως 300  $\mu\text{g Zn g}^{-1}$ . Δευτερευούσης σημασίας φυσικές πηγές Zn στο έδαφος αποτελούν οι ηφαιστειακές εκρήξεις, οι δασικές πυρκαγιές και η αποδόμηση της επιφανειακής οργανικής ουσίας.

Ο άνθρωπος έχει επηρεάσει σημαντικά τις εισροές ψευδαργύρου στα εδάφη. Χαρακτηριστικά από το 1850, οι εκπομπές έχουν αυξηθεί κατά τουλάχιστον 10 φορές, και κορυφώθηκαν σε 3,4 εκατ. τόνους ετησίως στις αρχές της δεκαετίας του 1980, για να μειωθούν στη συνέχεια σε 2,7 εκατ. τόνους ετησίως από τις αρχές της δεκαετίας του 1990 (Broadley et al., 2007). Ανθρωπογενείς πηγές Zn περιλαμβάνουν την καύση ορυκτών καυσίμων, τα απόβλητα ορυχείων και τα φωσφορικά λιπάσματα. Το ίδιο σημαντική είναι και η ρύπανση που προέρχεται από την ιλύ των βιολογικών καθαρισμών καθώς και τα απόβλητα των κτηνοτροφικών μονάδων. Σημαντικότερη ίσως ανθρωπογενής πηγή ρύπανσης για τον ψευδάργυρο αποτελεί η βιομηχανία εξόρυξης μεταλλευμάτων και επεξεργασίας μετάλλων. Τέλος, η περίσσεια ψευδαργύρου στην ατμόσφαιρα οφείλεται στην έκλυση του μετάλλου κατά την τήξη του, στις καύσεις του άνθρακα των καυσίμων και των ελαίων (McGrath and McCormack., 1999).

Η πλέον διαδεδομένη μορφή ψευδαργύρου στη φύση είναι ο θειούχος ψευδάργυρος (ZnS), γνωστός και ως σφαλερίτης. Ο ψευδάργυρος εμφανίζεται μόνο ως δισθενής και τα σουλφίδια του είναι αρκετά διαλυτά όπως και τα ανθρακικά του άλατα τα οποία σχηματίζονται δευτερογενώς στο έδαφος. Ο ZnS υπάρχει μεν στο εδαφικό διάλυμα από το οποίο τον προσλαμβάνουν τα φυτά, αλλά λόγω της διαλυτότητάς του, δεσμεύεται εξίσου από τα ανθρακικά όταν αυτά είναι παρόντα. Ο ψευδάργυρος, όταν το pH είναι μικρότερο του 6,5, κινείται σχετικά εύκολα και πολλές φορές πολύ χαμηλότερα της ζώνης του ριζοστρώματος (Callender, 2003). Σε υψηλά pH ο ψευδάργυρος καθιζάνει υπό μορφή  $Zn(OH)_2$  και παρουσιάζει τη μικρότερη διαλυτότητα στην τιμή 9,5. Επειδή το  $Zn(OH)_2$  είναι ασταθές, μετατρέπεται σε  $ZnCO_3$  (σμιθσονίτης) ή και λιγότερο σε  $Zn_4(OH)_2SiO_2O_7 \cdot H_2O$  (ημιμορφίτη). Την περιεκτικότητα του εδαφικού διαλύματος σε ψευδάργυρο ελέγχουν επίσης τα ορυκτά της αργίλου, τα οξειδία του σιδήρου και του αργιλίου και η οργανική ουσία. Επίσης, ο  $ZnCO_3$  είναι πολλές φορές πιο ευδιάλυτος των εδαφικών συμπλόκων ενώσεων του ψευδαργύρου.

Ο ψευδάργυρος είναι ένα μέταλλο απαραίτητο σε μικρές ποσότητες για την επιβίωση και ανάπτυξη των ανώτερων οργανισμών. Έχει πρωταρχικό ρόλο σε αρκετές σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες, όπως είναι ο μεταβολισμός των πρωτεϊνών, η γονιδιακή έκφραση, η δομική και λειτουργική ακεραιότητα των βιομεμβρανών, η φωτοσύνθεση κ.α (Marschner, 1995; Rout and Das, 2009). Η ανεπάρκεια ψευδαργύρου στα φυτά παρατηρείται συχνότερα απ ότι η τοξικότητα, ωστόσο σε εδάφη που εμπλουτίζονται από ανθρωπογενείς πηγές οι αρνητικές επιδράσεις στα φυτά μπορεί να είναι περισσότερο βλαβερές (Broadley et al., 2007; Kambhampati et al., 2003). Συμπτώματα τοξικότητας, συνήθως γίνονται ορατά σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από  $300 \text{ mg Zn kg}^{-1}$  ξηρού βάρους φύλλων, αν και ορισμένες καλλιέργειες παρουσιάζουν συμπτώματα τοξικότητας ακόμα και σε συγκεντρώσεις μικρότερες από  $100 \text{ mg Zn kg}^{-1}$  ξηρού βάρους φύλλων (Broadley et al., 2007; Chaney, 1993; Marschner, 1995). Ωστόσο δεν είναι λίγες οι περιπτώσεις που τα όρια τοξικότητας μπορεί να είναι μεταβλητά, ακόμη και εντός του ίδιου είδους. Συνήθη παραδείγματα τοξικότητας Zn στα φυτά είναι τα παρακάτω (Broadley et al., 2007):

- Διαταραχή της φωτοσύνθεσης
- Βλάβες στις κυτοπλασμικές μεμβράνες
- Παρεμπόδιση ενζυμικών αντιδράσεων
- Βλάβες στο γενετικό υλικό ( DNA )
- Οξείδωση πρωτεϊνών

### **Νικέλιο (Ni)**

Το νικέλιο είναι ένα μέταλλο με ατομικό αριθμό 28 και ατομικό βάρος 58,71. Στο φλοιό της γης η μέση συγκέντρωση Ni ανέρχεται σε  $75 \text{ mg kg}^{-1}$  πετρώματος, ενώ στα εδάφη περίπου σε  $20 \text{ mg kg}^{-1}$  εδάφους (Alloway, 1995).

Η απόθεση της υπάμενης τέφρας, είτε από ανθρωπογενείς διεργασίες (καύσιμα, δασικές πυρκαγιές) είτε από φυσικά φαινόμενα (ηφαιστειακή δραστηριότητα), είναι η μεγαλύτερη πηγή εισροής του νικελίου στο έδαφος. Η αποσάθρωση του ορυκτού γαρνιερίτη (υδατούχο πυριτικό άλας) και των σιδηροπυρίτων συμβάλλουν επιπλέον στον εμπλουτισμό του εδάφους σε νικέλιο. Η ιλύς των βιολογικών καθαρισμών, είναι επίσης μια σημαντική πηγή νικελίου, καθώς πολλά οικιακά προϊόντα καθαρισμού έχουν αυξημένη περιεκτικότητα σε Ni (Callender, 2003; Μήτσιος, 2004).

Από τα επτά γνωστά ραδιοϊσότοπα του μετάλλου, ιδιαίτερα έχει μελετηθεί το  $^{63}\text{Ni}$  για τη συμπεριφορά του στα εδάφη και την επίδραση του στα φυτά. Το νικέλιο έχει αποδειχτεί ότι είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη πολλών μικροοργανισμών όπως αλγών, όπου έχει βρεθεί ότι λαμβάνει μέρος στη σύνθεση και δραστηριότητα του ενζύμου ουρεάση. Στους ανώτερους οργανισμούς, η ακριβής λειτουργία του μετάλλου δεν είναι ξεκάθαρη ωστόσο φαίνεται να είναι αναγκαίο σε μικρές ποσότητες. Έλλειψη νικελίου δεν παρατηρείται σε φυτά και ζώα, αφού οι αναγκαίες ποσότητες είναι εύκολα προσβάσιμες και αφομοιώσιμες. Αντίθετα, η τοξικότητα του Ni είναι φαινόμενο που συναντάται στα φυτά, αν και όχι τόσο συχνό όσο του Zn και του Cd μπορεί όμως να είναι ιδιαίτερα έντονο σε εδάφη επιβαρημένα με μεγάλες συγκεντρώσεις νικελίου (Rooney et al., 2007).

Η συγκέντρωση του Ni σε φυτά που αναπτύσσονται σε μη ρυπασμένα εδάφη κυμαίνεται από 0,1 έως 5 mg kg<sup>-1</sup>. Ελαφρώς υψηλότερες τιμές έχουν βρεθεί σε φυτά που καλλιεργούνται σε εδάφη με αυξημένα ποσοστά οργανικής ουσίας καθώς και σε διάφορα είδη δασικών δέντρων. Οι συγκεντρώσεις του Ni σε φυτά σερπεντινικών περιοχών είναι από 20 έως 100 mg kg<sup>-1</sup>. Βέβαια, η σερπεντινική χλωρίδα περιλαμβάνει και μια ομάδα φυτών με συσσώρευση νικελίου στους ιστούς μεγαλύτερη από 1000 mg kg<sup>-1</sup> τα οποία έχουν χαρακτηριστεί ως υπερσυσσωρευτές νικελίου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το *Sebertia acuminata*, δέντρο της Νέας Καληδονίας, που μπορεί να

δεσμεύσει έως και το 25% του ξηρού βάρους του σε νικέλιο (Callahan et al., 2008). Το νικέλιο θεωρείται στοιχείο με μεγάλη κινητικότητα μέσα στο φυτικό οργανισμό και κατά τη διάρκεια της βλαστικής ανάπτυξης των φυτών συγκεντρώνεται κυρίως στα φύλλα (McGrath, 1995). Η ανθεκτικότητα των φυτών υπερασσωρευτών στο νικέλιο κυρίως επιτυγχάνεται με συμπλοκοποίηση του νικελίου με μεταλλοενώσεις (nicotianamine NA) και με οργανικά οξέα, όπως μαλικό και κιτρικό οξύ (Cuiyun Chen et al., 2009).

### **Κάδμιο (Cd)**

Το μέταλλο αυτό ανήκει στις καρκινογόνες ενώσεις και είναι γνωστό ότι έχει πολλές αρνητικές επιπτώσεις στα υδατικά οικοσυστήματα και εδάφη. Ρυπαίνει το περιβάλλον κατά την χρήση και καθαρισμό των μεταλλευμάτων του και κατά την τήξη και καθαρισμό του χαλκού και νικελίου. Χρησιμοποιείται κυρίως στην ηλεκτροαπόθεση, ως σταθεροποιητής στα πλαστικά και στους ηλεκτροσυσσωρευτές νικελίου-καδμίου. Επίσης υπάρχει στα καυσαέρια των καυσίμων. Η αύξηση των επιπέδων του καδμίου στα εδάφη είναι κυρίως το αποτέλεσμα της εκτεταμένης χρήσης λιπασμάτων που περιέχουν προσμίξεις καδμίου (Grispen et al., 2006), όπως τα φωσφορικά λιπάσματα, η ιλύς βιολογικών καθαρισμών, τα κομποστοποιημένα αστικά απόβλητα και η τέφρα από την καύση του άνθρακα (Callender, 2003). Η περιβαλλοντική διάχυση και απόθεση του Cd εξαρτάται από τις συνθήκες και την χημική σύνθεση του μετάλλου, αλλά συνήθως μεγάλο ποσοστό παραμένει στο έδαφος και στο υδρόβιο περιβάλλον όπου συσσωρεύεται στα ιζήματα και λιγότερο στους οργανισμούς. (Veltman et al., 2008).

Το κάδμιο είναι ένα τοξικό μέταλλο που απορροφάται εύκολα από τα φυτά και διοχετεύεται εύκολα μέσω της τροφικής αλυσίδας στα νεφρά και το σκώτι του ανθρώπου με αποτέλεσμα να προξενεί σοβαρές βλάβες στην υγεία. Το μέταλλο έχει την ικανότητα να βιοσυσσωρεύεται σε μικροοργανισμούς και σε ιστούς φυτών και ζώων. Στα υδρόβια μικρόφυτα,



παρουσιάζει συντελεστές βιοσυγκέντρωσης περίπου 50 φορές και στα ψάρια 100 φορές σε σχέση με τις συγκεντρώσεις στα νερά (Taylor, 1983). Παρά το ότι το κάδμιο συσσωρεύεται στους οργανισμούς του γλυκού νερού δεν βιομεγενθύνεται στην τροφική αλυσίδα (Veltman et al., 2008).

Για τα φυτά το κάδμιο αποτελεί ένα μη απαραίτητο στοιχείο η παρουσία του οποίου προκαλεί επίσχεση της ανάπτυξης, αλληλεπίδραση με την απορρόφηση και τη διακίνηση θρεπτικών στοιχείων, παρεμπόδιση ενζύμων, μείωση της φωτοσύνθεσης και παράγωγη ελεύθερων ριζών (Gouia et al., 2003; Hernández et al., 1997). Το Cd έχει βρεθεί ότι επιδρά στο φωτοσύνστημα II (PSII), τόσο στο οξειδωτικό όσο και στο αναγωγικό μέρος. Επίσης, τα ενεργά κέντρα του PSII καθώς και η μεταφορά των ηλεκτρονίων επηρεάζονται από την αλληλεπίδραση με το Cd που προκαλεί ζημιές στην ενεργότητα των ενζύμων και/ή την δομή των πρωτεϊνών. Μια άλλη έμμεση επίδρασή του στα φυτά, προέρχεται από την παρεμπόδιση της βιοσύνθεσης των χλωροφυλλών (Haag-Kerwer et al., 1999).

Μια γενική απόκριση των φυτών στα βαρέα μέταλλα, μεταξύ των οποίων και το κάδμιο, είναι η επαγωγή της σύνθεσης μικρο ή μακροσκοπικών ενώσεων που τα δεσμεύουν, συμβάλλοντας στην αποτοξίνωση. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν αμινικής φύσης ενώσεις όπως η προλίνη, η ιστιδίνη και οι πολυαμίνες. Στη δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνονται ενώσεις πεπτιδικής φύσης, πλούσιες σε κυστεΐνη (αμινοξύ που περιέχει θείο) και γλουταμικό οξύ, όπως η γλουταθειόνη, οι φυτοχηλατίνες και οι μεταλλοθειονίνες (Prasad, 1995; Sharma and Dietz, 2006) οι οποίες συμπλοκοποιούν το μέταλλο και με τον τρόπο αυτό παρεμποδίζουν τη δράση του στις ενδοκυττάρειες θέσεις - αποδέκτες. Η συσσώρευση του καδμίου σε μακρόφυτα (υδρόβια φυτά, ορατά με γυμνό μάτι) ποικίλει ανάλογα με το είδος και τους ιστούς που εξετάζονται. Στις περισσότερες των περιπτώσεων το κάδμιο συσσωρεύεται κυρίως στις ρίζες των υδρόβιων μακρόφυτων αντί στα φύλλα και τον βλαστό (Miller et al., 1983).

### 1.2.2 Ρύπανση με βαρέα μέταλλα στην Ελλάδα

Αν και μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν επίσημες μελέτες ή στοιχεία σχετικά με την αναγνώριση και καταγραφή των ρυπασμένων περιοχών στον Ελλαδικό χώρο υπάρχουν αρκετές έρευνες εν εξελίξει που καταδεικνύουν έναν αρκετά μεγάλο αριθμό ρυπασμένων περιοχών με βαρέα μέταλλα.

Στην Ελλάδα ίσως η πιο ρυπασμένη περιοχή είναι εκείνη του Λαυρίου. Το Λαύριο αποτέλεσε πηγή μεταλλευτικού πλούτου, όπου για πάνω από 3000 χρόνια διατηρήθηκαν μεταλλευτικές και μεταλλουργικές δραστηριότητες πολυμεταλλικών θειούχων μεταλλευμάτων. Οι ιδιαίτερα έντονες δραστηριότητες οι οποίες έλαβαν χώρα τα τελευταία 100 χρόνια προκάλεσαν την παραγωγή τεράστιων όγκων αποβλήτων και υπολειμμάτων, τα οποία στην συνέχεια κάτω από την επίδραση του περιβαλλοντικών παραγόντων κινητοποιήθηκαν και μεταφέρθηκαν στις γύρω περιοχές, συμβάλλοντας στην σοβαρή και εκτεταμένη ρύπανση του εδάφους και των υπογείων υδάτων με μέταλλα όπως Pb, As, Cd, Sb, Cr, Ni, Cu, Hg, και Zn (Kannanov et al., 2001; Xenidis et al., 2003). Εξάλλου το μεγαλύτερο μέρος της σύγχρονης πόλης του Λαυρίου χτίστηκε πάνω στα μεταλλευτικά απορρίμματα. Γεωχημικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε περίπου 170 km<sup>2</sup> της ευρύτερης περιοχής έδειξαν ότι το 75% περίπου (130 km<sup>2</sup>) της περιοχής είναι ρυπασμένο με τα τοξικά μέταλλα Pb, As, Cd, Cr, Cu, Ni και Zn (Kontopoulos et al., 1995).

Το Θριάσιο Πεδίο είναι επίσης μια ιδιαίτερα επιβαρυσμένη περιοχή με τοξικά μέταλλα εξαιτίας των πολλών και μεγάλων βιομηχανιών, διυλιστηρίων και ναυπηγείων (Mavrakis et al., 2007; Nakos, 1982). Σύμφωνα με έρευνα του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών, στα υπόγεια ύδατα του Θριάσιου Πεδίου έχουν καταγραφεί υψηλές τιμές μολύβδου που υπερβαίνουν τα επιτρεπτά όρια της Ε.Ε. και οι οποίες πιθανότατα συνδέονται και με τα απορρέοντα υγρά από τη χωματερή των Λιουσίων.

Η ευρύτερη περιοχή του Θερμαϊκού κόλπου αντιμετωπίζει και αυτή σοβαρά προβλήματα ρύπανσης, λόγω κυρίως των ρύπων που μεταφέρονται από τα τρία μεγάλα ποτάμια Αξιός, Λουδίας και Αλιάκμονας και καταλήγουν σ' αυτόν, όπως επίσης και από τοπικούς εποχιακούς χείμαρρους, αποστραγγιστικές τάφρους, βυρσοδεψεία, φρεάτια υπερχείλισης, αστικά και γεωργικά εκπλύματα. Σύμφωνα με μελέτη του Εργαστηρίου Ελέγχου Ρύπανσης Περιβάλλοντος του Α.Π.Θ. παρατηρήθηκε ρύπανση από βαρέα μέταλλα, ιδιαίτερα των μολύβδου, ψευδαργύρου και χαλκού, σχεδόν σε όλο το μήκος των ακτών του κόλπου. Τα ιζήματα που συλλέγονται από τον κόλπο της Θεσσαλονίκης έχουν δείξει αυξημένη συνολική περιεκτικότητα σε μέταλλα, αλλά σε σύγκριση με το παρελθόν, η κατάσταση φαίνεται να έχει βελτιωθεί σημαντικά (Christophoridis et al., 2009).

Εκτός των παραπάνω ευρύτερα ρυπασμένων περιοχών, υπάρχουν και αρκετές περιπτώσεις όπου η ρύπανση είναι εντοπισμένη σε μικρές περιοχές ανά την Ελλάδα, πλην όμως προκαλούνται ιδιαίτερα προβλήματα στην οικολογική ισορροπία των περιοχών αυτών. Πρόκειται για εκτάσεις πλησίον μεταλλείων και ορυχείων (Στρατώνι Χαλκιδικής, Κίρκης Αλεξανδρούπολης κ.α.), περιοχές με εντατική γεωργία όπως η Θεσσαλία (Cd από λιπάσματα), αποδέκτες ποταμών όπως λίμνες και μικροί κόλποι (Stamatis et al., 2002; Uluturhan, 2009) και τέλος βιομηχανικές περιοχές (Οινόφυτα Αττικής) (Vasilatos et al., 2008).

### **1.3 Τεχνολογίες αποκατάστασης εδαφών**

Τα έντονα προβλήματα ρύπανσης του εδάφους οδήγησαν σταδιακά στην ανάπτυξη πολλών αποτελεσματικών τεχνολογιών αποκατάστασης εδαφών και υπογείων υδάτων. Οι τεχνολογίες αυτές μπορεί να είναι ιδιαίτερα εξειδικευμένες, οπότε επιβάλλεται να ταξινομηθούν σε κατηγορίες βάσει κάποιων κριτηρίων. Κατ' αρχάς μπορούν να ταξινομηθούν σε *in-situ* και *ex-*

situ τεχνολογίες ανάλογα με το αν εφαρμόζονται απευθείας στο πεδίο ή αν περιλαμβάνουν την μεταφορά ή και διάθεση του ρυπασμένου μέσου μακριά από το πεδίο σε ειδικές εγκαταστάσεις. Ένα διαφορετικό κριτήριο για την διάκρισή τους είναι ανάλογα με τους μηχανισμούς τους οποίους εκμεταλλεύονται για την απομάκρυνση του ρύπου-στόχου. Έτσι κατατάσσονται σε φυσικές, χημικές και βιολογικές μεθόδους. Τέλος μπορούν να ταξινομηθούν με βάση τον τρόπο αντιμετώπισης του ρύπου, δηλαδή αν προκαλείται καταστροφή του, απομάκρυνσή του, ή ακινητοποίηση - περιορισμός. Η επιλογή της κατάλληλης τεχνολογίας αποκατάστασης γίνεται, κατόπιν λεπτομερούς σχεδιασμού, λαμβάνοντας υπόψη κριτήρια όπως:

- Ο τύπος και τα χαρακτηριστικά του υφιστάμενου ρύπου
- Τα χαρακτηριστικά του προς αποκατάσταση πεδίου (έδαφος, κλίμα, τοπογραφία, υδρογεωλογία κ.α.)
- Το προβλεπόμενο κόστος (αρχικό, λειτουργικό, συντήρησης)
- Ο επιθυμητός στόχος

Η τεχνολογία που αυτή την στιγμή αποτελεί την πλέον χρησιμοποιούμενη μεθοδολογία για την αναβάθμιση ρυπασμένων εδαφών με τοξικά μέταλλα είναι η εκσκαφή, μεταφορά και ο ενταφιασμός του εδάφους σε κατάλληλους χώρους απόθεσης επικινδύνων και τοξικών αποβλήτων. Η έκπλυση του εδάφους με χημικές ουσίες (soil washing, chemical extraction, leaching), η θερμική επεξεργασία και η εφαρμογή υποπίεσης (vacuum extraction) είναι μερικές επιπλέον μέθοδοι απορρύπανσης εδαφών που χρησιμοποιούνται σήμερα (Dermont et al., 2008).

Δυστυχώς όμως στις περισσότερες περιπτώσεις οι λύσεις των παραπάνω τεχνολογιών είναι εξαιρετικά δαπανηρές, προκαλούν εδαφολογικές διαταραχές, αφού καταστρέφουν την δομή του εδάφους, ενώ δεν παρουσιάζουν ευρεία αποδοχή από την κοινωνία (Gardea-Torresdey et al., 2005; Ghosh and Singh, 2005; McGrath et al., 2001; Mulligan et al., 2001).

Αντίθετα, η φυτοεξυγίανση έχει αναδειχτεί, ως μια εναλλακτική στις καθιερωμένες μεθοδολογίες τεχνική για την αφαίρεση των βαρέων μετάλλων από τα εδάφη. Θεωρείται μια ελπιδοφόρα μέθοδος δεδομένου ότι είναι οικονομικά αποδοτική, φιλική προς το περιβάλλον και συνεπώς εύκολα αποδεκτή από το κοινό.

### 1.3.1 Η τεχνολογία της φυτοεξυγίανσης

Η φυτοεξυγίανση ή φυτοαποκατάσταση (Phytoremediation) είναι μια καινοτόμος τεχνολογία που βασίζεται στη χρήση φυτών για την εξυγίανση-αποκατάσταση ρυπασμένων εδαφών, επιφανειακών και υπόγειων υδάτων και ατμόσφαιρας. Η τεχνολογία αυτή εκμεταλλεύεται τη φυσική ιδιότητα πολλών φυτικών ειδών να απορροφούν, να συσσωρεύουν και σε μερικές περιπτώσεις να μεταβολίζουν ένα μεγάλο αριθμό ρύπων του εδάφους και του νερού. Τα φυτά μπορεί να εξασθενίσουν ή να υποβιβάσουν οργανικούς ρύπους, ή να αφαιρέσουν και να σταθεροποιήσουν ρύπους μετάλλων. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί μέσω μιας μεθόδου ή συνδυασμού μεθόδων φυτοεξυγίανσης.

Εφαρμογές των φυτών στην προστασία του περιβάλλοντος αναπτύσσονται και εξελίσσονται με μεγάλη ταχύτητα μόλις την τελευταία εικοσαετία, ωστόσο η ιδέα άρχισε να εφαρμόζεται σχεδόν από τον 17<sup>ο</sup> αιώνα, με αναφορές για χρήση φυτών στην επεξεργασία υγρών αποβλήτων. Από τις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα τα *Thlaspi caerulescens* και *Viola calaminaria* διαπιστώθηκε όχι μόνο ότι αντέχουν την παρουσία βαρέων μετάλλων αλλά και συσσωρεύουν πολύ μεγάλες ποσότητες στα φύλλα τους (Brown et al., 1995). Τα τελευταία χρόνια η τεχνολογία της φυτοεξυγίανσης έχει επεκταθεί πέραν από την χρησιμοποίηση στην επεξεργασία υγρών αποβλήτων, στην εξυγίανση αβαθών υδροφορέων και υδάτινων αποδεκτών και έχει ως στόχο

την ρύπανση που προκαλούν κυρίως φυτοπροστατευτικά και ανόργανα στοιχεία όπως άζωτο και φώσφορος (Watanabe, 1997).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης και η ιδιότητα των φυτών να δεσμεύουν ρύπους της ατμόσφαιρας. Τα φύλλα των φυτών καλύπτονται με κηρώδεις ουσίες, που ευνοούν την προσρόφηση λιποφιλικών πτητικών οργανικών ουσιών, όπως για παράδειγμα οι αρωματικοί υδρογονάνθρακες. Με τον τρόπο αυτό τα φυτά συμβάλουν στον περιορισμό της συγκέντρωσης αυτών των ουσιών στην ατμόσφαιρα (Cunningham, 1996).

Η χρήση της φυτοεξυγίανσης ενδείκνυται ιδιαίτερα σε περιπτώσεις ρύπανσης του εδάφους με βαρέα μέταλλα (MacNair, 2003) και ραδιενεργά στοιχεία (Willey, 2007), με οργανικές ενώσεις, όπως χλωριωμένους διαλύτες, πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες, πολυχλωριωμένα διφαινύλια, εκρηκτικές ουσίες (Hannink et al., 2007; Rao et al., 2009), αλλά και με θρεπτικά συστατικά σε περίσσεια (νιτρικών, αμμωνιακών και φωσφορικών) (Watanabe, 1997).

### 1.3.1.1 Τεχνικές φυτοεξυγίανσης

Στην τεχνολογία της φυτοεξυγίανσης, περιλαμβάνονται τεχνικές - μηχανισμοί που τελικά οδηγούν σε:

#### I. Απομάκρυνση

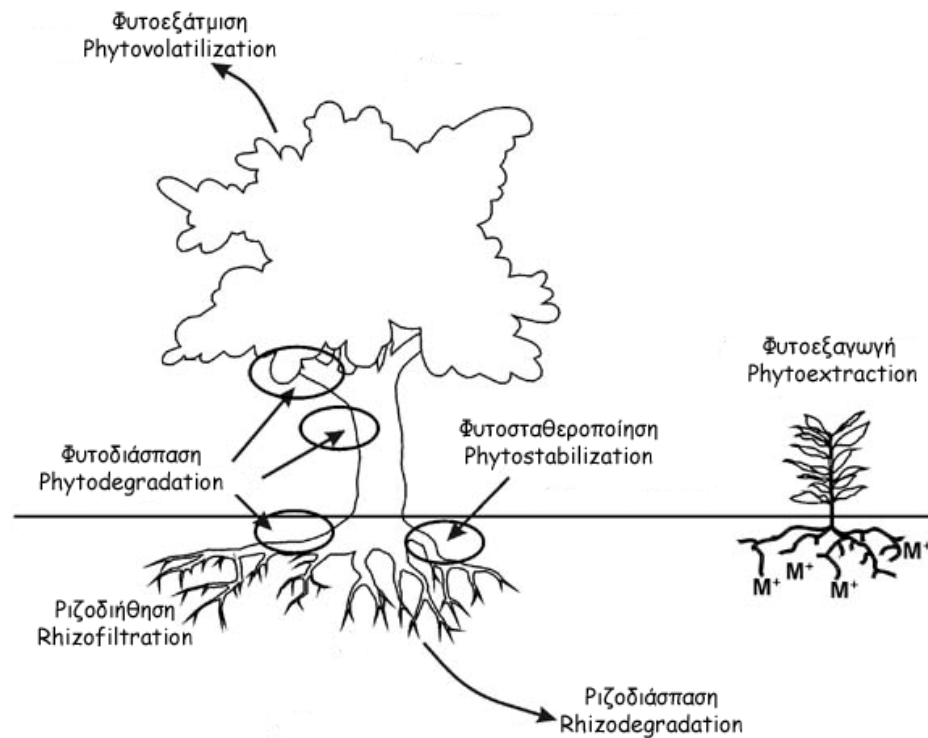
- Φυτοεξαγωγή (Phytoextraction)
- Ριζοδιήθηση (Rhizofiltration)
- Φυτοεξάτμιση (Phytonovolatilization)

#### II. Αποδόμηση

- Φυτοδιάσπαση (Phytodegradation)
- Ριζοδιάσπαση (Rhizodegradation)

#### III. Ακινητοποίηση

- Φυτοσταθεροποίηση (Phytostabilization)



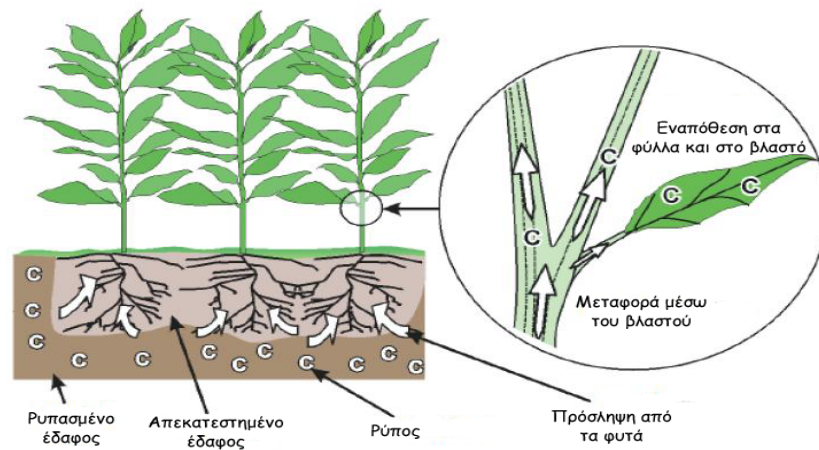
Εικόνα 1.1 Τύποι φυτοεξυγίανσης (Naval Facilities Engineering Command, USA).

## I. Απομάκρυνση-Συσσώρευση

### ➤ Φυτοεξαγωγή (Phytoextraction)

Η φυτοεξαγωγή (ή φυτοσυσσώρευση - phytoaccumulation), αναφέρεται στην πρόσληψη μετάλλων και τη μεταφορά τους στα υπέργεια τμήματα του φυτού. Η τεχνική αυτή εφαρμόζεται σε περιπτώσεις ρυπασμένων εδαφών με βαρέα μέταλλα και αποδεικνύεται να είναι μία απ' τις πιο αποτελεσματικές μεθόδους φυτοεξυγίανσης. Στηρίζεται στη χρησιμοποίηση φυτών τα οποία έχουν την ικανότητα να συσσωρεύουν υψηλές συγκεντρώσεις μετάλλων στη βιομάζα τους, ως και 100 φορές περισσότερο σε σχέση με άλλα φυτά (MacNair, 2003). Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα φυτά που χρησιμοποιούνται έχουν μεγάλη ικανότητα συσσώρευσης των ρύπων και μεταφέρουν τα μέταλλα απ' το έδαφος στις ρίζες, στο βλαστό και τα φύλλα τους. Μετά από κάποιο χρονικό διάστημα τα φυτά αυτά θερίζονται και στη συνέχεια είτε ξηραίνονται, είτε συμπέζονται, είτε καίγονται. Η διαδικασία

της συγκομιδής επαναλαμβάνεται αρκετές φορές μέχρι να μειωθεί η ρύπανση στα αποδεκτά επίπεδα. Το συμπέρασμα που προκύπτει είναι ότι στη φυτοεξαγωγή, μέσω της λήψης και της συσσώρευσης των μετάλλων στους φυτικούς ιστούς, επιτυγχάνεται η μόνιμη απομάκρυνση του ρύπου απ' το έδαφος.

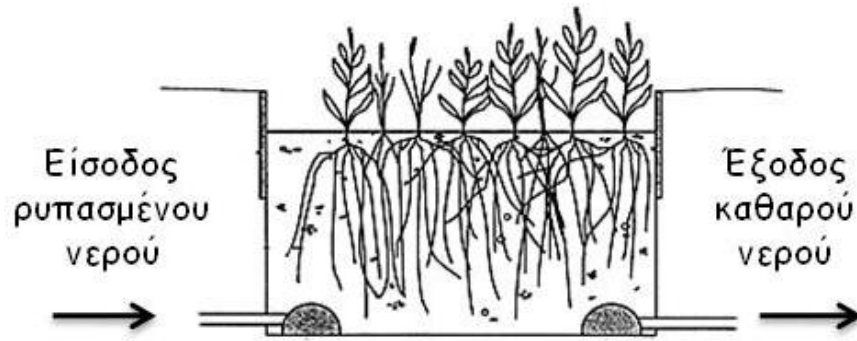


**Εικόνα 1.2** Απορρόφηση του ρύπου από τη ριζά και μεταφορά στο υπέργειο μέρος του φυτού (Biology-Online.org).

#### ➤ Ριζοδιήθηση (Rhizofiltration)

Η ριζοδιήθηση περιλαμβάνει τη ρόφηση στις φυτικές ρίζες ρυπαντών οι οποίοι βρίσκονται σε υδατικά διαλύματα. Χρησιμοποιούνται φυτά (υδρόβια ή χερσαία) που απορροφούν, συγκεντρώνουν τους ρύπους, από υδατικές πηγές στις ρίζες τους. Χρησιμοποιείται για τα μέταλλα Pb, Cd, Cu, Ni, Zn και Cr τα οποία αρχικά συγκρατούνται ανάμεσα στις ρίζες. Οι υδροβιότοποι που έχουν αναπτυχθεί για την επεξεργασία ρυπασμένων υδατικών αποβλήτων είναι ένα παράδειγμα ριζοδιήθησης. Είναι μια οικονομικά ανταγωνιστική τεχνολογία στην επεξεργασία υδατικών αποβλήτων χαμηλής περιεκτικότητας σε μέταλλα.





**Εικόνα 1.3** Ένα απλό σύστημα ριζοδιήθησης για τον καθαρισμό υδάτινων αποδεκτών και υπόγειων υδάτων (Biology - Online.org).

➤ Φυτοεξάτμιση (Phytovolatilization)

Κατά τη φυτοεξαέρωση, μέταλλα και οργανικές ουσίες που προσλαμβάνονται από τα φυτά, μετατρέπονται σε πτητικές μορφές και ελευθερώνονται στην ατμόσφαιρα. Μέσω αυτού του μηχανισμού επιτυγχάνεται η εξυγίανση ρυπασμένων εδαφών και υπόγειων υδάτων χωρίς να είναι απαραίτητη η συγκομιδή του φυτικού υλικού.

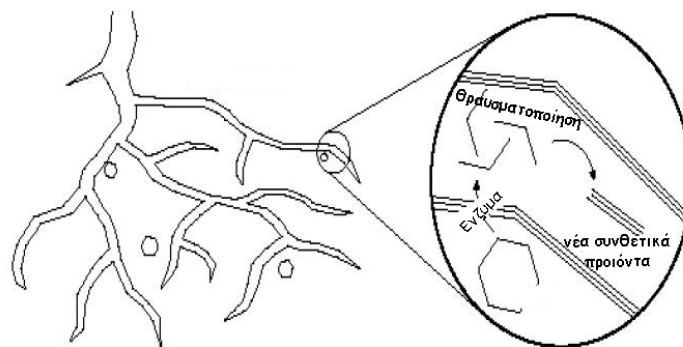
## II. Αποδόμηση

➤ Φυτοδιάσπαση (Phytodegradation)

Η φυτοδιάσπαση (ή φυτομετασχηματισμός - phytotransformation), βασίζεται στη διάσπαση-αποδόμηση του ρυπαντή μέσω μεταβολικών διεργασιών εντός του φυτού, είτε εξωτερικά στην περιοχή της ρίζας μέσω της παραγωγής ενζύμων. Μετά την διάσπαση του ρυπαντή, πραγματοποιείται η ενσωμάτωσή του με τη μορφή απλούστερων μορίων στους φυτικούς ιστούς. Ο μηχανισμός της φυτοδιάσπασης χρησιμοποιείται σε ρυπασμένα εδάφη, επιφανειακά και υπόγεια ύδατα.

➤ Ριζοδιάσπαση-Rhizodegradation

Η ριζοδιάσπαση (ή φυτοδιέγερση-phytostimulation, ή βιοεξυγίανση μέσω της ριζόσφαιρας-rhizosphere biodegradation), αναφέρεται στην διάσπαση οργανικών ρυπαντών στο έδαφος, μέσω μικροβιακών πληθυσμών που αναπτύσσονται στην περιοχή του ριζικού συστήματος (ριζόσφαιρα). Οι μικροοργανισμοί (μύκητες, βακτήρια), διασπούν ή μετασχηματίζουν οργανικές ουσίες και τις χρησιμοποιούν ως θρεπτικό υπόστρωμα για την ανάπτυξή τους. Η παρουσία των φυτών ευνοεί τη διαδικασία της εξυγίανσης δεδομένου ότι μέσω των ριζών εκκρίνονται ουσίες και μεταφέρεται οξυγόνο και νερό, στοιχεία απαραίτητα για τη μικροβιακή ανάπτυξη.



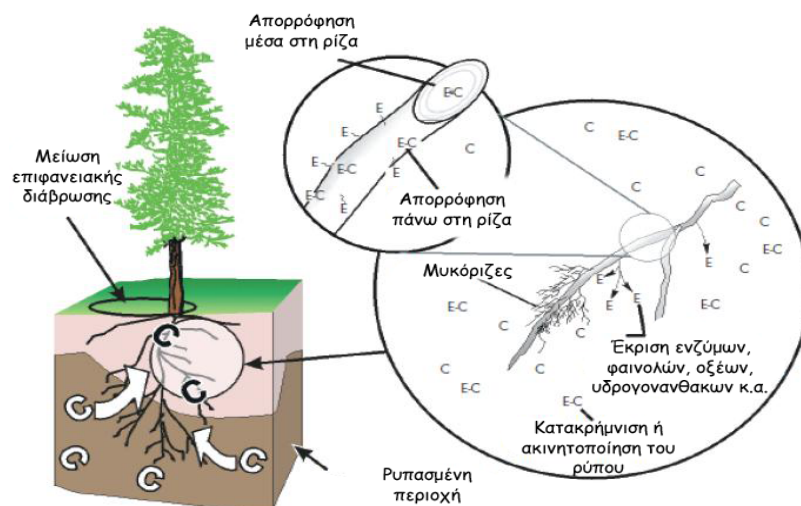
**Εικόνα 1.4** Αποδόμηση του ρυπαντή μέσω μεταβολικών- ενζυμικών διεργασιών και δημιουργία νέων προϊόντων (Biology-Online.org).

### III. Ακίνητοποίηση

➤ Φυτοσταθεροποίηση (Phytostabilization)

Πρόκειται για την ακίνητοποίηση του ρύπου στο έδαφος μέσω καταβύθισης, συμπλοκοποίησης και αναγωγής μετάλλων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την δέσμευση των ρύπων στο έδαφος (οργανική ουσία), κοντά στη ριζόσφαιρα καθιστώντας δύσκολη την μεταφορά τους στον υπόγειο υδροφόρο ή μέσω

του άνεμου. Κύριες διεργασίες της φυτοσταθεροποίησης είναι η λιγνιτοποίηση που περιλαμβάνει τη μεταφορά των ρύπων και τη σταθεροποίησή τους με μη αντιστρεπτές χημικές αντιδράσεις στα τοιχώματα κυττάρων και η χουμοποίηση κατά την οποία μικροβιακά και φυτικά ένζυμα ενώνουν τους ρύπους στις χουμικές ενώσεις του εδάφους.



**Εικόνα 1.5** Ακινητοποίηση ρύπων με λιγνιτοποίηση στη ρίζα ή με πρόσδεση στο έδαφος (Biology-Online.org).

Η τεχνολογία της φυτοεξυγίανσης καλύπτει ένα μεγάλο φάσμα δράσης ως προς το είδος των ρύπων αλλά και ως προς την επιλογή στρατηγικών που θα χρησιμοποιηθούν για να επιτευχτεί το προσδοκώμενο αποτέλεσμα (Πίνακας 1.3). Στην περίπτωση των βαρέων μετάλλων για να συμβεί αυτό απαιτείται είτε φυσική απομάκρυνση μέσω φυτοσυσσώρευσης είτε ακινητοποίηση μέσω φυτοσταθεροποίησης. Η πρώτη μέθοδος, η οποία θα αναλυθεί παρακάτω, στοχεύει στην απομάκρυνση του ρύπου με χρήση φυτών που διαθέτουν το γενετικό δυναμικό να προσλάβουν και να συσσωρεύσουν τον ρύπο στους ιστούς τους, ενώ η δεύτερη στοχεύει στην ακινητοποίηση του ρύπου στο έδαφος με χρήση ανθεκτικών στα μέταλλα φυτών τα οποία διαθέτουν εκτεταμένο ριζικό σύστημα και δύνανται να ακινητοποιήσουν τον ρύπο στην

ριζόσφαιρα, παρέχοντας κάλυμμα του εδάφους και εμποδίζοντας την διάβρωση από το νερό και τον αέρα (Krämer, 2005).

**Πίνακας 1.3** Τρόπος δράσης της κάθε μεθόδου φυτοεξυγίανσης σε διάφορα πεδία εφαρμογής, ανάλογα με τον ρυπαντή στόχο.

Μέθοδος	Τρόπος δράσης	Πεδίο εφαρμογής	Ρύποι
Φυτοεξαγωγή Phytoextraction	Πρόσληψη και συσσώρευση του ρύπου στις ρίζες ή τα υπέργεια τμήματα	Έδαφος, Ιζήματα, ιλύς	Μέταλλα (Pd, Cd, Zn, As, Cu, Cr, Co, Ni, Mg, Mo, Hg) ραδιονουκλεΐδια ( $^{90}\text{Sr}$ , $^{137}\text{Cs}$ , $^{239}\text{Pu}$ , $^{238,234}\text{U}$ )
Ριζοδιήθηση Rhizofiltration	Ρόφηση του ρύπου από το υδατικό διάλυμα επάνω ή μέσα στις ρίζες	Υπόγεια και επιφανειακά νερά	Μέταλλα, ραδιονουκλεΐδια, υδροφοβικές οργανικές ενώσεις
Φυτοεξάτμιση Phytovolatilization	Πρόσληψη και απελευθέρωση στην ατμόσφαιρα	Υπόγεια νερά, έδαφος, ιλύς ιζήματα,	Πτητικές οργανικές ενώσεις, Se, Hg
Φυτοδιάσπαση Phytodegradation	Πρόσληψη και μετατροπή του ρύπου	Έδαφος, Ιζήματα, ιλύς, υπόγεια και επιφανειακά νερά	Οργανικές ενώσεις, χλωριωμένοι διαλύτες, φαινόλες, ζιζανιοκτόνα, εκρηκτικά
Ριζοδιάσπαση Rhizodegradation	Μικροβιακή αποδόμηση στην ριζόσφαιρα επαγόμενη από το φυτό	Έδαφος, Ιζήματα, ιλύς, υπόγεια νερά	TPH, PAHs, φυτοφάρμακα, χλωριωμένοι διαλύτες, PCBs
Φυτοσταθεροποίηση Phytostabilization	Σταθεροποίηση του ρύπου μέσω δέσμευσής του στο έδαφος ή μείωση της διήθησης	Έδαφος, Ιζήματα, ιλύς	Pd, Cd, Zn, As, Cu, Cr, Co και οργανικές ενώσεις

### 1.3.1.2 Φυτοσυσσώρευση

Φυτοσυσσώρευση ή φυτοεκχύλιση είναι η πρόσληψη ρυπαντών από τις φυτικές ρίζες και η μετακίνησή τους στο υπέργειο μέρος των φυτών. Η απομάκρυνση των ρυπαντών από τη θέση της ρύπανσης γίνεται με τη συγκομιδή των φυτών. Η συγκομιζόμενη βιομάζα μπορεί να μειωθεί κατ' όγκο ή κατά βάρος, με θερμικά, μικροβιολογικά, φυσικά ή χημικά μέσα. Η ανάκτηση μερικών μετάλλων όπως των Ni, Zn και Cu μπορεί να δώσει και ένα επιπλέον έσοδο (Sheoran et al., 2009; Yang et al., 2009).

Η τεχνική αυτή εφαρμόζεται κυρίως σε περιπτώσεις εδαφών και αποβλήτων που έχουν ρυπανθεί από βαρέα μέταλλα, ραδιενεργά και εκρηκτικά υλικά. Μετά από ένα πρόγραμμα φυτοεκχύλισης, το έδαφος παραμένει γόνιμο και κατάλληλο για περαιτέρω εκμετάλλευση. Η φυτοσυσσώρευση εφαρμόζεται για την απομάκρυνση μετάλλων όπως Ag, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb και Zn, μεταλλοειδών όπως As και Se, ραδιονουκλεϊδίων όπως  $^{90}\text{Sr}$ ,  $^{137}\text{Cs}$ ,  $^{239}\text{Pu}$ ,  $^{234}\text{U}$ ,  $^{238}\text{U}$  και μη μεταλλικών στοιχείων όπως B (Pletsch, 2004).

Η φυτοεκχύλιση βαρέων μετάλλων μπορεί να επιτευχθεί με δύο προσεγγίσεις:

#### 1. Φυσική φυτοσυσσώρευση

Στην φυσική φυτοεκχύλιση χρησιμοποιούνται φυτά τα οποία έχουν την ικανότητα να συσσωρεύουν πολύ μεγάλες ποσότητες βαρέων μετάλλων στους βλαστούς και τα φύλλα τους. Τυπικά, τα φυτά αυτά είναι μικρά, με μικρό ριζικό σύστημα και σχετικά αργή ανάπτυξη. Τα φυτά αυτά ονομάστηκαν υπερσυσσωρευτές (hyperaccumulators) και ορίστηκαν αρχικά ως τέτοια, τα φυτά που είναι ικανά να συσσωρεύουν πάνω από  $1000 \mu\text{g Ni g}^{-1}$  στην ξηρή υπέργεια βιομάζα τους (Boyd and Martens, 1998; Gardea-

Torresdey et al., 2005). Ωστόσο, λόγω μεγάλων διαφορών στην τοξικότητα των μετάλλων το παραπάνω κριτήριο δεν μπορεί να ισχύσει για όλα τα μέταλλα. Σύμφωνα με άλλους ερευνητές, ως υπερσυσσωρευτές μετάλλων χαρακτηρίζονται φυτά τα οποία συσσωρεύουν μέταλλα στους ιστούς τους σε συγκεντρώσεις 100 φορές υψηλότερες από αυτές που μετρούνται σε φυτά μη-συσσωρευτές, χωρίς να αναπτύσσουν κανένα σύμπτωμα τοξικότητας (Chaney et al., 2007; Kirkham, 2006; Krämer, 2005; Lasat, 2002; Salt et al., 1998). Λαμβάνοντας υπόψη ότι τα επίπεδα καδμίου στα υπέργεια τμήματα των μη συσσωρευτών συνήθως είναι  $<1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , για να χαρακτηριστεί ένα φυτό ως υπερσυσσωρευτής καδμίου θα πρέπει να συγκεντρώνει  $\geq 100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  (Kirkham, 2006).

Κριτήριο λοιπόν για τον χαρακτηρισμό ενός φυτού, ως υπερσυσσωρευτή ενός μετάλλου, έγινε τελικά δεκτό το ποσοστό επί της εκατό του μετάλλου που συγκεντρώνεται στον ξηρό υπέργειο ιστό (Gardea-Torresdey et al., 2005). Κατά συνέπεια, για να χαρακτηριστεί ένα φυτό ως υπερσυσσωρευτής θα πρέπει να συγκεντρώνει πάνω από 1000 ppm (0,1%) Pb, Co, Cu, Cr και Ni, 10000 ppm (1%) Zn και 100 ppm (0,01%) Cd στην ξηρή υπέργεια βιομάζα του (Anderson et al., 1999; Ghosh and Singh, 2005; Henry, 2000). Επιπλέον, θα πρέπει να συσσωρεύει μεγαλύτερες ποσότητες του μετάλλου στα υπέργεια τμήματά του από ότι στις ρίζες του άρα ο λόγος των συγκεντρώσεων στο υπέργειο τμήμα προς την ρίζα θα πρέπει να υπερβαίνει την μονάδα, αντίθετα από τους μη-συσσωρευτές οι οποίοι όταν εκτεθούν σε υψηλές συγκεντρώσεις μετάλλων στο έδαφος συσσωρεύουν τα μέταλλα στις ρίζες τους (Krämer, 2005; McGrath and Zhao, 2003). Μέχρι σήμερα έχουν προσδιοριστεί περισσότερα από 400 φυτικά είδη, που ανήκουν σε τουλάχιστον 45 οικογένειες φυτών, εκ των οποίων κάποια χρησιμοποιούνται ήδη σε προγράμματα φυτοεξυγίανσης (Nascimento and Xing, 2006; Salt et al., 1998). Στον Πίνακα 1.4 παρουσιάζονται μερικά από τα φυτικά είδη που εκδηλώνουν ικανότητα πρόσληψης και αφομοίωσης συγκεκριμένων στοιχείων κατά την ανάπτυξή τους σε επιβαρυμένα εδάφη.

**Πίνακας 1.4** Ενδεικτικά είδη φυτών - υπερσυσσωρευτών και τα μέταλλα που υπερσυσσωρεύουν.

Μέταλλο	Οικογένεια - είδος φυτού
Cd	Asteraceae: <i>Chamomilla recutita</i> , <i>Helianthus annuus</i> . Brassicaceae: <i>Thlaspi caerulescens</i> , <i>Arabidopsis halleri</i> Chenopodiaceae: <i>Salsola kali</i> . Hypericaceae: <i>Hypericum perforatum</i>
Cu	Commelinaceae: <i>Commelina communis</i> . Ericaceae: <i>Erica andevalensis</i> Lamiaceae: <i>Elsholtzia splendens</i> , <i>Haumaniastrum katangense</i> Geraniaceae: <i>Pelargonium spp</i>
Cr	Asteraceae: <i>Helianthus annuus</i> . Convolvulaceae: <i>Convolvulus arvensis</i> Geraniaceae: <i>Pelargonium spp</i> . Fabaceae <i>Prosopis spp</i> .
Hg	Pontederiaceae: <i>Eichhornia crassipes</i>
Ni	Brassicaceae: <i>Psychotria douarrei</i> , <i>Alyssum bertolonii</i>
Pb	Asteraceae: <i>Dittrichia viscosa</i> Brassicaceae <i>Brassica pekinensis</i> Fabaceae: <i>Sesbania drummondii</i>
Zn	Crassulaceae: <i>Sedum alfredii</i> Brassicaceae: <i>Thlaspi caerulescens</i>

Τα φυτά υπερσυσσωρευτές έχουν αναπτύξει διάφορους φυσιολογικούς μηχανισμούς ώστε να μπορέσουν να επιβιώσουν σε εδάφη πλούσια σε τέτοια τοξικά στοιχεία. Τέτοιοι μηχανισμοί είναι η επλεκτική πρόσληψη μετάλλων, η απέκκριση (Mench and Martin, 1991), η συγκράτηση μόνο των ωφέλιμων για τον μεταβολισμό ιόντων και η απομόνωση των βλαβερών σε κενά διαστήματα μέσα στα κύτταρα (Zenk, 1996). Τα περισσότερα από τα γνωστά φυτά υπερσυσσωρευτές συσσωρεύουν Ni, Co, Cu και Zn, και λιγότερο τα υπόλοιπα βαρέα μέταλλα. Ένα παράδειγμα υπερσυσσωρευτή αποτελεί η φτέρη *Pteris vitatta* που συσσωρεύει στους υπέργειους ιστούς της έως και

14.500 ppm αρσενικού (As), χωρίς να εμφανίζει συμπτώματα τοξικότητας (Ma et al., 2001; Sun et al., 2008).

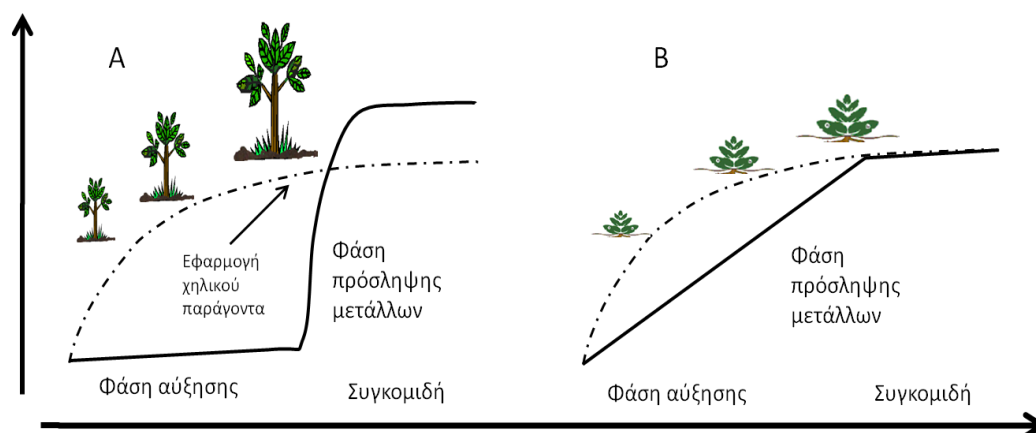
Είναι φανερό ότι τα φυτά διαθέτουν το γενετικό δυναμικό για την συσσώρευση μετάλλων, ωστόσο η σχετικά μικρή βιομάζα και η αργή ανάπτυξη των περισσότερων υπερσυσσωρευτών αποτελούν τους κύριους αρνητικούς παράγοντες για την αποτελεσματική φυτοεξυγίανση εδαφών από βαρέα μέταλλα και περιορίζουν την χρησιμοποίηση αγρονομικών πρακτικών, όπως τη μηχανική συλλογή των φυτών. Για την αντιμετώπιση αυτών των προβλημάτων έχουν γίνει προσπάθειες μεταφοράς της ικανότητας υπερσυσσώρευσης μετάλλων από φυτά υπερσυσσωρευτές σε ταχέως αναπτυσσόμενα, υψηλής βιομάζας φυτικά είδη, με τη χρήση της κλασσικής βελτίωσης φυτών. Δυστυχώς όμως, η κλασσική βελτίωση δεν έχει δώσει σημαντικά αποτελέσματα λόγω της φυλετικής ασυμβατότητας μεταξύ των ειδών (Lasat, 2002).

Εναλλακτικά, η βιοτεχνολογία με τη γενετική τροποποίηση φυτών παρέχει τη δυνατότητα για άμεση μεταφορά των υπεύθυνων γονιδίων, ξεπερνώντας έτσι το πρόβλημα της ασυμβατότητας μεταξύ των ειδών. Τα ερευνητικά αποτελέσματα στον τομέα αυτό φανερώνουν ότι είναι δυνατή η δημιουργία γενετικά τροποποιημένων φυτών με αυξημένη ικανότητα βιοσυσσώρευσης (Gorinova et al., 2007; Peralta-Videa et al., 2009; Van Aken, 2008). Σε πλήθος πειραμάτων έχουν μελετηθεί οι μηχανισμοί πρόσληψης και συσσώρευσης των βαρέων μετάλλων από τα φυτά και επίσης έχουν απομονωθεί γονίδια υπεύθυνα για την βιοσυσσώρευση. Η περαιτέρω κατανόηση των φυσιολογικών και μοριακών μηχανισμών πρόσληψης και συσσώρευσης αποτελούν σήμερα θέματα αιχμής στην έρευνα της βιολογίας φυτών διεθνώς και αποσκοπούν τελικά στη δημιουργία αποτελεσματικών υπερσυσσωρευτών.



## 2. Επαγόμενη φυτοσυσσώρευση

Περιλαμβάνει την επιλογή και καλλιέργεια φυτών που χαρακτηρίζονται από ταχείς ρυθμούς αύξησης και μεγάλη παραγωγή βιομάζας (McGrath et al., 2001; Salt et al., 1998; Van Nevel et al., 2007). Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των φυτών προστίθενται στο έδαφος χηλικές ενώσεις όπως EDTA, CDTA, DTPA, και EGTA, προκειμένου να αυξήσουν τη διαθεσιμότητα των μετάλλων στα φυτά (Finzgar and Lestan, 2008; Lai and Chen, 2004; Lai and Chen, 2005). Εκτός από την προσθήκη χηλικών αντιδραστηρίων για την αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας των μετάλλων στο έδαφος, έχουν αναφερθεί και άλλες μέθοδοι, όπως μείωση του εδαφικού pH, χρήση κατάλληλων λιπασμάτων και μεταβολή της ιονικής σύστασης του εδάφους (Cunningham, 1996). Όταν τα φυτά φτάσουν στο επιθυμητό στάδιο ανάπτυξης, χρησιμοποιούνται χημικοί παράγοντες επαγωγής για να κατευθύνουν τη συσσώρευση των μετάλλων στο υπέργειο μέρος των φυτών. Τα φυτά τότε συλλέγονται και απομακρύνονται.



**Εικόνα 1.6** Σχηματική αναπαράσταση της επαγόμενης φυτοεξυγίανσης (A) και της φυσικής φυτοεξυγίανσης (B). Η συνεχής γραμμή αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση βαρέων μετάλλων στο υπέργειο τμήμα του φυτού. Η διακεκομμένη γραμμή αντιπροσωπεύει τη βιομάζα του υπέργειου τμήματος (Salt et al., 1998).

Η χημικά υποβοηθούμενη φυτοσυσσώρευση έχει αποδειχτεί ότι μπορεί να είναι επιτυχής όταν το προς απομάκρυνση μέταλλο έχει ιδιαίτερα μικρή βιοδιαθεσιμότητα και άρα δεν είναι φυτοτοξικό, επιτρέποντας την καλλιέργεια φυτών υψηλής παραγωγικότητας, τα οποία όπως προαναφέρθηκε δεν είναι ιδιαίτερα ανθεκτικά σε υψηλές συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων, πριν την προσθήκη των χηλικών αντιδραστηρίων.

### **1.3.1.3 Συγκομιδή, επεξεργασία και διάθεση των φυτών**

Μετά την ολοκλήρωση του σταδίου πρόσληψης των μετάλλων, τα φυτά πρέπει να κοπούν και πιθανόν το ριζικό τους σύστημα να ξεριζωθεί. Η επεξεργασία που θα ακολουθηθεί στη συνέχεια εξαρτάται από την τοξικότητα των βιοσυσσωρευμένων ουσιών. Η πιο συνηθισμένη επεξεργασία είναι η θερμική αποδόμηση ή η ελεγχόμενη αποτέφρωση, ιδιαίτερα στην περίπτωση των βαρέων μετάλλων. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η συγκέντρωση των βαρέων μετάλλων στην παραγόμενη στάχτη, η οποία καταλαμβάνει πολύ μικρό όγκο. Στην περίπτωση της συσσώρευσης ραδιενεργών στοιχείων από τα φυτά είναι απαραίτητη η αποθήκευσή τους μαζί με άλλα ραδιενεργά απόβλητα σε ειδικά σχεδιασμένους χώρους υγειονομικής ταφής.

### **1.3.1.4 Πρόσληψη μετάλλων από τα φυτά**

Τα φυτά για να αναπτυχθούν χρειάζονται τα απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία (μακρο-μικροστοιχεία) και διαθέτουν ειδικούς μηχανισμούς πρόσληψης, μεταφοράς και αποθήκευσης καθενός από τα στοιχεία αυτά. Τα βαρέα μέταλλα Zn, Mn, Ni και Cu είναι απαραίτητα μικροστοιχεία για τα φυτά. Τα κοινά φυτά προσλαμβάνουν και συσσωρεύουν μικρές ποσότητες αυτών των στοιχείων (<10 ppm), που δεν ξεπερνούν τις μεταβολικές τους ανάγκες. Αντίθετα, ένας υπερσυσσωρευτής μπορεί να προσλάβει πολύ μεγαλύτερες ποσότητες (χιλιάδες ppm).

Είναι γεγονός ότι η διαδικασία αυτή είναι ενεργοβόρα και επομένως εύλογα τίθεται το ερώτημα πιο είναι το εξελικτικό πλεονέκτημα των φυτών αυτών. Πρόσφατες μελέτες έχουν συσχετίσει την συσσώρευση βαρέων μετάλλων στα φύλλα των φυτών με την ανθεκτικότητά τους σε εχθρούς και ασθένειες (Freeman et al., 2006; MacNair, 2003; Martens and Boyd, 1994). Επίσης, οι υπερσυσσωρευτές προσλαμβάνουν όχι μόνο τα απαραίτητα μικροστοιχεία, αλλά και μη απαραίτητα μέταλλα, όπως το Cd. Στις περιπτώσεις αυτές, φαίνεται ότι τα μη απαραίτητα μέταλλα προσλαμβάνονται και μεταφέρονται στο φυτό με τους μηχανισμούς πρόσληψης και μεταφοράς άλλων απαραίτητων μικροστοιχείων (Lasat, 2002). Η πρόσληψη των μετάλλων από τα φυτά εξαρτάται από τους παρακάτω παράγοντες:

### **1. Τύπος και συγκέντρωση του μετάλλου**

Είναι γνωστό ότι τα φυτά δεν είναι δυνατόν να προσλάβουν από το εδάφους μέσω των ριζών στοιχεία τα οποία δεν είναι σε αφομοιώσιμη μορφή. Κατ' αντιστοιχία η ποσότητα των μετάλλων που μπορούν να απορροφηθούν συνδέεται με την συγκέντρωσή τους στη διαλυτή φάση ή την δυνατότητα να μεταβούν σε αυτήν. Η μεταφορά αυτή από τη στερεή στην διαλυτή φάση είναι άμεσα εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση και το είδος τους. Γενικά, όσο λιγότερο ηλεκτραρνητικό είναι ένα μέταλλο τόσο λιγότερο σταθερές γίνονται οι χηλικές ενώσεις που σχηματίζει και συνεπώς είναι ευκολότερο το πέρασμα στην υδατική φάση (Tyler et al., 1989).

### **2. Τύπος και είδος του φυτού**

Έχει αναφερθεί νωρίτερα η καθοριστική σημασία του είδους του φυτού στην απορρόφηση μετάλλων (υπερσυσσωρευτής ή όχι). Εξίσου σημαντικά όμως επιδρά η ηλικία του φυτού, το στάδιο ανάπτυξης καθώς και το τμήμα του φυτού. Έρευνες έχουν δείξει μειωμένες συγκεντρώσεις μετάλλων στα νεαρά φύλλα σε σχέση με τα μεγαλύτερης ηλικίας είτε λόγω συνεχούς μεταφοράς στα

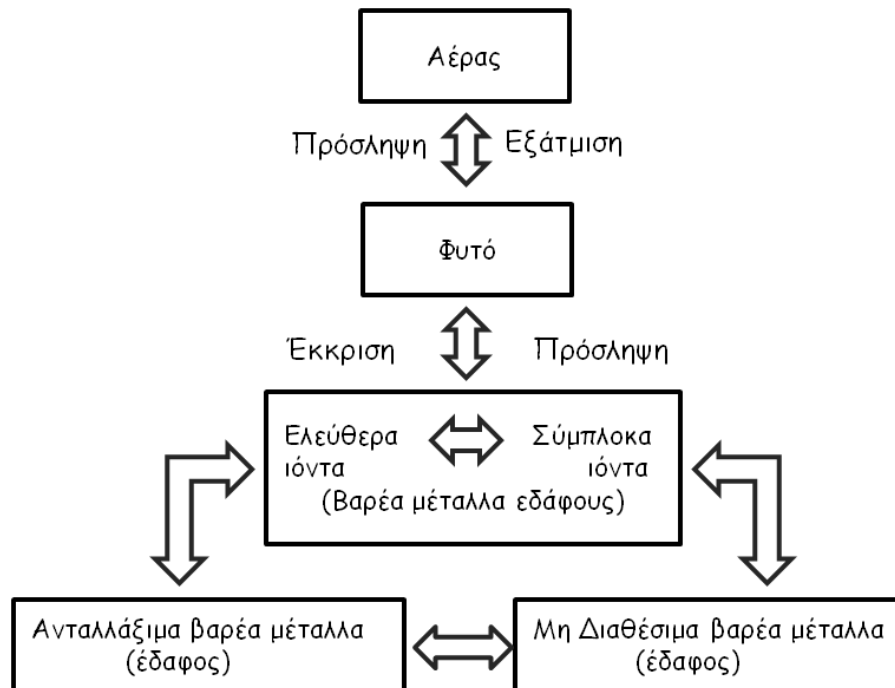
δεύτερα είτε για λόγους ενεργητικής μεταφοράς και αποθήκευσης των μετάλλων στα γηρασμένα φύλλα ώστε να προστατευτούν οι ευαίσθητοι νεαροί ιστοί (Weis and Weis, 2004).

### **3. Ριζόσφαιρα: Αλληλεπίδραση εδάφους-φυτού-μικροοργανισμών**

Καθοριστικό παράγοντα στην πρόσληψη μετάλλων διαδραματίζει η ανάπτυξη της ρίζας και η επιρροή που ασκεί στο έδαφος. Οι ρίζες των φυτών, ενισχύουν την μικροβιακή δραστηριότητα στην ριζόσφαιρα και σε ανταπόδοση οι μικροοργανισμοί, στα πλαίσια της συμβίωσης, ενισχύουν την πρόσληψη των μετάλλων από τα φυτά (Lasat, 2002). Έχει αποδειχτεί επίσης ότι οι ρίζες εκκρίνουν μια σειρά οργανικών ενώσεων οι οποίες ενισχύουν την διαλυτοποίηση των βαρέων μετάλλων στο έδαφος (Bolan et al., 2003; Nascimento and Xing, 2006). Επιπλέον, οι ρίζες των φυτών, μέσω έκκρισης  $H^+$ , οξινίζουν την περιοχή της ριζόσφαιρας αυξάνοντας την βιοδιαθεσιμότητα των μετάλλων (Bolan et al., 2003; Nascimento and Xing, 2006).

### **4. Τύπος εδάφους και τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του**

Η βιοδιαθεσιμότητα των μετάλλων είναι αντιστρόφως ανάλογη με την περιεκτικότητα των εδαφών σε άργιλο και οργανική ουσία. Εδάφη στα οποία η άργιλος, ή η οργανική ουσία είναι αυξημένη χαρακτηρίζονται από υψηλή ικανότητα ανταλλαγής κατιόντων και κατά συνέπεια αυξάνεται η προσρόφηση και η ακινητοποίηση των μετάλλων. Το pH του εδάφους αποτελεί ίσως τον σημαντικότερο παράγοντα που ελέγχει την πρόσληψη των μετάλλων από τα φυτά. Αύξηση του pH οδηγεί σε μεγαλύτερη συγκράτηση και μικρότερη διαλυτότητα των μεταλλικών ιόντων λόγω υψηλότερης προσρόφησης των μετάλλων στα σωματίδια του εδάφους και συμπλοκοποίησης με την οργανική ουσία.



**Εικόνα 1.7** Μετακίνηση βαρέων μετάλλων από το έδαφος στα φυτά ή στον αέρα και το αντίστροφο (ισορροπία) μέσω φυσικοχημικών και βιολογικών αλληλεπιδράσεων (Wei et al., 2008).

## 5. Περιβαλλοντικές συνθήκες

Οι επικρατούσες συνθήκες (μικροκλίμα, εποχιακές διακυμάνσεις, παροδικά μετεωρολογικά γεγονότα) στο πεδίο εφαρμογής της φυτοαποκατάστασης έχουν σημαντικό ρόλο στην πρόσληψη μετάλλων από τα φυτά. Πρώτα από όλα καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό τα επίπεδα αλλά και το ρυθμό ανάπτυξης των φυτών και άρα επιδρούν αφενός στην ποσότητα του εξαγόμενου από τα φυτά ρύπου, και αφετέρου στον απαιτούμενο χρόνο ώστε να επιτευχτεί το σχεδιαζόμενο αποτέλεσμα. Καταλυτικής σημασίας είναι όμως και η επιρροή που ασκούν στου υπόλοιπους παράγοντες που αναφέρθηκαν παραπάνω. Για παράδειγμα οι φυσικοχημικές ιδιότητες του εδάφους είναι εξαρτώμενες σε μεγάλο βαθμό από τις κλιματολογικές συνθήκες της περιοχής (βροχή, ξηρασία) και άρα είναι σε θέση να επηρεάσουν την διαθεσιμότητα των μετάλλων, όπως εξάλλου και τη μικροβιακή δραστηριότητα του εδάφους.

### 1.3.1.5 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της φυτοαποκατάστασης

#### Πλεονεκτήματα

- Πρόκειται για μια περιβαλλοντικά φιλική τεχνολογία.
- Εφαρμόζεται επί τόπου και δεν είναι αναγκαία εκσκαφή ή άντληση για περαιτέρω επεξεργασία.
- Δεν διαταράσσεται καθόλου το φυσικό τοπίο της ρυπασμένης περιοχής.
- Το έδαφος που προκύπτει έχει αυξημένη γονιμότητα σε σύγκριση με άλλες τεχνικές και μπορεί να ξαναχρησιμοποιηθεί άμεσα για καλλιέργεια μετά από φυτοεξυγίανση.
- Παράγονται λιγότερα δευτερογενή απόβλητα από ότι σε άλλες τεχνολογίες και επιπλέον υπάρχει η δυνατότητα ανάκτησης των μετάλλων από τη ρυπασμένη φυτική βιομάζα.
- Είναι ιδιαίτερα οικονομική τεχνολογία, ιδιαίτερα για μεγάλους όγκους εδάφους ή νερού που είναι ρυπασμένοι με μικρές ποσότητες τοξικών ρυπαντών (60-80% φθηνότερη σε σχέση με τις συμβατικές φυσικοχημικές μεθόδους).
- Αποτρέπει την εξάπλωση των υφιστάμενων ρύπων, προστατεύοντας παράλληλα το έδαφος από τη διάβρωση.

#### Μειονεκτήματα

- Στα μειονεκτήματα συγκαταλέγονται οι ιδιαίτερα αργοί ρυθμοί φυτοεξυγίανσης, οι οποίοι συμπεριλαμβάνουν μερικές συνεχόμενες περιόδους καλλιέργειας των φυτών μέχρι να αποκατασταθεί πλήρως το περιβάλλον από τους ρυπαντές.
- Η φυτοεξυγίανση είναι αποτελεσματική μόνο όταν το βάθος της ρύπανσης δεν ξεπερνά το 1 m στο έδαφος και τα 3 m στον υδροφόρο ορίζοντα.

- Είναι μη εφαρμόσιμη σε περιοχές με πολύ υψηλά επίπεδα ρύπανσης λόγω φυτοτοξικότητας.
- Υπάρχει κίνδυνος εισαγωγής των μετάλλων στην τροφική αλυσίδα μέσω των φυτοφάγων ζώων και εντόμων.
- Είναι δυνατή η μεταφορά ρύπου από το ένα μέσο στο άλλο (από το έδαφος στον αέρα μέσω φυτοεξάτμισης, ή από το έδαφος στον υπόγειο υδροφόρο).
- Οι κλιματικές ή οι υδρολογικές συνθήκες στην ρυπασμένη περιοχή μπορεί να μην επιτρέψουν την καλλιέργεια και ανάπτυξη των κατάλληλων για την φυτοεξυγίανση φυτών.

#### **1.4 Παράγοντες καταπόνησης και αντιμετώπισή τους από τα φυτά**

Κατά τη διάρκεια του βιολογικού τους κύκλου τα φυτά εκτίθενται πολλές φορές σε περιβαλλοντικές καταπονήσεις που επηρεάζουν δυσμενώς τόσο την ανάπτυξη όσο και την ίδια τους την επιβίωση. Οι παράγοντες αυτοί μπορεί να διακριθούν σε δύο κύριες κατηγορίες, τις βιοτικές καταπονήσεις που προκαλούνται από άλλους οργανισμούς και τις αβιοτικές ή φυσικοχημικές καταπονήσεις που προκαλούνται από ένα πλεόνασμα ή μία έλλειψη στο φυσικό ή χημικό περιβάλλον (Πίνακας 1.5).

Τα φυτά αντιδρούν στην ύπαρξη τέτοιων παραγόντων μέσω κατάλληλων μηχανισμών οι οποίοι τους επιτρέπουν να επιβιώσουν. Οι μηχανισμοί αυτοί περιλαμβάνουν τροποποιήσεις μορφολογικών ή φυσιολογικών χαρακτηριστικών, αναγκαίες για την αντιμετώπιση της καταπόνησης. Σε γενικές γραμμές διακρίνονται τρεις στρατηγικές:

**Πίνακας 1.5** Παράγοντες καταπόνησης φυτών (Καραμπουρνιώτης, 2003).

<b>Φυσικοί</b>
Έλλειψη ή περίσσεια φωτός , UV ακτινοβολία, Θερμοκρασία (υπερθέρμανση, ψύχος, παγετός), Υδατικό περιβάλλον (ξηρή ατμόσφαιρα, ξηρό έδαφος, κατάκλιση), Μηχανικές βλάβες (άνεμος, σχηματισμός πάγου, τραυματισμοί)
<b>Χημικοί</b>
Εδαφικό περιβάλλον (έλλειψη ή περίσσεια θρεπτικών συστατικών, μη ισορροπημένη σύσταση, αλατότητα, βαρέα μέταλλα, ακραίο pH ), Αέριο περιβάλλον (έλλειψη οξυγόνου, CO <sub>2</sub> )
<b>Βιοτικοί</b>
Φυτά (επικάλυψη, αλληλοπάθεια, παρασιτισμός) Παθογόνα (Ιοί, Μύκητες, Βακτήρια), Ζώα
<b>Ανθρωπογενείς</b>
Ρύπανση, υποβάθμιση εδαφών, πυρκαγιές, φυτοφάρμακα, ιοντίζουσες ακτινοβολίες, ηλεκτρομαγνητικά πεδία

**Διαφυγή:** Τα φυτά που έχουν επιλέξει τη στρατηγική αυτή ολοκληρώνουν τον βιολογικό τους κύκλο μέσα στην ευνοϊκή περίοδο κατά την οποία ο παράγοντας της καταπόνησης απουσιάζει.

**Ανθεκτικότητα:** Τα φυτά εξακολουθούν να διατηρούν υψηλή μεταβολική δραστηριότητα συγκρίσιμη με εκείνη η οποία παρατηρείται στις βέλτιστες συνθήκες, ακόμα και παρουσία του παράγοντα καταπόνησης.



**Αποφυγή:** Τα φυτά διαθέτουν μηχανισμούς οι οποίοι αμβλύνουν τις επιπτώσεις της καταπόνησης.

Παρακάτω αναπτύσσονται εκτενέστερα οι καταπονήσεις από τα βαρέα μέταλλα που ενδιαφέρουν στα πλαίσια της παρούσας μελέτης και ιδιαίτερα αναπτύσσεται η οξειδωτική καταπόνηση λόγω του ότι η παρουσία των βαρέων μετάλλων ευνοεί το σχηματισμό ενεργών μορφών οξυγόνου στα φυτά.

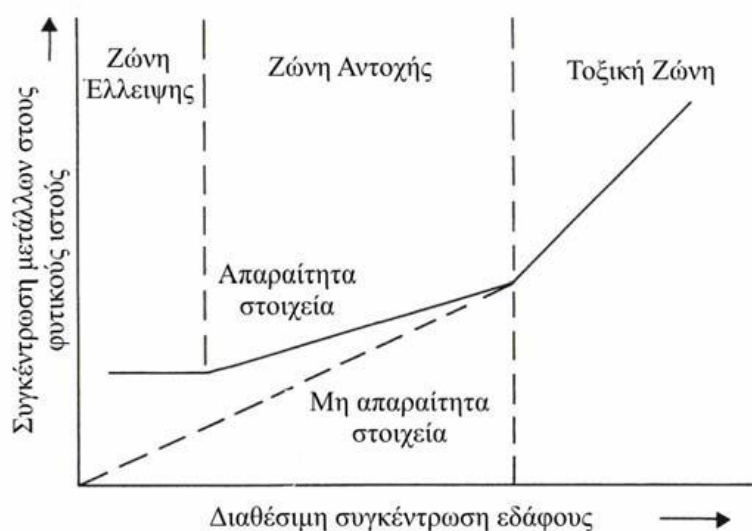
#### 1.4.1 Καταπόνηση βαρέων μετάλλων στα φυτά

Η παρουσία των βαρέων μετάλλων σε τοξικά επίπεδα στο έδαφος, προκαλεί μια σειρά από επιπτώσεις στις μεταβολικές λειτουργίες των φυτών (Καραμπουρνιώτης, 2003) όπως :

- Δυσλειτουργίες στην είσοδο και έξοδο ιόντων όπως  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{NO}_3^-$  και  $\text{K}^+$  μέσω των μεμβρανών.
- Παρεμπόδιση της λειτουργίας των αλυσίδων μεταφοράς ηλεκτρονίων τόσο στην αναπνοή, όσο και στη φωτοσύνθεση.
- Μη αντιστρεπτή παρεμπόδιση της δραστηριότητας ενζύμων κλειδιών.
- Σημαντική πτώση της παραγωγής ενέργειας.

Η επίδραση των ρυπαντών στα φυτά μπορεί να καθοριστεί σε διάφορα επίπεδα, από αλλαγές σε βιοχημικές και φυσιολογικές διαδικασίες (Darrall 1989, Koricheva et al. 1997), αλλαγές σε επίπεδο οργάνων ή και ολόκληρου του φυτού, όπως είναι η αναστολή της ανάπτυξης, η μείωση της απόδοσης ή η βλάβη των φύλλων (Koricheva et al. 1997). Αν και οι βλάβες και οι σημαντικές αλλαγές στην αύξηση και την απόδοση συνήθως γίνονται ορατές μόνο μετά από έκθεση σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις ρύπων, η επίδραση της ρύπανσης στις βιοχημικές

διαδικασίες μπορεί να εντοπιστεί αρκετά νωρίτερα (Koricheva et al. 1997). Επομένως, οι μεταβολικές αλλαγές στα φυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως κατάλληλοι δείκτες ρύπανσης, απουσία άλλων ορατών συμπτωμάτων (Monni et al., 2001).



**Εικόνα 1.8** Καμπύλη πρόσληψης μεταλλικών στοιχείων, απαραίτητων και μη (Baker and Walker, 1989).

Καθώς η πλειονότητα των μετάλλων κατακρατείται στους ριζικούς ιστούς είναι προφανές ότι η παρουσία τους θα ασκεί τη μεγαλύτερη επίδραση στις ρίζες, προκαλώντας μείωση του λόγου μάζας ρίζας/βλαστού και μείωση του μήκους της ρίζας (Oncel et al., 2000). Το γεγονός αυτό μπορεί να συμβάλλει στη μείωση της ικανότητας πρόσληψης νερού από το ριζικό σύστημα και στην έμμεση εγκατάσταση υδατικού ελλείμματος στα φυτά, συνοδευόμενου από υπερπαραγωγή οσμωλυτών (Seregin and Ivanov, 2001). Με αυτόν τον τρόπο, η ύπαρξη μετάλλων σε υψηλές συγκεντρώσεις παρεμβαίνει στις υδατικές σχέσεις των φυτών (Pandey and Sharma, 2003) οδηγώντας σε μείωση του σχετικού υδατικού περιεχομένου και του υδατικού δυναμικού του φυτού, ενώ είναι δυνατό να επηρεάσει ακόμα και τη ροή του νερού μέσα στο φυτό, το άνοιγμα της στοματικής συσκευής καθώς και το ρυθμό διαπνοής (Lidon et al., 2004; Oncel et al., 2000). Η παρουσία βαρέων μετάλλων

προκαλεί, επίσης, τη συσσώρευση προλίνης, η οποία, έχοντας προστατευτικό ρόλο, αυξάνει την ανθεκτικότητα των φυτών στις καταπονήσεις μέσω οσμωρύθμισης, προστασίας ενζύμων και σταθεροποίησης της πρωτεϊνοσύνθεσης (Bassi and Sharma, 1993; Oncel et al., 2000).

Σε επίπεδο φυσιολογίας, τα μέταλλα δύνανται να παρέμβουν στη λειτουργία σημαντικών ενζύμων του κύκλου του Calvin, όπως είναι η RuBP καρβοξυλάση, στη μεταφορά ηλεκτρονίων στο φωτοσύστημα II, στο κέντρο αντίδρασης του παραπάνω φωτοσυστήματος, στην φωτόλυση του νερού στις φωτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης, εξαιτίας της αντικατάστασης του  $Mn^{2+}$  από άλλα μεταλλικά ιόντα ή της μειωμένης πρόσληψής του από το έδαφος, λόγω ανταγωνισμού με άλλα μέταλλα, καθώς και στη δράση ορισμένων πρωτεϊνών, λόγω της αντικατάστασης των απαραίτητων μεταλλικών ιόντων με άλλα τοξικά ή μη μεταλλικά στοιχεία και της αλληλεπίδρασής τους με τις ομάδες SH των. Επιπροσθέτως, συχνά παρατηρείται αντικατάσταση του  $Mg^{2+}$  στο μόριο της χλωροφύλλης από ορισμένα τοξικά μεταλλικά ιόντα όπως είναι τα Cu, Zn, Cd ή Hg. Οι παραγόμενες υπό αυτές τις συνθήκες μεταλλοχλωροφύλλες είναι ακατάλληλες για φωτοσύνθεση (Küpper et al., 1996). Η μειωμένη αποτελεσματικότητά τους, που επεκτείνεται και στην *in vitro* φωτονική απόδοση του φθορισμού τους σε σχέση με την Mg-chl, έχει ως αποτέλεσμα την αδυναμία μεταφοράς της ενέργειας από τις χρωστικές της αντένας στα κέντρα αντίδρασης των θυλακοειδών (Küpper et al., 1998).

Εκτός από τις έμμεσες επιδράσεις σε φωτοχημικό επίπεδο, η ακεραιότητα των μεμβρανών, η πλαστοκυανίνη και ο μεταβολισμός των θρεπτικών στοιχείων επηρεάζονται, επίσης, από την περίσσεια συγκέντρωση μεταλλικών ιόντων στο φυτικό κύτταρο, συμβάλλοντας στην αναστολή της φωτοσύνθεσης (Cheng, 2003; Küpper et al., 1998). Τέλος, η τοξική επίδραση των βαρέων μετάλλων φαίνεται ότι σχετίζεται με την παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου και την επαγόμενη ανισορροπία της κυτταρικής οξειδοαναγωγικής

κατάστασης. Στην παραγωγή ριζών οξυγόνου τα φυτά αντιδρούν με την παραγωγή αντιοξειδωτικών ενζύμων, συχνά χρησιμοποιούμενων ως δεικτών αυτού του είδους καταπόνησης (Baycu et al., 2006; Küpper et al., 1998).

#### **1.4.1.1 Μηχανισμοί ανθεκτικότητας των φυτών στα βαρέα μέταλλα**

Στους μηχανισμούς ανθεκτικότητας των φυτών στα βαρέα μέταλλα, που έχουν προσδιοριστεί μέχρι σήμερα, περιλαμβάνονται:

- Η αποφυγή ρυπασμένων σημείων
- Η κινητοποίηση μετάλλων στη ριζόσφαιρα
- Ο έλεγχος στο επίπεδο της πλασματικής μεμβράνης
- Η διαδικασία της χήλωσης
- Η διαμερισματοποίηση στο χυμοτόπιο
- Η έκλυση στο περιβάλλον.

#### **Αποφυγή ρυπασμένων σημείων**

Είναι γνωστό, τόσο από παρατηρήσεις όσο και από πειράματα με ρίζες, ότι ακόμα και ανθεκτικά φυτά αποφεύγουν να αναπτύσσουν ρίζες στα πλέον επιβαρημένα σημεία των εδαφών, ωστόσο οι μηχανισμοί εντοπισμού των μετάλλων παραμένουν άγνωστοι (Tyler et al., 1989; Κωνσταντινίδου, 2003).

#### **Κινητοποίηση μετάλλων στη ριζόσφαιρα**

Τα φυτά διαθέτουν κατάλληλους αμυντικούς μηχανισμούς μέσω των οποίων αποκλείουν τα βαρέα μέταλλα στο εξωτερικό περιβάλλον. Τα τοξικά μεταλλικά ιόντα είτε δεσμεύονται και εξουδετερώνονται στο περιβάλλον της ριζόσφαιρας από χηλικές ενώσεις (κυρίως οργανικά οξέα, όπως μηλικό) οι οποίες εκκρίνονται από τα κύτταρα της ρίζας. Σε ορισμένα είδη υπάρχει η δυνατότητα καθήλωσης των μεταλλικών ιόντων στα τοιχώματα των

κυττάρων της ρίζας και κυρίως στις καρβοξυλικές ομάδες των συστατικών της πηκτίνης (Καραμπουρνιώτης, 2003).

### Έλεγχος στην πλασματική μεμβράνη

Η πλασματική μεμβράνη των φυτών μπορεί να θεωρηθεί ως η πρώτη ενεργή δομή η οποία αποτελεί στόχο της τοξικότητας των βαρέων μετάλλων. Η λειτουργία της πλασματικής μεμβράνης ίσως επηρεάζεται ταχύτατα από τα βαρέα μέταλλα, όπως δείχνει η αυξημένη διαρροή από τα κύτταρα παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων βαρέων μετάλλων, ιδιαιτέρως του Cu. Για παράδειγμα, αποδείχθηκε ότι ο Cu, όχι όμως και ο Zn, προκάλεσε αύξηση της εκροής του K από αποκομμένες ρίζες του *Agrostis capillaris* (Symeonidis et al., 1985). Ομοίως, η ζημιά στην κυτταρική μεμβράνη, από εκροή ιόντων, ήταν η άμεση αιτία τοξικότητας Cu σε ρίζες των *Silene vulgaris* και *Mimulus guttatus* (Vos et al., 1991). Παρόμοια ζημιά μπορεί να προκληθεί με διάφορους μηχανισμούς στη μεμβράνη, όπως με την οξείδωση των σουλφυδρυλομάδων των κυστεϊνών των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, την παρεμπόδιση ενζύμων κλειδιών της μεμβράνης (ATPάσες, αντλίες ιόντων) ή την αλλαγή στη σύσταση και ρευστότητα των λιπιδίων της, που επιδρούν άμεσα στην διαπερατότητά της (Hall, 2002). Έτσι, η ανθεκτικότητα μπορεί να περιλαμβάνει την προστασία της ακεραιότητας της πλασματικής μεμβράνης από την επίδραση των βαρέων μετάλλων. Ένας άλλος παράγοντας που μπορεί να περιληφθεί στη διατήρηση της ακεραιότητας της πλασματικής μεμβράνης παρουσία βαρέων μετάλλων, είναι η αυξημένη επιδιόρθωση των μεμβρανών μετά την ζημιά με την εμπλοκή των πρωτεϊνών που επάγονται από θερμική καταπόνηση ή των μεταλλοθειονίνων (Hall, 2002).

Εκτός της ανθεκτικότητας, η μεμβράνη ίσως παίζει σημαντικό ρόλο στην ομοιόσταση των μετάλλων, είτε εμποδίζοντας ή μειώνοντας την είσοδό τους στο κύτταρο ή μέσω μηχανισμών εκροής. Αρκετά από αυτά τα κατιόντα είναι

απαραίτητα και έτσι ο πλήρης αποκλεισμός τους δεν είναι δυνατός. Η επιλεκτική εκροή θεωρείται περισσότερο ρεαλιστική. Στα βακτήρια, τα περισσότερα συστήματα ανθεκτικότητας βασίζονται στην εξαρτώμενη από ενέργεια εκροή των τοξικών ιόντων. Φαίνεται πως η μεταβολική ποιότητά του να έχει περισσότερο εξειδικευμένους μηχανισμούς πρόσληψης, και έτσι να περιορίζει την είσοδο των τοξικών ιόντων, είναι μεγαλύτερη από το να έχει συστήματα εκροής (Κωνσταντινίδου, 2003).

### **Χήλωση**

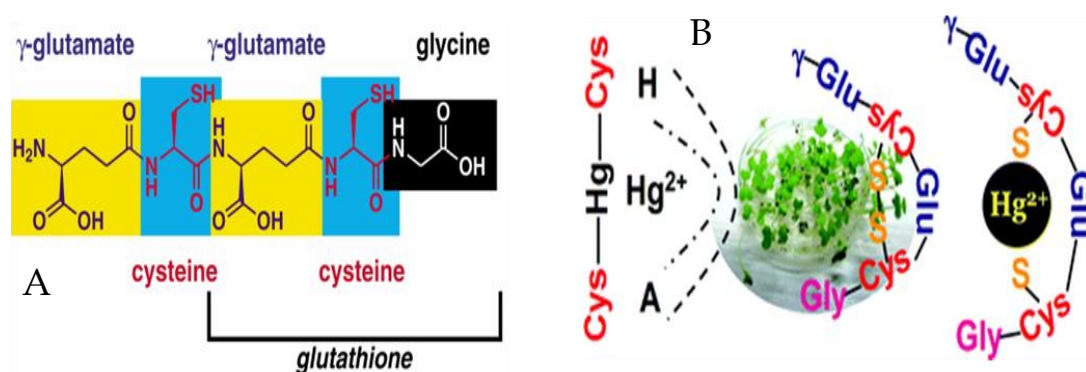
Χήλωση είναι η αντίδραση δημιουργίας συμπλόκου ενός μετάλλου με οργανική ουσία (χηλική ένωση). Η χημική ενεργότητα και η περιορισμένη διαλυτότητα των περισσότερων μεταλλικών ιόντων, απαιτεί σταθερή χήλωση από τη στιγμή που θα βρεθούν μέσα στο κύτταρο. Οι χηλικές ενώσεις δεσμεύουν τα μεταλλικά ιόντα ενδοκυτταρικά, συνεισφέροντας στην αποτοξίνωση του κυττάρου και ρυθμίζοντας τη συγκέντρωση των μετάλλων στο κυτταρόπλασμα. Στα φυτά οι κυριότερες κατηγορίες των χηλικών ενώσεων των μετάλλων περιλαμβάνουν οργανικά οξέα και αμινοξέα καθώς και πρωτεϊνικής φύσης μόρια, τις φυτοχηλατίνες και τις μεταλλοθειονίνες (Clemens, 2001).

#### **❖ Φυτοχηλατίνες (Phytochelatins)**

Οι φυτοχηλατίνες είναι μια ομάδα πρωτεϊνών οι οποίες επάγονται στα φυτά όταν αυτά έλθουν αντιμέτωπα με καταπόνηση βαρέων μετάλλων. Δρουν δεσμεύοντας τα ελεύθερα μεταλλικά ιόντα στο μόριό τους και τα μεταφέρουν στο χυμοτόπιο όπου δεν είναι πλέον τοξικά και απ' όπου τελικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν από το φυτό για την ανάπτυξή του, στην περίπτωση που το μέταλλο αυτό είναι απαραίτητο στοιχείο, όπως ο Cu και ο Zn. Για να γίνει κατανοητός ο ρόλος των φυτοχηλατινών στην αποτοξίνωση των βαρέων

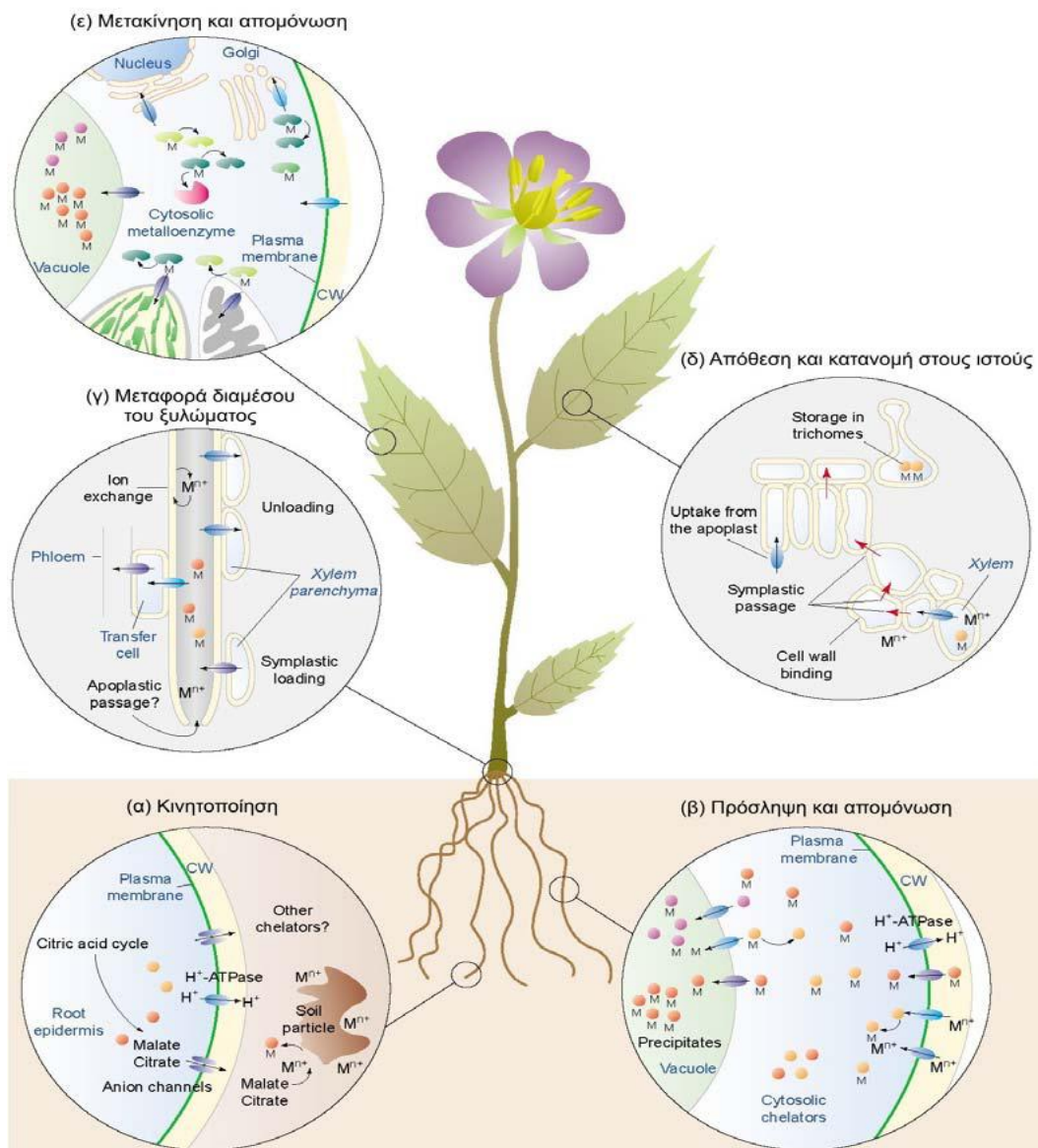
μετάλλων, πρέπει να κατανοηθούν τα χαρακτηριστικά τους όπως η δομή, η βιοσύνθεση, η λειτουργία, καθώς και η δομή του συμπλόκου φυτοχηλατίνης-μετάλλου.

Στη δομή των φυτοχηλατινών συμμετέχουν τρία αμινοξέα: γλουταμικό, κυστεΐνη και γλυκίνη. Η γενική δομή τους είναι η εξής  $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$  ( $n=2-11$ ). Τα μεταλλικά ιόντα δεσμεύονται από τις σουλφυδρικές ομάδες των κυστεΐνών. Οι φυτοχηλατίνες έχουν αναγνωρισθεί σε αρκετές ομάδες φυτών αλλά και άλλων φωτοσυνθετικών οργανισμών. Η βιοσύνθεση των φυτοχηλατινών καταλύεται από το ένζυμο συνθάση της φυτοχηλατίνης που χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα γλουταθειόνη (GSH). Τα βαρέα μέταλλα όχι μόνο επάγουν την έκφραση της συνθάσης της φυτοχηλατίνης αλλά και ενεργοποιούν το ένζυμο (Clemens, 2001).



**Εικόνα 1.9** Χημική δομή μιας φυτοχηλατίνης (A) Συμπλοκοποίηση και χουμικοποίηση υδραργύρου στο *Brassica chinensis* υπό καταπόνηση  $\text{Hg}$  (B) (Liqin et al., 2009).

Αρκετές φυσιολογικές, βιοχημικές και γενετικές μελέτες με την χρήση άθικτων φυτών και κυρίως *in vitro* κυτταροκαλλιέργειων, έχουν επιβεβαιώσει ότι η GSH είναι το υπόστρωμα για τη βιοσύνθεση της φυτοχηλατίνης. Επιπλέον, μελέτες με καλλιέργεια κυττάρων έχουν αποδείξει ότι η επαγωγή της φυτοχηλατίνης παρουσία καδμίου συμπίπτει με μία παροδική μείωση των επιπέδων της GSH (Cobbett and Goldsbrough, 2002).



**Εικόνα 1.10.** Μοριακοί μηχανισμοί που σχετίζονται με τη συσσώρευση μετάλλων στα φυτά. α) Τα μεταλλικά ιόντα κινητοποιούνται από την έκκριση ενώσεων και την αύξηση της οξύτητας της ριζόσφαιρας. β) Πρόσληψη ενυδατωμένων μεταλλικών ιόντων ή μεταλλο-χηλικών συμπλόκων με τη βοήθεια συστημάτων πρόσληψης που δραστηριοποιούνται στην πλασματική μεμβράνη. Μέσα στο κύτταρο τα μέταλλα δεσμεύονται και η περίσσειά τους απομονώνεται στο χυμοτόπιο. γ) Μεταφορά μετάλλων από τις ρίζες στον βλαστό μέσω του ξυλώματος, κυρίως μέσω του συμπλάστη. δ) Στα φύλλα τα μέταλλα δεσμεύονται από τα κύτταρα. Μετακίνηση μεταξύ των κυττάρων μέσω των πλασμοδεσμάτων. Πιθανή αποθήκευση στα τριχίδια ε) Η ενδοκυτταρική κατανομή των απαραίτητων μετάλλων επιτυγχάνεται με τη βοήθεια ειδικών ενώσεων και μεταφορέων (Clemens et al., 2002).



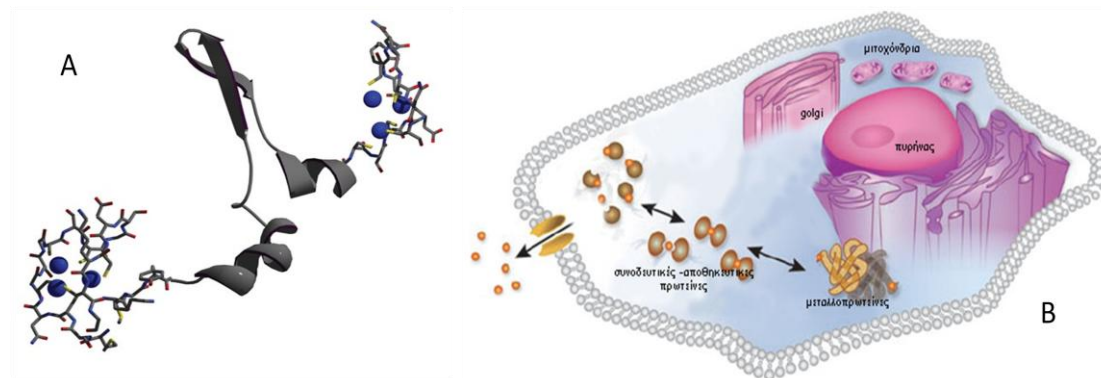
Εκτός της αποτοξίνωσης, οι φυτοχηλατίνες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο και στην ομοιόσταση των βαρέων μετάλλων στα φυτά, ρυθμίζοντας τη διαθεσιμότητά τους. Τα μεταλλικά ιόντα, όπως ο Cu και ο Zn, πρέπει να εισέλθουν στα κύτταρα για να γίνουν μέρος των καταλυτικών πρωτεϊνών. Οι φυτοχηλατίνες επομένως έχουν διπλό ρόλο. Αφενός, πρέπει να συγκρατήσουν τα μεταλλικά ιόντα, να τα αδρανοποιήσουν και να τα αποθηκεύσουν στο χυμοτόπιο. Αφετέρου, πρέπει να μεταφέρουν τα απαραίτητα μέταλλα, όπου αυτό απαιτείται, για σύνθεση νέων ενζύμων (Zenk, 1996).

#### ❖ Μεταλλοθειονίνες (Metallothioneins)

Οι μεταλλοθειονίνες είναι πρωτεΐνες παρόμοιες με τις φυτοχηλατίνες σε αρκετά σημεία, συμπεριλαμβανομένων του υψηλού αριθμού υπολειμμάτων κυστεΐνης στο μόριό τους και του γεγονότος ότι και οι δύο είναι απαραίτητες για την αποτοξίνωση των βαρέων μετάλλων. Όλες οι μεταλλοθειονίνες έχουν τρία κοινά χαρακτηριστικά: α) χαμηλό μοριακό βάρος (6-7 kDa), β) ένα μεγάλο ποσοστό υπολειμμάτων κυστεΐνης και γ) υψηλή περιεκτικότητα σε μέταλλα που βρίσκονται δεσμευμένα από τις σουλφυδρυλικές ομάδες των κυστεϊνών. Οι μεταλλοθειονίνες κατατάσσονται σε δύο κλάσεις, η πρώτη περιλαμβάνει τις μεταλλοθειονίνες των θηλαστικών και η δεύτερη όλες τις άλλες μεταλλοθειονίνες (González-Duarte, 2003).

Οι μεταλλοθειονίνες της δεύτερης κλάσης, που έχουν ταυτοποιηθεί στα φυτά, μπορούν να ταξινομηθούν περαιτέρω βάσει της ακολουθίας των αμινοξέων. Οι Robinson *et al* (1993) αναγνώρισαν για πρώτη φορά δυο τύπους φυτικών μεταλλοθειονίνων με βάση τη θέση των υπολειμμάτων κυστεΐνης σε προβλέπιμες πρωτεΐνες. Από τότε, ο αριθμός των χαρακτηρισμένων φυτικών μεταλλοθειονίνων έχει αυξηθεί δραματικά πολλές από τις οποίες δεν συμπίπτουν με τους δύο παραπάνω τύπους. Οι ίδιοι πρότειναν ένα σύστημα το οποίο διαχωρίζει όλες τις γνωστές φυτικές μεταλλοθειονίνες σε τέσσερις

κατηγορίες, ανάλογα με την αλληλουχία των αμινοξέων (Cobbett and Goldsbrough, 2002; González-Duarte, 2003).



**Εικόνα 1.11** (Α) Τριδιάστατη δομή του συμπλόκου μεταλλοθειονίνης-μετάλλων. (Β) Συμπλοκοποίηση μετάλλων στις μεταλλοθειονίνες και απελευθέρωσή τους στον εξωκυττάριο χώρο.

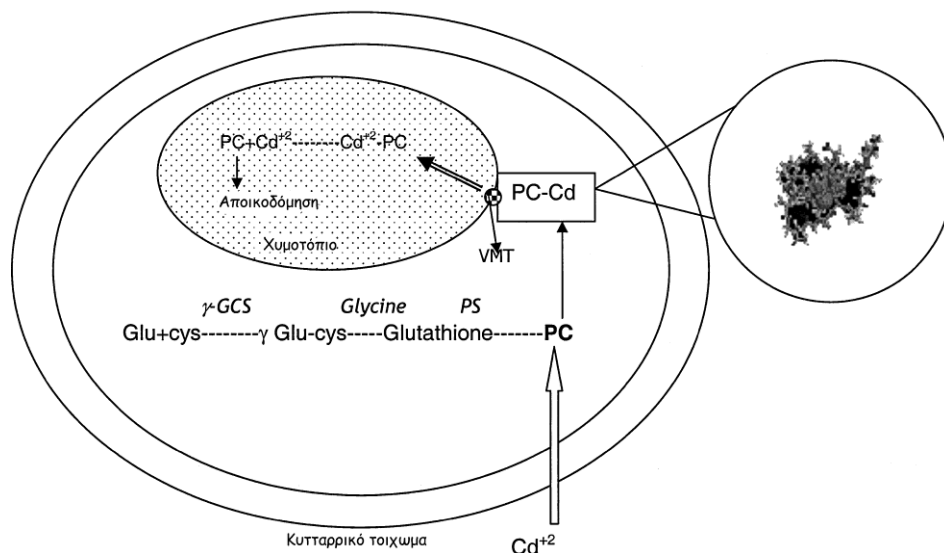
### Διαμερισματοποίηση στο χυμοτόπιο

Η εκροή των μεταλλικών ιόντων στην πλασματική μεμβράνη ή η μεταφορά τους στο χυμοτόπιο είναι δύο τρόποι για να μειώσουν τα ενδογενή επίπεδα των τοξικών μετάλλων στο κυτταρόπλασμα και έτσι είναι σημαντικοί μηχανισμοί για την ανθεκτικότητα στα βαρέα μέταλλα. Ένα καλά τεκμηριωμένο παράδειγμα είναι η συσσώρευση Cd και φυτοχηλατινών στο χυμοτόπιο (Εικόνα 1.12) που πραγματοποιείται από ειδικές πρωτεΐνες μεταφορείς με την κατανάλωση ενέργειας (Hall, 2002).

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι το χυμοτόπιο είναι η θέση για τη συσσώρευση και άλλων βαρέων μετάλλων, συμπεριλαμβανομένου του Zn και του Ni. Για παράδειγμα, μετά από επέμβαση με Zn σε μεριστωματικά κύτταρα της ρίζας του *Festuca rubra* παρατηρήθηκε αύξηση του σχηματισμού χυμοτοπιών ενώ μελέτες πρόσληψης με τη χρήση ραδιενεργού Zn σε φύλλα κριθαριού έδειξαν ότι η ταχεία διαμερισματοποίηση του Zn ήταν ένας σημαντικός μηχανισμός για την αντιμετώπιση των υψηλών εξωγενών

επιπέδων του μετάλλου. Άλλες μελέτες σε φύλλα κριθαριού έδειξαν συσσώρευση Cd, Zn και Mo κυρίως μέσα στο χυμοτόπιο, ενώ το Ni βρέθηκε κυρίως στο κυτταρόπλασμα.

Η ανάλυση των συστημάτων μεταφοράς του τονοπλάστη υποδεικνύει την ύπαρξη μηχανισμού ανθεκτικότητας σε επίπεδο χυμοτοπίου. Απομονωμένα κυστίδια τονοπλάστη από ρίζες δύο οικότυπων, ενός ανθεκτικού και ενός ευαίσθητου στον Zn φυτού *Silene vulgaris*, έδειξαν ότι σε υψηλές συγκεντρώσεις Zn, η μεταφορά του μετάλλου ήταν 2,5 φορές υψηλότερη μέσα στα κυστίδια του ανθεκτικού οικότυπου σε σύγκριση με αυτά του ευαίσθητου, αποδεικνύοντας ότι ο τονοπλάστης διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη φυσικά επιλεγμένη ανθεκτικότητα στον Zn (Chardonens et al., 1999). Μέσω διασταυρώσεων φυτών, δείχθηκε ότι η αυξημένη πρόσληψη στα τονοπλαστικά συστήματα συσχετίζεται γενετικά με την ανθεκτικότητα στον Zn. Πρόσφατα, απομονώθηκε ένα γονίδιο από την *Arabidopsis thaliana* που έχει στενή σχέση με το καλά χαρακτηρισμένο γονίδιο του μεταφορέα Zn των θηλαστικών (Hall, 2002).



**Εικόνα 1.12** Το κάδμιο ενεργοποιεί την συνθάση της φυτοχηλατίνης η οποία μετατρέπει τη γλουταθειόνη σε φυτοχηλατίνη. Στη συνέχεια τα μόρια των φυτοχηλατινών δεσμεύουν τα ιόντα καδμίου με τη μορφή συμπλόκων και τα οδηγούν στο χυμοτόπιο (Suresh and Ravishankar, 2004).

## Έκλυση στο περιβάλλον

Πολλά φυτά έχουν αναπτύξει μηχανισμούς έκκρισης των τοξικών μετάλλων μέσω των φύλλων. Σημαντικές ποσότητες βαρέων μετάλλων απελευθερώνονται από το φύλλωμα των δέντρων και μέσω της βροχής απομακρύνονται από το φυτό. Επίσης, μερικά βρυόφυτα τα οποία είναι ικανά να αναπτύσσονται σε μεταλλοφόρα υποστρώματα δεν μπορούν να αποφύγουν την πρόσληψη ποσοτήτων διαλυτών αλάτων βαρέων μετάλλων (π.χ. Cu), όμως έχει βρεθεί ότι το μεγαλύτερο τμήμα αυτών των ποσοτήτων εκκρίνονται από τα φυτά και μπορούν να σχηματίσουν ίζημα στην επιφάνεια των φύλλων κατά τη διάρκεια των περιόδων ξηρασίας (Tyler et al., 1989).

Μελέτες σε *Nicotiana tabacum*, εκτεθειμένα σε τοξικά επίπεδα καδμίου, απεκάλυψαν ότι τα φυτά παράγουν κρυστάλλους ασβεστίου οι οποίοι εξωθούνται ενεργά μέσω των τριχωμάτων στα φύλλα. Μάλιστα, υπολογίστηκε ότι περίπου 16 μg καδμίου δύνανται να εκκριθούν ανά γραμμαρίο φρέσκου φυτικού ιστού (Choi et al., 2001), ενώ με τον ίδιο μηχανισμό αποτοξίνωσης εκκρίνονται και ποσότητες ψευδαργύρου (Sarret et al., 2006). Τέλος, προσπάθειες με γενετική τροποποίηση φυτών έχουν δημιουργήσει ένα είδος λεύκης ανθεκτικής, στον υδράργυρο, με ικανότητα να εκλύει από τα φύλλα δεκαπλάσιες ποσότητες Hg σε σχέση με τα φυτά άγριου τύπου (Hussein et al., 2007; Κωνσταντινίδου, 2003).

### 1.4.2 Οξειδωτική καταπόνηση

Οι αερόβιοι οργανισμοί χρησιμοποιούν το οξυγόνο ως τελικό αποδεκτικό ηλεκτρονίων, στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων της αναπνευστικής λειτουργίας. Αυτό γίνεται προκειμένου να επιτύχουν υψηλότερη ενεργειακή απόδοση από τον καταβολισμό σακχάρων ή άλλων μορίων. Σε φυσιολογικές

συνθήκες ανάπτυξης των φυτών, αποκλίσεις στην πορεία της μεταφοράς των ηλεκτρονίων σε διάφορα μεταβολικά μονοπάτια προκαλούν την αναγωγή του μοριακού οξυγόνου και την παραγωγή ελεύθερων ενεργών ριζών (Ye et al., 2000). Αυτές οι ρίζες ονομάζονται ενεργές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) και περιλαμβάνουν το σουπεροξειδίο ( $O_2^{\bullet-}$ ), το υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ), την υδροξυλική ρίζα ( $OH^{\bullet}$ ) και το ενεργό οξυγόνο  $^1O_2$ . Τα επίπεδα των ROS χρησιμοποιούνται από τους οργανισμούς ως ενδεικτικά του μεγέθους της ενδοκυτταρικής καταπόνησης, και λειτουργούν ως σήματα για την ενεργοποίηση μονοπατιών απόκρισης στην καταπόνηση και στην άμυνα (Choi et al., 2002). Σε χαμηλές συγκεντρώσεις συμβάλλουν στον εγκλιματισμό του φυτού σε αντίξοες συνθήκες και επάγουν την έκφραση γονιδίων άμυνας και αποκρίσεων προσαρμογής (Desikan et al., 2001; Van Breusegem et al., 2001).

Μεταξύ των αερόβιων οργανισμών, η υψηλότερη κυτταρική συγκέντρωση αέριου οξυγόνου παρατηρείται στα φυτά ( η συγκέντρωση οξυγόνου στον γειτνιάζοντα χώρο των μιτοχονδρίων των θηλαστικών είναι περίπου  $0,1 \mu M$  ενώ των φυτών  $>250 \mu M$ ). Επομένως, η παράγωγή ROS, λόγω και της συχνότερης έκθεσης των φυτών σε ακραίες συνθήκες, είναι συχνή και έντονη. Όταν η παράγωγή των ROS υπερβαίνει την απόσβεσή τους από τον αντιοξειδωτικό μηχανισμό που το φυτό ενεργοποιεί, προκαλείται οξειδωτική καταπόνηση (Apel and Hirt, 2004; Κωνσταντινίδου, 2003). Οι κυριότερες βλάβες από τις ROS σε βιολογικούς οργανισμούς είναι: (α) η υπεροξειδωση των λιπιδίων (β) οι οξειδωτικές βλάβες στη δομή των πρωτεϊνών και (γ) οι οξειδωτικές βλάβες στο DNA (Boscolo et al., 2003). Παρακάτω αναλύεται λεπτομερώς ο μηχανισμός δράσης των ROS ως προς την υπεροξειδωση λιπιδίων.

Κατά κανόνα οι αερόβιοι οργανισμοί περιέχουν σημαντικές ποσότητες πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs) που είναι βασικά συστατικά των μεμβρανών και προσφέρουν στη δομή τους υψηλή ευκαμψία και

ρευσιτότητα. Το γεγονός αυτό προσδίδει στα κύτταρα εξαιρετικές ιδιότητες που απαιτούνται για το συνεχές εναλλασσόμενο περιβάλλον των μεμβρανών. Αλλά τα PUFAs είναι συγχρόνως πολύ ευάλωτα σε οξειδωτικές δράσεις ελευθέρων ριζών, ιδιαίτερα σε υπεροξειδώσεις. Παρά την παρουσία στα PUFAs αντιοξειδωτικών λιποδιαλυτών ουσιών και ενζύμων που δρουν αμυντικά σε περιπτώσεις υπεροξειδώσεων, οι ROS προκαλούν την εξάντλησή τους. Οι κυτταρικές μεμβράνες των αερόβιων οργανισμών αποτελούνται κατά 40-50% από λιπίδια, ενώ το υπόλοιπο ποσοστό είναι πρωτεΐνες. Το λιπιδικό τμήμα αποτελείται από λιπίδια που σχηματίζουν δύο στρώματα διμοριακών φύλλων, που καλείται διπλοστοιβάδα. Το εσωτερικό τμήμα της διπλοστοιβάδας είναι υδρόφοβο και το εξωτερικό υδρόφιλο. Η λιπιδική διπλοστοιβάδα αποτελεί φραγμό στη ροή πολικών μορίων, ενώ οι πρωτεΐνες λειτουργούν ως αντλίες, πύλες, υποδοχείς, μετατροπείς ενέργειας ή ως ένζυμα. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των λιπιδικών στοιβάδων είναι αρκετά σύνθετες αλλά σχηματίζονται με τρόπο ώστε να μη διαταράσσεται η κυτταρική λειτουργία. Τα PUFAs μεταβολίζονται φυσιολογικά στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων σε μόρια του ακετυλο-συνενζύμου Α μέσω ενζυμικής διεργασίας, η οποία είναι μεγάλης σημασίας για τους αερόβιους οργανισμούς και καλείται β-οξείδωση (Halliwell and Gutteridge, 2007; Wagner et al., 1994).

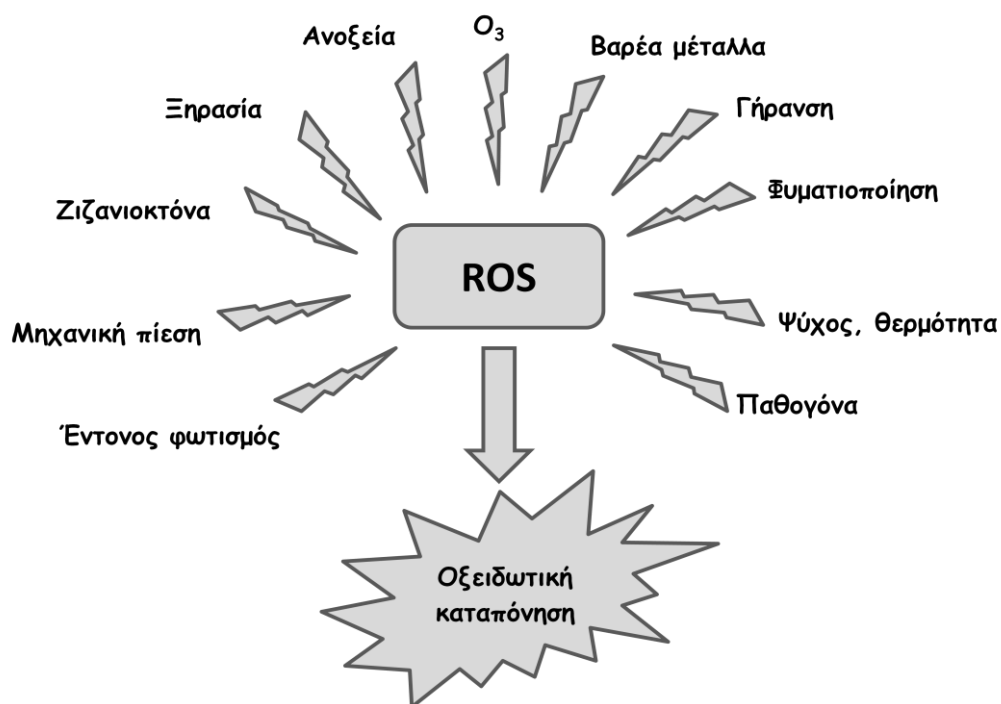
Συγχρόνως, στις κυτταρικές μεμβράνες συμβαίνουν και μη ρυθμιζόμενες διεργασίες ελευθέρων ριζών που οξειδώνουν και διασπούν τα PUFAs. Τα στάδια της διεργασίας αυτής ξεκινούν αρχικά με τη δράση ριζών υδροξυλίου ( $\text{OH}\cdot$ ) που προσβάλλουν τη μεθυλενική ομάδα των PUFAs, που βρίσκεται μεταξύ δύο διπλών δεσμών. Οι διπλοί δεσμοί δρουν ως δότες ηλεκτρονίων, ελκύουν την  $\text{OH}$  στο σημείο της αλυσίδας με το  $-\text{CH}_2-$ , αποσπώντας ένα υδρογόνο και σχηματίζοντας νέα ελεύθερη ρίζα,  $-\text{CH}_2\cdot$ . Στο σημείο αυτό της αλυσίδας γίνεται μετάθεση ενός διπλού δεσμού σχηματίζοντας ένα συζυγιακό διένιο με χαμηλότερη εντροπία από την αρχική ελεύθερη ρίζα των PUFAs. Στο επόμενο στάδιο ένα μόριο οξυγόνου αντιδρά και σχηματίζει τη

ρίζα του λιπιδικού υπεροξειδίου ( $\text{LOO}\cdot$ ). Οι αντιδράσεις της λιπιδικής υπεροξειδωσης συνεχίζονται με την αλυσιδωτή αντίδραση των δραστικών λιπιδικών υπεροξειδίων που αποσπών ένα υδρογόνο από νέα λιπίδια με το σχηματισμό υδροϋπεροξειδίων ( $\text{LOOH}$ ) (Papapostolou and Georgiou, 2010; Wagner et al., 1994).

Έτσι, ο κύκλος των λιπιδικών υπεροξειδώσεων συνεχίζεται αφού η ρίζα L, η οποία μπορεί να αντιδράσει με  $\text{O}_2$  και να δώσει εκ νέου υπεροξυλική ρίζα, που με τη σειρά της μπορεί να αποσπάσει ένα υδρογόνο από άλλο μόριο PUFAs, συνεχίζοντας έτσι την αλυσίδα αντιδράσεων που ξεκίνησε από την προσβολή ενός αρχικού μορίου PUFAs από  $\text{OH}\cdot$ . Στο τελικό στάδιο, τα PUFAs διασπώνται σε διάφορα προϊόντα, όπως καρβονυλικές ενώσεις, αλκενάλες και αλκάνια (αιθάνιο, πεντάνιο, κλπ.). Η σημαντικότερη πηγή σχηματισμού υπεροξειδίων PUFAs ( $\text{LOO}\cdot$ ) είναι η ενδογενής αναπνευστική αλυσίδα των εσωτερικών μεμβρανών των μιτοχονδρίων. Η φύση έχει σχεδιάσει τις μιτοχονδριακές εσωτερικές μεμβράνες με τρόπο ώστε να αντιστέκονται στην υπεροξειδωση και στις βλάβες από ROS (Halliwell and Gutteridge, 2007). Η ενζυμική αυτή διεργασία καταλύεται από ένα σύστημα κυτοχρωμικών ενζύμων με κεντρικό άτομο σιδήρου. Το άτομο αυτό του σιδήρου και άλλων μεταλλικών ιόντων σε άλλα ένζυμα (ψευδάργυρος, χαλκός, μαγγάνιο) είναι βασική βιολογική μονάδα για τις μεταφορές ηλεκτρονίων σε αρκετά υψηλές ταχύτητες, ώστε να διατηρήσουν το φυσιολογικό μεταβολισμό στους αερόβιους οργανισμούς (Mithöfer et al., 2004).

Επειδή τα μεταλλικά ιόντα είναι επίσης υπεύθυνα για αντιδράσεις παραγωγής ελευθέρων ριζών και υπεροξειδώσεις, αναπόφευκτα οι αερόβιοι οργανισμοί υφίστανται μερικώς τις τοξικές επιδράσεις του είδους αυτού του μεταβολισμού στο κυτταρικό περιβάλλον τους. Οι πιο σημαντικοί μηχανισμοί παραγωγής ROS που υπεισέρχονται στην υπεροξειδωση λιπιδίων, αφορούν αρχικά το σχηματισμό σουπεροξειδίου ( $\text{O}_2^-$ ) από το

οξυγόνο του αερόβιου μεταβολισμού κατά τη μεταφορά ηλεκτρονίων, ακολουθούν η μετατροπή του σε υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) και τελικά η διάσπασή του από μεταλλικά ιόντα (Mn) με αντίστοιχη παραγωγή της ρίζας υδροξυλίου ( $OH\cdot$ ). Η ρίζα  $OH$  προκαλεί στη συνέχεια τη λιπιδική υπεροξείδωση όπως περιγράφηκε παραπάνω και χρησιμοποιείται συχνά ως δείκτης οξειδωτικού στρες για την αξιολόγηση διαφόρων παθολογικών καταστάσεων (Wagner et al., 1994).



**Εικόνα 1.13** Περιβαλλοντικοί παράγοντες που ενεργοποιούν και αυξάνουν την παράγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου στο φυτικό κύτταρο (Κωνσταντινίδου, 2003).

Ποικίλοι παράγοντες καταπόνησης όπως η ξηρασία, η ακτινοβολία UV, οι ακραίες θερμοκρασίες, η εδαφική αλατότητα, οι ατμοσφαιρικοί ρύποι και τα βαρέα μέταλλα, είναι γνωστό ότι προκαλούν οξειδωτική καταπόνηση στα φυτά είτε άμεσα είτε έμμεσα προκαλώντας το σχηματισμό αυξημένων επιπέδων ενεργών μορφών οξυγόνου. Οξειδοαναγωγικά μέταλλα όπως ο χαλκός και ο σίδηρος παράγουν ROS (Mithöfer et al., 2004) μέσω των αντιδράσεων τύπου Fenton ( $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH\cdot + OH^- + Fe^{3+}$ ), ενώ μη



οξειδοαναγωγικά μέταλλα όπως ο μόλυβδος, το κάδμιο και ο ψευδάργυρος δεν φαίνεται να συμμετέχουν σε ανάλογες αντιδράσεις αλλά προκαλούν οξειδωτική καταπόνηση στα φυτά μέσω έμμεσης παραγωγής ενεργών μορφών οξυγόνου (León et al., 2002; Milone et al., 2003; Smeets et al., 2005)

#### 1.4.2.1 Αντιοξειδωτικός μηχανισμός στα φυτά

Οι αερόβιοι βιολογικοί οργανισμοί δημιουργήθηκαν σε περιβάλλον οξυγόνου και κατά τη διάρκεια της εξελικτικής πορείας ανέπτυξαν κατάλληλους μηχανισμούς αντιοξειδωτικής προστασίας, οι οποίοι περιλαμβάνουν κυρίως ενζυμικές και μη ενζυμικές μικρού μοριακού βάρους αντιοξειδωτικές ενώσεις. Πολλοί βιολογικοί μηχανισμοί που χρησιμοποιούν το οξυγόνο για μεταβολικές και ενεργειακές διεργασίες προσπαθούν να περιορίσουν τη διαρροή  $O_2$  ή ROS. Στη βιολογία, αντιοξειδωτής θεωρείται κάθε ουσία που βρίσκεται σε χαμηλή συγκέντρωση σε σχέση με κάποιο ευαίσθητο στην οξείδωση μόριο, και καθυστερεί ή αποτρέπει σημαντικά την οξείδωση αυτού του μορίου.

Στα φυτά τα κυριότερα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά μόρια είναι η ανηγμένη μορφή της γλουταθειόνης (glutathione, GSH), το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C), η προλίνη, η λιπόφιλη α-τοκοφερόλη (βιταμίνη E), οι πολυαμίνες, τα φλαβονοειδή, τα καροτενοειδή, τα αλκαλοειδή και άλλα προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού.

Ο ενζυμικός αντιοξειδωτικός μηχανισμός περιλαμβάνει τη σουπεροξειδική δισμουτάση (superoxide dismutase, SOD), τη καταλάση (catalase, CAT), τις υπεροξειδάσες (peroxidases, POD), τη μονοαφυδροασκορβική (monodehydroascorbate reductase, MDHAR), την αφυδροασκορβική (dehydroascorbate reductase, DHAR) αναγωγή και την αναγωγή της γλουταθειόνης (glutathione reductase, GR), ενώ μία άλλη ενζυμική ομάδα επαγόμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου είναι αυτή της γλουταθειόνης-

S-τρανοφεράσης (glutathione-S-transferase, GST), που συμμετέχει σε επιδιόρθωση των βλαβών (Cheng, 2003). Οι SOD, CAT και POD δρουν ως προστατευτικά ένζυμα καθώς εξουδετερώνουν άμεσα τις ROS, ενώ οι αναγωγάσες υποβοηθούν στη διατήρηση της αντιοξειδωτικής δεξαμενής στην ανηγμένη της μορφή. Οι SOD αποσβένουν τις  $O_2^{\cdot-}$  μετατρέποντάς τις σε  $O_2$  και  $H_2O_2$  που αποτελεί λιγότερη καταστρεπτική μορφή οξυγόνου, μειώνοντας έτσι τον κίνδυνο σχηματικού ριζών υδροξυλίου, ενώ στην συνέχεια το  $H_2O_2$  μετατρέπεται σε  $H_2O$  και  $O_2$  από τις POD και CAT. Η καταλάση επιπλέον συνδέεται άμεσα με την απόκριση σε καταπονήσεις όπως αυτή από κάδμιο (Schützendübel et al., 2002), κοβάλτιο, και αλατότητα. Για την απόσβεση των ριζών υδροξυλίου,  $OH^{\cdot}$  και του  $^1O_2$  δεν αναφέρονται ειδικά ένζυμα αλλά είναι πιθανή η έμμεση εμπλοκή των SOD στην απομάκρυνσή τους μέσω χημικών αντιδράσεων (Baccouch et al., 1998; Schützendübel et al., 2001; Van Breusegem et al., 2001)

Οι υπεροξειδάσες, όπως η ασκορβική υπεροξειδάση (ascorbate peroxidase, APX) και η υπεροξειδάση της γουαϊακόλλης (guaiacol peroxidase, GPX), είναι οξειδοαναγωγάσες που βρίσκονται στο κυτόπλασμα, στο χυμοτόπιο, στο κυτταρικό τοίχωμα αλλά και στον εξωκυτταρικό χώρο. Τα ένζυμα αυτά χρησιμοποιούν διάφορα υποστρώματα ως δότες ηλεκτρονίων, εκμεταλλεύονται το  $H_2O_2$  για την οξείδωση διαφόρων ανόργανων και οργανικών υποστρωμάτων, ανάγοντας το σε  $H_2O$  (Apel and Hirt, 2004; Mittler, 2002). Η ασκορβική υπεροξειδάση ανάγει το  $H_2O_2$  σε νερό χρησιμοποιώντας ασκορβικό ως δότη ηλεκτρονίων στο πρώτο βήμα του κύκλου της γλουταθειόνης-ασκορβικού (ή κύκλος Halliwell-Asada). Οι υπεροξειδάσες που χρησιμοποιούν γουαϊακόλλη ως δότη ηλεκτρονίων (υπεροξειδάσες της γουαϊακόλλης) είναι γλυκοπρωτεΐνες που συμμετέχουν στην λιγνιτοποίηση, στην βιοσύνθεση αιθυλενίου, στην άμυνα, στην επιδιόρθωση των βλαβών, κ.λπ. (Azevedo Neto et al., 2005).

Τα αντιοξειδωτικά ένζυμα λοιπόν, αποτελούν στοιχεία κλειδιά του αμυντικού αντιοξειδωτικού μηχανισμού και σε αρκετές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί παρουσιάζονται σημαντικές αλλαγές της δραστηριότητάς τους στα φυτά υπό συνθήκες καταπόνησης. Οι υπεροξειδάσες στην διεθνή βιβλιογραφία έχουν γίνει ευρέως δεκτές ως «ένζυμα καταπόνησης» (“stress enzymes”). Η μέτρηση της δραστηριότητάς τους έχει προταθεί ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης για την αξιολόγηση της έντασης της καταπόνησης που προέρχεται από τα βαρέα μέταλλα (Ruttens et al., 2006; Verma and Dubey, 2003).

## **1.5 Βοτανικά χαρακτηριστικά των φυτών *Nicotiana tabacum* και *Nicotiana glauca***

### **1.5.1 *Nicotiana tabacum* (Νικοτιανή - κοινός καπνός)**

Το φυτό *Nicotiana tabacum* ανήκει στην ομάδα των δικοτυλήδων και στην οικογένεια Solanaceae. Είναι ετήσιο φυτό, θάμνος ή μικρό δέντρο από 0,90 έως 2 m ύψος ανάλογα με την ποικιλία. Είναι ιθαγενές της τροπικής και υποτροπικής Αμερικής αλλά τώρα καλλιεργείται εμπορικά παγκοσμίως. Άλλες ποικιλίες καλλιεργούνται ως διακοσμητικά φυτά ή αναπτύσσονται ως αγριόχορτα. Τα φύλλα του είναι ελλειπτικά ή λογχοειδή, η ταξιανθία είναι βότρυς στο τέλος της διακλάδωσης, έχουν κυλινδρικό κάλυκα και είναι πρασινωπά ή κοκκινωπά στο πάνω μέρος. Ο καρπός είναι κάψα και έχει διάφορα σχήματα με σφαιρικούς σπόρους. Είναι ευαίσθητο στη υψηλή θερμοκρασία, στον αέρα και στην αυξημένη υγρασία. Θερμοκρασία μεταξύ 20 και 30 °C είναι η καλύτερη για την επαρκή ανάπτυξη των φυτών, ατμοσφαιρική υγρασία 80-85% και έδαφος χωρίς υψηλά επίπεδα αζώτου είναι επίσης απαραίτητα.

Κάθε μέρος του φυτού, εκτός από τους σπόρους, περιέχει νικοτίνη, αλλά η συγκέντρωση σχετίζεται με τις διαφορετικές λειτουργίες ανάλογα με το είδος, τον τύπο του εδάφους, την καλλιέργεια και τις συνθήκες του καιρού. Η νικοτίνη δρα ως προστατευτική ουσία του φυτού έναντι των εντόμων. Η συγκέντρωση της νικοτίνης αυξάνεται με την ηλικία του φυτού. Τα φύλλα του καπνού περιέχουν 2-8 % νικοτίνη. Η κατανομή της νικοτίνης σε ένα ώριμο φυτό άγριας ποικιλίας είναι: 64 % στα φύλλα, 18 % στο βλαστό, 13 % στις ρίζες και 5 % στα άνθη. Ο καπνός χρησιμοποιείται ως τοπικό αναλγητικό ενώ τα στεγνά φύλλα του χρησιμοποιούνται για μάσημα ή για κάπνισμα.



**Εικόνα 1.14** *Nicotiana tabacum*: Όριμο φυτό (αριστερά), λεπτομέρεια φύλλων (κέντρο) και ανθούς (δεξιά).

### 1.5.2 *Nicotiana glauca* (Νικοτιάνα η γλαυκή)

Το φυτό *Nicotiana glauca* ανήκει στην ομάδα των δικοτυλήδων και στην οικογένεια Solanaceae. Είναι αυτοφυές στη Βολιβία, στην Αργεντινή, στη Ν. Αμερική και στις Μεσογειακές χώρες. Είναι βραχύβιος θάμνος ή ένα μικρό δέντρο που συχνά φτάνει τα 7,5 μέτρα στη φύση. Είναι χαρακτηριστική η εμφάνισή του εξαιτίας των μεγάλων ωοειδών γαλαζοπράσινων φύλλων του. Αυτά είναι παχιά, ελαστικά, απλά, λεία, γλαυκά με διακεκριμένες νευρώσεις

και εναλλάσσονται γύρω από τον κορμό με μακρύ μίσχο, έχουν μήκος περίπου 17,5 cm και πλάτος 15 cm. Η ταξιανθία είναι φόβος με κίτρινα σωληνοειδή άνθη, με πέντε πέταλα, τα οποία αναπτύσσονται στο τέλος της διακλάδωσης χωρίς φύλλα.

Το φυτό είναι καλλιεργούμενο και απαιτεί πλήρη ηλιοφάνεια ή ημισκιά και βαθύ πλούσιο έδαφος. Στην σκιά δεν μεγαλώνει. Επίσης μπορεί να αναπτυχθεί σε αμμώδη ή αργιλώδη, υγρά και καλά στραγγιζόμενα, όξινα, ουδέτερα ή αλκαλικά εδάφη. Γενικά δεν έχει ιδιαίτερες απαιτήσεις. Είναι φυτό ταχείας ανάπτυξης. Το κλάδεμα προάγει την ανάπτυξη περισσότερων βραχιόνων και περισσότερων ανθέων. Πολλαπλασιάζεται με τμήματα φυτού ή με σπόρους. Το *Nicotiana glauca* χρησιμοποιείται κυρίως ως καλλωπιστικό σε δημόσιους χώρους, πάρκα και δρόμους. Το φυτό έχει φαρμακευτική χρήση, αλλά επειδή όλα τα μέρη του είναι εξαιρετικά δηλητηριώδη, πρέπει να χρησιμοποιείται με ιδιαίτερη προσοχή. Το *Nicotiana glauca* ενώ ανήκει στο ίδιο γένος με το *Nicotiana tabacum* δεν περιέχει νικοτίνη.



**Εικόνα 1.15** *Nicotiana glauca*: Ωριμο φυτό (αριστερά), λεπτομέρεια φύλλων (κέντρο) και ανθούς (δεξιά)

## 1.6 Σκοπός της εργασίας

Η ρύπανση του περιβάλλοντος με βαρέα μέταλλα αποτελεί ένα διαεπίλυτο και συνεχώς αυξανόμενο πρόβλημα σε παγκόσμια κλίμακα. Η έκθεση των οργανισμών στα βαρέα μέταλλα συμπεριλαμβανόμενου και του ανθρώπου, μπορεί να προκαλέσει σοβαρές έως καταστρεπτικές βλάβες. Η ανάγκη απορρύπανσης των επιβαρυσμένων πεδίων οδηγεί στην αναζήτηση τεχνολογιών που να είναι όσο το δυνατόν αποδοτικές, οικονομικά συμφέρουσες και φιλικές προς στο περιβάλλον. Η φυτοαποκατάσταση, όπως έχει αναφερθεί, πλεονεκτεί έναντι άλλων παρόμοιων τεχνολογιών σε αρκετά σημεία, εντούτοις παρουσιάζει και αδυναμίες, οι οποίες είναι δυνατόν να ελαχιστοποιηθούν με την απόκτηση επαρκών γνώσεων στο θέμα της αλληλεπίδρασης μετάλλων και φυτών.

Ο κύριος σκοπός της εργασίας αυτής είναι η συσχέτιση των εξωγενών συγκεντρώσεων των βαρέων μετάλλων καδμίου (Cd), ψευδαργύρου (Zn) και νικελίου (Ni) με την συσσώρευση των μετάλλων στους φυτικούς ιστούς των ειδών *N. tabacum* και *N. glauca* καθώς και τις μεταβολές μορφολογικών και φυσιολογικών παραμέτρων (φωτοσύνθεση, διαπνοή, στοματική αγωγιμότητα, οξειδωτική καταπόνηση κ.ά.) των φυτών. Η σύγκριση της ανταπόκρισης του *N. glauca* με το καλλιεργούμενο *N. tabacum* αναμένεται να δώσει χρήσιμες πληροφορίες για τους μηχανισμούς που χρησιμοποιούν τα δύο φυτικά είδη για να ανταπεξέρχονται στην καταπόνηση βαρέων μετάλλων.

### 1.6.1 Επιλογή φυτών

Όπως έχει αναφερθεί σημαντικά μειονεκτήματα της χρήσης των υπερσυσσωρευτών, είναι η μικρή παραγωγή βιομάζας, οι αργοί ρυθμοί αύξησής τους, και το ρηχό ριζικό τους σύστημα το οποίο περιορίζει

περαιτέρω την εφαρμογή της τεχνικής για αποκατάσταση εδαφών με βαθύτερη ρύπανση. Αντίθετα τα φυτά εκείνα που παρουσιάζουν γρήγορη ανάπτυξη και υψηλή βιομάζα, αφενός στερούνται της ικανότητας να συσσωρεύουν αξιόλογες ποσότητες μετάλλων και αφετέρου είναι αρκετά ευαίσθητα σε αυξημένες συγκεντρώσεις των ρύπων αυτών στο έδαφος. Για το λόγο αυτό, ιδιαίτερη έμφαση στην έρευνα έχει δοθεί στην αξιολόγηση της συσσώρευσης των μετάλλων σε φυτά με υψηλή παραγωγή βιομάζας που μπορούν να καλλιεργηθούν εύκολα με χρήση των καθιερωμένων αγρονομικών πρακτικών. Παράλληλα έχει ενταθεί η μελέτη των βιοχημικών, φυσιολογικών και μοριακών μηχανισμών αντοχής, με απώτερο σκοπό τη μεταφορά γονιδίων αντοχής σε φυτά που παράγουν μεγαλύτερη βιομάζα. Σήμερα, ο εντοπισμός νέων φυσικών πληθυσμών καθώς και η περαιτέρω κατανόηση των φυσιολογικών και μοριακών μηχανισμών πρόσληψης και συσσώρευσης αποτελούν θέματα ερευνητικής αιχμής διεθνώς.

Στη προσπάθεια αναζήτησης φυτικών ειδών με κατάλληλα χαρακτηριστικά για φυτοαποκατάσταση και της περαιτέρω κατανόησης της απόκρισης των φυτών στα βαρέα μέταλλα γίνεται συγκριτική μελέτη της επίδρασης στα χαρακτηριστικά δύο συγγενικών μεταξύ τους ειδών, του άγριου (*Nicotiana glauca*) και του καλλιεργούμενου (*Nicotiana tabacum*) καπνού. Τα βοτανικά χαρακτηριστικά του καπνού (μεγάλη βιομάζα, γρήγορος ρυθμός ανάπτυξης, πλούσιο ριζικό σύστημα) επιτρέπουν τη χρήση του φυτού σε προγράμματα φυτοαποκατάστασης. Το γεγονός ότι το συγκεκριμένο φυτό έχει μελετηθεί υπό καταστάσεις ποικίλων καταπονήσεων άλλα και η συγγένεια του με τον άγριο καπνό, που επίσης μπορεί να θεωρηθεί ως υποψήφιο φυτό για εφαρμογές φυτοαποκατάστασης, (Barazani et al., 2004; Gisbert et al., 2003) μπορεί να δώσει ιδιαίτερος χρήσιμες πληροφορίες για την συμπεριφορά των φυτών, υπό καταπόνηση βαρέων μετάλλων.

Ένα ακόμα χαρακτηριστικό των συγκεκριμένων φυτών που αποτελεί σημαντικό πλεονέκτημα για εφαρμογές φυτοαποκατάστασης, είναι οι

υψηλές συγκεντρώσεις τοξικών αλκαλοειδών στους ιστούς, καθιστώντας τα μη βρώσιμα φυτά από τα ζώα και αρά μειώνεται ο κίνδυνος εισαγωγής των μετάλλων στην τροφική αλυσίδα.

Η επιλογή λοιπόν των συγκεκριμένων φυτών έγινε γιατί έχουν χαρακτηριστικά επιθυμητά ως προς την ανάπτυξη και αύξηση. Επιπλέον βάσει παρατηρήσεων σε ρυπασμένα πεδία αλλά και από τη λιγοστή βιβλιογραφία, φαίνεται να παρουσιάζουν αντοχή σε ρυπασμένα εδάφη από βαρέα μέταλλα. Επίσης πρόκειται για φυτά με ευρεία γεωγραφική εξάπλωση και αρά προσαρμόσιμα στις συνθήκες της προς αποκατάσταση περιοχής.



---

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

Υλικά & Μεθοδολογία

---

## 2.1 Γενικά

Στην παρούσα εργασία η καλλιέργεια των φυτών και οι επεμβάσεις με τα βαρέα μέταλλα διεξήχθησαν σε υαλόφρακτο θερμοκήπιο στο Αγρόκτημα του Τ.Ε.Ι. Κρήτης. Οι αναλύσεις και οι δοκιμές πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Φυσιολογίας και Βιοτεχνολογίας Φυτών της Σχολής Τεχνολογίας Γεωπονίας του Τ.Ε.Ι. Κρήτης

## 2.2 Προετοιμασία φυτικού υλικού (πολλαπλασιασμός-προσαρμογή)

Για τις ανάγκες του πειράματος έγινε σπορά των δυο φυτικών ειδών (*N. glauca* και *N. tabacum*) σε δίσκους παραγωγής σποροφύτων οι οποίοι παρέμειναν για διάστημα ενός μηνός σε ειδικό θάλαμο ανάπτυξης έως τα φυτάρια να αποκτήσουν ύψος 4-5 εκ. Έπειτα μεταφέρθηκαν στο θερμοκήπιο και παρέμειναν επίσης για ένα μήνα ώστε να αναπτυχθούν ικανοποιητικά και να είναι κατάλληλα για τοποθέτηση στις γλάστρες όπου έγιναν οι επεμβάσεις με τα βαρέα μέταλλα. Η μεταφύτευση έγινε σε γλάστρες 5 λίτρων που περιείχαν οργανικό υπόστρωμα και περλίτη σε αναλογία όγκων 3:1. Το οργανικό υπόστρωμα το οποίο χρησιμοποιήθηκε είναι εμπορικά διαθέσιμο με ονομασία Potgrond P blocking substrate, (Klasmann - Deilmann, Germany), το οποίο είναι μείγμα μαύρης τύρφης και compost, με χημικά χαρακτηριστικά: pH 6 (H<sub>2</sub>O, v/v 1:2.5), ηλεκτρική αγωγιμότητα 60 mS·m<sup>-1</sup>, οργανικό άνθρακα βιολογικής προέλευσης 47%, οργανικό N 1%, ολικό ποσό αζώτου 210 mg/L, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 240 mg/L, K<sub>2</sub>O 270 mg/L και MgO 120 mg/L.

Συνολικά εγκαταστάθηκαν 320 φυτά, 160 για κάθε φυτικό είδος, τα οποία χωρίστηκαν σε ομάδες των 16 φυτών. Ακολούθησε περίοδος προσαρμογής των φυτών για χρονικό διάστημα 20 ημερών προκειμένου να αυξηθούν και να αναπτύξουν ικανοποιητικό ριζικό σύστημα. Στο διάστημα αυτό

εφαρμόστηκε υδρολίπανση με πλήρες λίπασμα (N:P:K 20:20:20 και ιχνοστοιχεία).

### 2.3 Πειραματική διαδικασία και μεταχειρίσεις

Μετά το τέλος της περιόδου προσαρμογής ξεκίνησαν οι επεμβάσεις με τα βαρέα μέταλλα. Αρχικά παρασκευάστηκαν τα διαλύματα των μετάλλων από τα χημικώς καθαρά (Sigma-Aldrich, Germany) ένυδρα άλατα  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $NiSO_4 \cdot 6H_2O$ ,  $CdSO_4 \cdot 2,67 H_2O$ , στις ακόλουθες συγκεντρώσεις:

Zn (mM)	Ni (mM)	Cd (mM)
0, 0,5, 2,5, 5,0	0, 0,1, 0,5, 1,0	0, 0,2, 1,0, 2,0

Για λόγους απλούστευσης οι παραπάνω επεμβάσεις στο Κεφάλαιο Αποτελέσματα & Συζήτηση θα αναφέρονται ως εξής:

Ψευδάργυρος: [Zn0], [Zn0,5], [Zn2,5], [Zn5]

Νικέλιο: [Ni0], [Ni0,1], [Ni0,5], [Ni1]

Κάδμιο: [Cd0], [Cd0,2], [Cd1], [Cd2]

Σε κάθε φυτικό είδος (10 ομάδες των 16 φυτών) πραγματοποιήθηκαν επεμβάσεις με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις του κάθε μετάλλου. Η εφαρμογή των επεμβάσεων γινόταν με 500 ml διαλύματος αντίστοιχης συγκέντρωσης μετάλλου ανά γλάστρα και ανά εβδομάδα επί συνόλου 6 εβδομάδων. Αντίστοιχα, τα φυτά μάρτυρες ποτιζόταν με 500 ml νερού. Επιπλέον, στο μεσοδιάστημα των επεμβάσεων, τα φυτά αρδεύονταν όποτε αυτό κρινόταν απαραίτητο ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Η ποσότητα του νερού κατά το πότισμα ήταν τόση, ώστε να μην υπάρχουν απώλειες βαρέων μετάλλων από τις απορροές.

Κατά την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας πραγματοποιούνταν μετρήσεις των υπέργειων τμημάτων και οπτική παρατήρηση των φυτών έτσι ώστε να εντοπιστούν πιθανές αλλαγές και συμπτώματα τοξικότητας λόγω της παρουσίας των μετάλλων. Με τη λήξη του πειράματος (42 ημέρες από την πρώτη επέμβαση) πραγματοποιήθηκε αφαίρεση των υπέργειων τμημάτων των φυτών, πλύση τους με νερό βρύσης και έπειτα με απιονισμένο νερό προκειμένου να απομακρυνθούν τυχόν σωματίδια σκόνης. Οι ρίζες εκριζώθηκαν με ιδιαίτερη προσοχή από το υπόστρωμα και πλύθηκαν με άπλετο νερό βρύσης και στη συνέχεια με απιονισμένο νερό έτσι ώστε να απομακρυνθεί πλήρως το υπόστρωμα και μαζί τυχόν υπολείμματα μετάλλων. Η δειγματοληψία έγινε από πέντε διαφορετικά τμήματα των φυτών, όπως περιγράφεται αναλυτικά στον Πίνακα 2.1.

**Πίνακας 2.1.** Επιλογή διαφορετικών τμημάτων των φυτών κατά την δειγματοληψία.

Τμήμα φυτού	Περιγραφή
Φύλλα βάσης:	Περιλαμβάνει το τέταρτο έως και το έβδομο φύλλο από τη βάση του κάθε φυτού
Φύλλα κορυφής:	Περιλαμβάνει το δεύτερο έως και το έκτο, πλήρως ανεπτυγμένο φύλλο από την κορυφή του κάθε φυτού
Βλαστός βάσης:	Περιλαμβάνει το τμήμα του βλαστού μεταξύ τέταρτου και έβδομου φύλλου από τη βάση του φυτού
Βλαστός κορυφής:	Περιλαμβάνει το τμήμα του βλαστού μεταξύ δευτέρου και έκτου φύλλου από την κορυφή του φυτού
Ριζά:	Περιλαμβάνει ολόκληρη τη ρίζα απαλλαγμένη από υπόστρωμα

Στην συνέχεια προσδιορίστηκε το νερό καθώς και ξηρό βάρος των διαφόρων φυτικών τμημάτων (φύλλα, βλαστοί και ρίζες) μετά από ξήρανση δειγμάτων σε φούρνο στους 70 °C για 48 ώρες. Για τις ενζυμικές και βιοχημικές αναλύσεις της εργασίας, δείγματα από τους φυτικούς ιστούς, κονιοροποιήθηκαν σε ιγδίο πορσελάνης με υγρό άζωτο και αποθηκεύτηκαν σε υπερκαταψύκτη -80 °C μέχρι να χρησιμοποιηθούν. Επιπλέον για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων των βαρέων μετάλλων στους ιστούς με φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης χρησιμοποιήθηκαν δείγματα φύλλων, βλαστών, και ρίζας τα όποια ξηρανθηκαν σε φούρνο 70 °C για 48 ώρες.



Εικόνα 2.1 Γενική άποψη των φυτών *N. glauca* και *N. tabacum* στο θερμοκήπιο 3 εβδομάδες από την έναρξη των επεμβάσεων.

## 2.4 Πειραματικές μετρήσεις

### 2.4.1 Φυσιολογικές Παράμετροι

Ο ρυθμός αφομοίωσης (A), η στοματική αγωγιμότητα (gs) και ο ρυθμός διαπνοής (E) μετρήθηκαν ταυτόχρονα με τη χρήση του φορητού συστήματος φωτοσύνθεσης Li-6400 (Li-Cor, Nebraska, USA). Τα φύλλα τοποθετήθηκαν στον ειδικό θάλαμο (2x3 cm) χωρίς να αποσπαστούν από το φυτό και παρέμειναν εκεί έως ότου σταθεροποιηθούν οι ενδείξεις της συσκευής. Ο θάλαμος ελεγχόταν συχνά προκειμένου να επιτευχθεί το ερμητικό κλείσιμό του. Η ροή στη συσκευή ήταν  $700 \mu\text{mol s}^{-1}$  και ο φωτισμός ορίστηκε στα  $1000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Η συγκέντρωση αναφοράς του  $\text{CO}_2$  ορίστηκε στα  $400 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Η στοματική αναλογία θεωρήθηκε μηδέν (τα φύλλα φέρουν στόματα μόνο στη μία πλευρά τους).

#### 2.4.1.1 Διαπνοή

Η διαπνοή περιλαμβάνει δύο στάδια: α) τη διαμέσου των κυτταρικών τοιχωμάτων μεταβολή της υγρής φάσης σε αέρια και τη συγκέντρωση υδρατμών στην υποστοματική κοιλότητα και β) τη διάχυση των υδρατμών από εκεί στην ατμόσφαιρα μέσω της στοματικής συσκευής. Ο ρυθμός διαπνοής εξαρτάται από την απαιτούμενη ενέργεια για την εξάτμιση του νερού, από τη διαφορά τάσεως ή συγκεντρώσεως των υδρατμών και από το σύνολο των αντιστάσεων που θα συναντήσει το νερό κατά την κίνηση του από τα φύλλα προς την ατμόσφαιρα.

Η διαπνοή μπορεί να θεωρηθεί ως συνάρτηση της διαφοράς συγκεντρώσεως υδρατμών (C) μεταξύ της υποστοματικής κοιλότητας και της υπερκείμενης του φύλλου ατμόσφαιρας και της αντίστασης διάχυσης (r) (Kramer and Boyer, 1995; Pearcy et al., 1991).

$$E = \frac{C_{\text{leaf}} - C_{\text{air}}}{r_{\text{leaf}} + r_{\text{air}}}$$

Όπου:  $C_{\text{leaf}}$ : συγκέντρωση  $\text{H}_2\text{O}$  στην υποστοματική κοιλότητα

$C_{\text{air}}$ : συγκέντρωση  $\text{H}_2\text{O}$  στην ατμόσφαιρα

$r_{\text{leaf}}$ : αντίσταση διαχύσεως  $\text{H}_2\text{O}$  στα φύλλα

$r_{\text{air}}$ : αντίσταση διαχύσεως  $\text{H}_2\text{O}$  στην ατμόσφαιρα

#### 2.4.1.2 Στοματική Αγωγιμότητα

Η ταχύτητα διαχύσεως των υδρατμών εκφραζόμενη ως αγωγιμότητα υδρατμών ( $g_s$ ) διέπεται από το νόμο διάχυσης του Ficks. Στην πιο απλή της μορφή εκφράζεται ως η αναλογία μεταξύ του ρυθμού διαπνοής ( $E$ ) και της διαφοράς των υδρατμών μεταξύ των μεσοκυττάρων χώρων του φύλλου και της ατμόσφαιρας ( $\Delta W$ ) (Percy et al., 1991).

$$g_s = \frac{E}{\Delta W} \quad (\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1})$$

#### 2.4.1.3 Ρυθμός φωτοσύνθεσης

Η φωτοσύνθεση απαιτεί απορρόφηση ηλιακής ακτινοβολίας από τους χλωροπλάστες. Ο βαθμός με τον οποίο η ακτινοβολία χρησιμοποιείται από τα φυτά εξαρτάται από τη συγκέντρωση των φωτοσυνθετικά ενεργών χρωστικών. Η φωτοχημική διαδικασία ξεκινά όταν οι χλωροπλάστες προσλαμβάνουν τη φωτοσυνθετικά αξιοποιήσιμη ακτινοβολία. Η ενέργεια και η αναγωγική δύναμη, που παρέχεται από τις αρχικές αντιδράσεις, χρησιμοποιείται για την αναγωγή του  $\text{CO}_2$  σε καρβοξύλιο και τη σύνθεση υδατανθράκων υψηλής ενεργειακής αξίας. Η ταχύτητα με την οποία το προσλαμβανόμενο  $\text{CO}_2$  καρβοξυλιώνεται εξαρτάται κυρίως από τη διαφορά συγκεντρώσεως του  $\text{CO}_2$  μεταξύ των θέσεων καρβοξυλίωσης ( $C_x$ ) και της υποστοματικής κοιλότητας ( $C_i$ ), δηλ. από το  $\Delta C_{\text{CO}_2} = C_i - C_x$  και από την

ενζυμική δραστηριότητα της Rubisco ή της PEP καρβοξυλάσης ή οξειδάσης, όπως επίσης και από τους φυσικοχημικούς παράγοντες που επηρεάζουν την ενζυμική λειτουργία.

Η μέτρηση της φωτοσύνθεσης είναι δυνατή χωρίς την ταυτόχρονη μέτρηση της διαπνοής, εντούτοις θεωρείται χρήσιμο να μετρώνται οι δύο αυτές παράμετροι ταυτόχρονα, καθώς σημαντικό ρόλο στην ανταλλαγή  $H_2O$  και  $CO_2$  διαμέσου των στοματικών πόρων, που καθορίζουν τη διαπνευστική και φωτοσυνθετική συμπεριφορά συγχρόνως, παίζει η λειτουργία της στοματικής συσκευής. Για τη μέτρησή της χρησιμοποιείται συσκευή μέσω της οποίας λαμβάνει χώρα ταυτόχρονη και αμφίδρομη ροή μάζας αερίων, δεδομένου ότι ρυθμίζει τις ποσότητες των αερίων φάσεων, τόσο του  $H_2O$  που θα εξέλθει (διαπνοή), όσο και του  $CO_2$  που θα εισέλθει (φωτοσύνθεση). Η ποσότητα του διαπνεόμενου  $H_2O$  είναι ευθέως ανάλογη προς τη διαφορά συγκέντρωσης των υδρατμών, που τείνει να μειώνεται από τον εσωτερικό μεσοκυττάριο χώρο του φύλλου προς τον εξωτερικό ατμοσφαιρικό χώρο.

Κατά τον ίδιο τρόπο η ποσότητα πρόσληψης του  $CO_2$  είναι ευθέως ανάλογη προς τη διαφορά συγκέντρωσης του  $CO_2$  που τείνει να μειώνεται από τον εξωτερικό προς τον εσωτερικό χώρο (θέσεις καρβοξυλίωσης  $CO_2$ ). Η διαφορά ανάμεσα στην τιμή της ολικής αγωγιμότητας της ροής του  $CO_2$  και αυτής της ροής της αέριας φάσης του  $H_2O$  καθορίζει ποσοτικά την είσοδο του  $CO_2$  και την έξοδο του  $H_2O$  και αντανakλά κυρίως τη διαφορά μεταξύ των συντελεστών διάχυσης του  $CO_2$  και του  $H_2O$  (Jones, 1998). Πάντως, επειδή ακριβώς ένα μεγάλο μέρος της διαδρομής του  $CO_2$  και των υδρατμών είναι κοινό (έναν δρόμο διπλής κατεύθυνσης) η διαπνοή μπορεί να θεωρηθεί ότι συνήθως λαμβάνει χώρα παράλληλα και ταυτόχρονα με τη φωτοσύνθεση. Το κλείσιμο ή το άνοιγμα της στοματικής συσκευής θα έχει επομένως αντιφατικές συνέπειες πάνω σε δύο ουσιώδεις φυσιολογικές λειτουργίες του φυτού: τη διαπνοή και τη φωτοσύνθεση αλλά και στην εν γένει παραγωγική αποτελεσματικότητα του φυτού. Έτσι, η μείωση του στοματικού ανοίγματος,



επαγόμενη από υδατική καταπόνηση, έχει ως αναμενόμενη φυσιολογική συνέπεια τον περιορισμό των διαπνευστικών απωλειών, αλλά συγχρόνως και τη μείωση της ποσότητας του CO<sub>2</sub> που εισέρχεται στο μεσόφυλλο για να φθάσει στις θέσεις καρβοξυλίωσης. Το αντίστροφο γίνεται με την αύξηση του στοματικού ανοίγματος.

Η πιο διαδεδομένη μέθοδος προσδιορισμού του ρυθμού αφομοίωσης είναι η χρησιμοποίηση συσκευής εφοδιασμένης με αναλυτή αερίων. Ο προσδιορισμός στηρίζεται στην ισχυρή απορρόφηση του CO<sub>2</sub> στο υπέρυθρο τμήμα του φάσματος (κυρίως στα 4,26 μm) (Jones, 1992). Ο αναλυτής αερίων συνδέεται με φωτοσυνθετικό θάλαμο ερμητικά κλειστό στον οποίο εισέρχεται το φύλλο χωρίς να αποκοπεί από το βλαστό. Μέσα στο θάλαμο το φύλλο συνεχίζει να φωτοσυνθέτει και να διαπνέει. Αν ένα ρεύμα αέρα περνά συνέχεια από το θάλαμο τότε ο εξερχόμενος από αυτόν αέρας θα έχει μειωμένη συγκέντρωση CO<sub>2</sub> και αυξημένη συγκέντρωση H<sub>2</sub>O, σε σύγκριση με τον εισερχόμενο στο θάλαμο αέρα. Όταν οι ρυθμοί φωτοσύνθεσης, διαπνοής και ροής του αέρα σταθεροποιηθούν η φωτοσύνθεση υπολογίζεται από τη σχέση:

$$A_n = \frac{u_e c_e - u_o c_o}{L} \quad (\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1})$$

Όπου:  $u_e$  η ροή του εισερχόμενου στο θάλαμο αέρα,  
 $c_e$  η συγκέντρωση του CO<sub>2</sub> στον εισερχόμενο αέρα,  
 $u_o$  η ροή του εξερχόμενου αέρα (η οποία διαφέρει από αυτή του εισερχόμενου γιατί το φύλλο αφαιρεί CO<sub>2</sub> και προσθέτει H<sub>2</sub>O),  
 $c_o$  η συγκέντρωση του CO<sub>2</sub> στον εξερχόμενο αέρα και  
 $L$  η επιφάνεια του φυτικού υλικού μέσα στο θάλαμο.

#### 2.4.1.4 Εσωτερική συγκέντρωση CO<sub>2</sub>

Η συγκέντρωση του CO<sub>2</sub> στους μεσοκυττάριους χώρους (C<sub>i</sub>) αποτελεί μέτρο της διαθεσιμότητας του κύριου υποστρώματος για τη φωτοσύνθεση και

απαραίτητη παράμετρο για τον καθορισμό του περιορισμού της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας μεταξύ βιοχημικών και παραμέτρων διάχυσης.

Η αγωγιμότητα των φύλλων στη διάχυση των υδρατμών, η οποία υπολογίζεται από μετρήσεις ανταλλαγής  $H_2O$ , αποτελεί σημαντικό παράγοντα για τον καθορισμό του  $C_i$ , της συγκέντρωσης, δηλαδή του  $CO_2$  μέσα στο φύλλο. Ο πιο απλός τρόπος υπολογισμού του  $C_i$  στηρίζεται στη χρησιμοποίηση της στοματικής αγωγιμότητας. Επειδή το μονοπάτι διάχυσης τόσο για το  $H_2O$  όσο και για το  $CO_2$  είναι κοινό, η αγωγιμότητα του  $CO_2$  μπορεί να υπολογιστεί από την αγωγιμότητα του  $H_2O$ :

$$C_i = \frac{A_n}{g_{tc}}$$

Όπου:  $C_i$  η συγκέντρωση του  $CO_2$  στους μεσοκυττάριους χώρους,  
 $C_a$  η συγκέντρωση του  $CO_2$  στον ατμοσφαιρικό αέρα,  
 $A_n$  η καθαρή φωτοσύνθεση  
 $g_{tc}$  ο συνδυασμός της αγωγιμότητας  $CO_2$  διαμέσου του περιοριστικού διαπνευστικού στρώματος και της στοματικής συσκευής (Field et al. 1991, Nobel 1991).

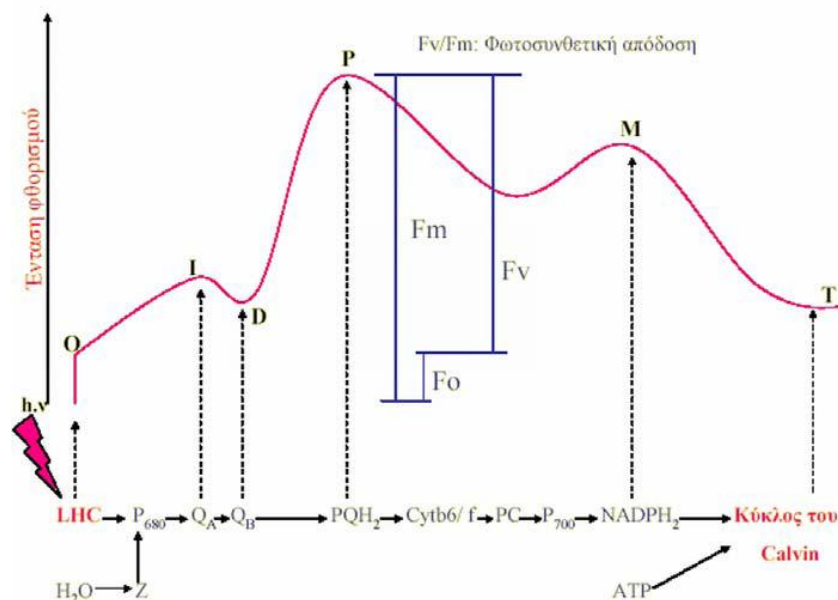
Η μέτρηση της συγκέντρωσης του  $CO_2$  στους μεσοκυττάριους χώρους ( $C_i$ ) πραγματοποιήθηκε με τη χρήση υπέρυθρου αναλυτή αερίων.

## 2.4.2 Φωτοχημικές Παράμετροι

### 2.4.2.1 Προσδιορισμός επαγωγικού φθορισμού χλωροφύλλης

Η εκτίμηση του φθορισμού της χλωροφύλλης είναι μια διαδεδομένη μέθοδος για την αξιολόγηση της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας (Krause and Weis, 1991). Η μέθοδος αυτή είναι μη καταστρεπτική και ιδιαίτερα ευαίσθητη. Όταν τα μόρια χλωροφύλλης στο φωτοσύστημα II απορροφούν το φως,

εκείνο το φως μπορεί να χρησιμοποιηθεί στις φωτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης ή μπορεί να απελευθερωθεί ως ενέργεια φθορισμού ή θερμότητας. Ο *in vivo* φθορισμός αυξάνεται όταν μειώνεται η φωτοσύνθεση ή όταν εμποδίζεται.



**Εικόνα 2.2** Οι παράμετροι του φθορισμού της χλωροφύλλης (από Maxwell 2000).

Η μέγιστη απόδοση του φωτοσυστήματος II (F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>), η οποία είναι επίσης γνωστή ως απόδοση στο σκοτάδι, μετρήθηκε χρησιμοποιώντας το OS-30p Chlorophyll Fluorometer (OPTI-SCIENCES) στα 660 nm μετά από 10 λεπτά επώασης στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί υποδοχείς για την προσαρμογή των φύλλων στο σκοτάδι (DLC-8). Οι εν λόγω υποδοχείς είναι εφοδιασμένοι με ένα παράθυρο που κλείνει, το οποίο αποτρέπει την είσοδο του ηλιακού φωτός και επιτρέπει την προσαρμογή του φύλλου στο σκοτάδι. Με την παραμονή στο σκοτάδι όλοι οι πρωταρχικοί δέκτες του PSII οξειδώνονται πλήρως. Έτσι με τον απότομο φωτισμό, ο φθορισμός (P) ανέρχεται σε ένα αρχικό επίπεδο P<sub>0</sub>, που αντιστοιχεί στο βασικό φθορισμό της φωτοσυνθετικής συσκευής πριν το PSII διεγερθεί. Στη συνέχεια και εφ' όσον η ένταση του διεγείροντος φωτός αντιστοιχεί σε επίπεδα κορεσμού, ο αρχικός φθορισμός ανέρχεται σε ένα

μέγιστο επίπεδο  $F_m$  που συμπίπτει με την πλήρη αναγωγή όλων των αποθεμάτων του πρωταρχικού δέκτη  $Q_A$ , άρα στο σημείο αυτό η φωτοχημική ικανότητα θεωρείται μηδέν. Η διαφορά μεταξύ μέγιστου και αρχικού φθορισμού ονομάζεται μεταβλητός φθορισμός ( $F_n = F_m - F_0$ ). Ο λόγος του μεταβλητού προς το μέγιστο φθορισμό ( $F_v/F_m$ ) είναι ένας πολύ χρήσιμος δείκτης της φωτοχημικής ικανότητας των φυτών, αποτελώντας έτσι μία καλή ένδειξη φωτοανασταλτικών βλαβών, που μπορούν να προέρχονται από διάφορες μορφές περιβαλλοντικής καταπόνησης.

#### 2.4.2.2 Μέτρηση ολικών χλωροφυλλών

*In vivo*: Για τη μέτρηση της πυκνότητας της χλωροφύλλης χρησιμοποιήθηκε ο φορητός μετρητής χλωροφύλλης SPAD-502 (Minolta), που επιτρέπει μετρήσεις, χωρίς καταστροφή του φύλλου. Η μέτρηση με το συγκεκριμένο όργανο βασίζεται στη σύγκριση της διαπερατότητας του φύλλου σε δύο μήκη κύματος, στα 650 nm όπου απορροφά η χλωροφύλλη και στα 940 nm, όπου δεν απορροφά κανένα συστατικό του φύλλου. Οι προκύπτουσες τιμές είναι ανάλογες της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης στα φύλλα. Καθώς το χλωροφυλλόμετρο δίνει σχετικές τιμές, είναι αναγκαία η βαθμονόμησή του με τις πραγματικές συγκεντρώσεις χλωροφυλλών που προκύπτουν από την κλασσική φασματοφωτομετρική μέθοδο που περιγράφεται στην επομένη παράγραφο. Η πρότυπη καμπύλη (τιμές SPAD έναντι πραγματικών συγκεντρώσεων χλωροφυλλών) είναι μοναδική για κάθε φυτικό είδος και το γεγονός αυτό έχει αποδοθεί στην πολυπλοκότητα του μονοπατιού διέλευσης του φωτός μέσα στο φύλλο (Manetas et al., 1998; Zavaleta-Mancera et al., 1999). Στην παρούσα εργασία οι τιμές SPAD παρουσιάζονται αυτούσιες σε συσχέτισμό με τις πραγματικές συγκεντρώσεις χλωροφυλλών στα δείγματα.

*In vitro*: Δείγματα νωπών φύλλων βάρους 0,2 g ομογενοποιήθηκαν σε ιγδίο από πορσελάνη με 2 ml υδατικού διαλύματος ακετόνης 80% μέχρι πλήρους ομογενοποίησης. Στην συνέχεια το εκχύλισμα φυγοκεντρήθηκε σε 2000g για

δέκα λεπτά. Μέρος του υπερκειμένου συλλέχτηκε και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 663 και 646 nm σε φασματοφωτόμετρο UV (UV mini 1240, Shimadzu, Japan), ενώ διάλυμα ακετόνης 80% χρησιμοποιήθηκε ως τυφλό διάλυμα για τον μηδενισμό του οργάνου. Η συγκέντρωση της χλωροφύλλης a, b και ολικών χλωροφύλλων εκφράζεται ανά g νωπού βάρους και υπολογίζεται από τις ακόλουθες εξισώσεις:

$$\text{Ολική Χλωροφύλλη (}\mu\text{g/mL)} = 17,3 A_{646} + 7,18 A_{663}$$

$$\text{Χλωροφύλλη a (}\mu\text{g/mL)} = 12,21 A_{663} - 2,81 A_{646}$$

$$\text{Χλωροφύλλη b (}\mu\text{g/mL)} = 20,13 A_{646} - 5,03 A_{663}$$

όπου  $A_{663}$  και  $A_{646}$  η απορρόφηση στα 663 και 646 nm, αντίστοιχα.

### 2.4.3 Χημικές - Βιοχημικές Αναλύσεις

#### 2.4.3.1 Προσδιορισμός συγκέντρωσης Zn, Ni και Cd στους φυτικούς ιστούς

Σε 0,5 g δείγματος ξηρού και κονιορτοποιημένου φυτικού ιστού τα οποία τοποθετήθηκαν σε γυάλινη φλάσκα των 50 ml προστεθήκαν 20 ml μίγματος ισχυρών οξέων  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{HClO}_4$  (5:1:2 v/v) για την καταστροφή της οργανικής ουσίας. Οι φλάσκες παρέμειναν σε θερμαινόμενη στους  $200^\circ\text{C}$  πλάκα για περίπου έξι ώρες ώστε το υπόλειμμα της καύσης να μην στεγνώσει τελείως. Στην συνέχεια τα δείγματα απομακρύνθηκαν από την πλάκα και αφού αφέθηκαν να κρυώσουν, προστέθηκαν 10–20ml υπερκαθαρού νερού, διηθήθηκαν με διηθητικό χαρτί Whatman No 41 και αραιώθηκαν με υπερκάθαρο νερό έως τα 100 ml. Το τελικό διάλυμα αποθηκεύτηκε στους  $4^\circ\text{C}$  (όχι περισσότερο από μια εβδομάδα) έως ότου πραγματοποιηθεί ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων Zn, Ni και Cd με χρήση φασματογράφου ατομικής απορρόφησης (Τσικαλάς, 2003). Για τον προσδιορισμό αυτών χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ατομικής απορρόφησης

διπλής δέσμης (μοντέλο 2100, Perkin-Elmer, Germany). Η ατομοποίηση των στοιχείων πραγματοποιήθηκε με φλόγα ακετυλενίου (υψίστης καθαρότητας) και οξυγόνου. Τα πρότυπα διαλύματα (Zn, Ni και Cd) για την καμπύλη αναφοράς του οργάνου παρασκευάστηκαν με αραιώση εμπορικών διαθέσιμων πρότυπων συγκέντρωσης 1 mg/l (Fluca, Germany). Οι πρότυπες καμπύλες κατασκευάστηκαν κάνοντας τρεις μετρήσεις απορρόφησης για κάθε πρότυπο διάλυμα. Οι μετρήσεις γίνονται με λάμπα πολλαπλών στοιχείων και σε μήκος κύματος για τον ψευδάργυρο 213,9 nm, το νικέλιο 232 nm και το κάδμιο 228,8 nm.

#### **2.4.3.2 Μέτρηση υπεροξειδωσης λιπιδίων με τη μέθοδο TBARS**

Η λιπιδική υπεροξειδωση μπορεί να οριστεί ως η οξειδωτική «παρακμή» των πολυακόρεστων λιπών. Η εκκίνηση μιας αλυσίδας αντιδράσεων υπεροξειδωσης σε μια μεμβράνη ή στα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα γίνεται λόγω της απόσπασης ενός ατόμου υδρογόνου από το διπλό δεσμό των λιπαρών οξέων. Η ελεύθερη ρίζα τείνει να σταθεροποιηθεί με μια μοριακή αναδιοργάνωση και να παράγει ένα συζυγιακό διένιο, το οποίο εύκολα αντιδρά με μοριακό οξυγόνο με αποτέλεσμα το σχηματισμό μιας υπεροξειδικής ρίζας. Αυτές οι υπεροξειδικές ρίζες μπορούν να αποσπάσουν ένα άτομο υδρογόνου από ένα άλλο μόριο και να δώσουν ένα λιπιδικό υδροπεροξείδιο (R-OOH). Μια πιθανή κατάληξη των υπεροξειδικών ριζών είναι να σχηματίσουν κυκλικά υπεροξείδια. Αυτά τα κυκλικά υπεροξείδια, τα λιπιδικά υπεροξείδια, καθώς και τα κυκλικά ενδοπεροξείδια, κλασματώνονται σε αλδεΐδες συμπεριλαμβανομένης και της μαλονδιαλδεΐδης MDA (Halliwell and Gutteridge, 2007).

Η μέθοδος βασίζεται στην αντίδραση του θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBA) με αλδεϊδικά παράγωγα υπεροξειδωσης των λιπιδίων, στους 100°C και χαρακτηρίζεται ως μη εξειδικευμένη καθώς υπολογίζει το σύνολο όλων των αλδεϊδικών παραγώγων (πρωτεϊνικών και μη πρωτεϊνικών) που εν συντομία

καλούνται TBARS (Ενώσεις αντιδρούσες με TBA, ή TBA reactive substances) (Zamora et al., 1997). Η διαδικασία της μεθόδου παρουσιάζεται παρακάτω (Barylak et al., 2000).

Ποσότητα 0,2g δείγματος τοποθετείται σε σωληνάρια erpendorfs και προστίθεται 1 ml υδατικού διαλύματος TCA 0,5% w/v. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 2000g. Από το υπερκείμενο λαμβάνονται 300μl, μεταφέρονται σε νέο σωληνάριο και προστίθεται 1 ml 20% TCA με 0.5% TBA. Το μίγμα θερμαίνεται σε υδατόλουτρο για 30 λεπτά στους 95°C. Για τον τερματισμό της αντίδρασης τα δείγματα τοποθετούνται στον πάγο για 5 λεπτά. Η απορρόφηση των δειγμάτων μετρείται στα 532nm και 600nm. Με την αφαίρεση  $A_{532nm} - A_{600nm}$  υπολογίζεται η τελική καθαρή τιμή. Η μετατροπή της απορρόφησης σε συγκέντρωση γίνεται από πρότυπη καμπύλη μαλονικής διαλδεΐδης που κατασκευάζεται ακολουθώντας την ίδια διαδικασία. Η τελική έκφραση είναι σε μmoles ισοδύναμα MDA ( $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) ανά γραμμάριο νεπού βάρους.

#### **2.4.3.3 Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας (Δοκιμή TEAC - Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)**

Η μέθοδος στηρίζεται στην ελεγχόμενη οξείδωση μιας ουσίας, της ABTS ή 2,2 Azinobis (3-αιθυλοβενζοθειαζοζίνη-6-σουλφονίδιο). Με την οξείδωση η ABTS μετατρέπεται σε μια κατιονική ρίζα, την  $ABTS^+$ , και έχει χαρακτηριστικό κυανοπράσινο χρώμα που ανιχνεύεται στην περιοχή του υπέρυθρου 645, 734 και 815nm. Η παρουσία αντιοξειδωτικών στο δείγμα αναστέλλει την παραγωγή αυτού του χρώματος σε βαθμό ανάλογο με τη συγκέντρωσή τους. Έτσι, με έλεγχο του αποχρωματισμού του  $ABTS^+$  μέσα στο διάλυμα, μετά την προσθήκη του αντιοξειδωτικού, ελέγχεται η δραστηριότητα του τελευταίου.

Η δοκιμή TEAC έγινε με την τροποποιημένη μέθοδο TEAC (Muhammad et al., 2008; Ozgen et al., 2006) και στηρίζεται στην ικανότητα του υπό ελέγχου αντιοξειδωτικού να σαρώνει τις σχηματιζόμενες κατιονικές ρίζες ABTS<sup>+</sup> σε σχέση με το αντιοξειδωτικό Trolox το οποίο είναι ένα υδατοδιαλυτό ανάλογο της βιταμίνης E. Ο σχηματισμός των ελευθέρων ριζών ABTS<sup>+</sup> έγινε με αντίδραση μεταξύ της αρχικής ουσίας ABTS (7mM) με K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (2,45mM) σε διάλυμα οξικού νατρίου 20mM, pH 4,5. Το διάλυμα αυτό προπαρασκευάστηκε 12 ώρες πριν την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας ώστε να έχει σταθεροποιηθεί η παράγωγη ABTS<sup>+</sup> (Re et al., 1999). Τελικά για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκε αραιωμένο ABTS<sup>+</sup> σε διάλυμα οξικού νατρίου 20mM, pH 4,5 ώστε η απορρόφησή του στα 734nm να είναι ίση με 1,2±0,02.

Ποσότητα 0,2g από το υπό εξέταση δείγμα εκχυλίζεται με 2ml υδατικού διαλύματος ακετόνης 80% v/v, και το εκχύλισμα φυγοκεντρείται στις 2000g για 10 λεπτά. Σε 1ml αραιωμένου διαλύματος ABTS<sup>+</sup> προστίθενται 10 μl από το υπερκείμενο και καταγράφεται η απορρόφηση του μίγματος στα 734nm, οκτώ λεπτά από την έναρξη της αντίδρασης. Το ποσοστό της ανάσχεσης απορρόφησης υπολογίζεται από τον τύπο:

$$I_{734} = \left(1 - \frac{A_f}{A_0}\right) \cdot 100$$

όπου  $A_0$  η απορρόφηση πριν την ανάμειξη του δείγματος με το ABTS<sup>+</sup>

$A_f$  η απορρόφηση μετά την ανάμειξη.

Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, έγινε με μέτρο σύγκρισης την ανάσχεση απορρόφησης γνωστών συγκεντρώσεων Trolox σε ανάλογα διαλύματα και εκφράζεται σε μmole TEAC ανά g νωπού βάρους.



#### 2.4.3.4 Μέτρηση συγκέντρωσης προλίνης (Αντίδραση Νινυδρίνης)

Είναι γνωστό ότι τα βαρέα μέταλλα προξενούν αρκετές αλλαγές στις φυσιολογικές λειτουργίες των φυτών που σε πολλές περιπτώσεις φτάνουν ή και υπερβαίνουν τα όρια της καταπόνησης. Η δυσχέρεια απορρόφησης νερού από το έδαφος, η αύξηση των συγκεντρώσεων ανόργανων ιόντων σε τοξικά επίπεδα στο κύτταρο, αλλά και άλλες βλάβες, μπορεί να οφείλονται σε υψηλές συγκεντρώσεις τοξικών μετάλλων και τελικά προκαλούν διαταραχές στο ωσμωτικό δυναμικό των κυττάρων. Ένας μηχανισμός αντοχής σε τέτοιου είδους καταπονήσεις είναι η ωσμωτική προσαρμογή και συνίσταται στην συσσώρευση διαλυτών ουσιών, των λεγόμενων συμβατών μεταβολιτών ή οσμωλυτών. Πρόκειται για οργανικούς μεταβολίτες που δεν είναι τοξικοί για το κύτταρο και που συσσωρεύονται στο κυτταρόπλασμα ώστε αφενός το υδατικό δυναμικό του να διατηρείται σε ισορροπία με εκείνο του χυμοτοπίου και αφετέρου το όλο υδατικό δυναμικό του κυττάρου να διατηρείται χαμηλό χωρίς απώλεια της σπαργής του. Οι συμβατοί οσμωλύτες πέραν της οσμωρύθμισης, προστατεύουν ευαίσθητα μόρια από αφυδάτωση και αποδιάταξη, καθώς επίσης λειτουργούν και ως αντιοξειδωτικές ουσίες εξουδετερώνοντας ελεύθερες ρίζες οξυγόνου. Ένας από τους σημαντικότερους οσμωλύτες που λαμβάνουν ενεργό ρόλο στην αντιμετώπιση της καταπόνησης που προκαλούν τα βαρέα μέταλλα είναι η προλίνη (Choudhary et al., 2007; Mehta and Gaur, 1999).

Ο προσδιορισμός της προλίνης πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την μέθοδο της νινυδρίνης (Bates et al., 1973). Συγκεκριμένα 0,2g κονιορτοποιημένου με υγρό άζωτο δείγματος εκχυλίζονται με 1ml υδατικού διαλύματος TCA 10% w/v. Το μείγμα αναδεύεται και στη συνέχεια φυγοκέντρεται για 15 λεπτά σε 2000g. Από το υπερκείμενο λαμβάνονται 300μl τοποθετούνται σε νέο σωληνάριο και προστίθενται 300μl κρύου οξικού οξέος και 300μl διαλύματος νινυδρίνης. Το διάλυμα νινυδρίνης παρασκευάζεται με 2,5% w/v νινυδρίνη

σε διάλυμα οξικού οξέος, νερού και ορθοφωσφορικού οξέος ( $\text{CH}_3\text{COOH} : \text{H}_2\text{O} : \text{H}_3\text{O}_4\text{P}$ , 6:3:1 v/v). Τα σωληνάρια τοποθετούνται σε υδατόλουτρο με θερμοκρασία  $95^\circ\text{C}$  για 60 λεπτά και έπειτα αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά ώστε να τερματιστεί η αντίδραση. Ακολουθεί η μέτρηση της απορρόφησης των δειγμάτων σε φασματοφωτόμετρο στα 546nm. Η κατασκευή της πρότυπης καμπύλης πραγματοποιείται με τον ίδιο τρόπο για διαφορετικές συγκεντρώσεις διαλυμάτων καθαρής προλίνης. Οι μετρήσεις εκφράζονται σε  $\mu\text{mol}$  προλίνης ανά γραμμάριο νωπού βάρους δείγματος.

#### 2.4.4 Ενζυμικές αναλύσεις

Η εκχύλιση των ενζύμων πραγματοποιήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις σε θερμοκρασία  $4^\circ\text{C}$  μετά την ομογενοποίηση των ιστών σε ψυχόμενο ιγδίο πορσελάνης παρουσία κρύου ρυθμιστικού διαλύματος εκχύλισης σε αναλογία βάρους ιστού προς όγκο εκχυλιστικού 1:8 και φυγοκέντρωση σε 20000g για 30 λεπτά στους  $4^\circ\text{C}$ . Το διάλυμα εκχύλισης περιείχε 50 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH 6,5, 1% (w/v) PVPP, 1 M NaCl.

##### 2.4.4.1 Δοκιμή της δράσης της ασκορβικής υπεροξειδάσης (APX)

Η ενζυμική δράση της ασκορβικής υπεροξειδάσης (APX) προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά σύμφωνα με τη μέθοδο των Nakano και Asada (1987). Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στη μείωση της απορρόφησης στα 290nm εξαιτίας της μετατροπής του ασκορβικού οξέος (AA) σε αφυδροασκορβικό οξύ (DHA). Το διάλυμα δοκιμής συνολικού όγκου 1 ml περιείχε 50 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών, pH 7, 0,5 mM AA και 50  $\mu\text{l}$  εκχυλισματος. Η έναρξη της αντίδρασης πραγματοποιούνταν με την προσθήκη 30 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  και καταγράφονταν η μείωση της οπτικής πυκνότητας στα 290 nm στη μονάδα του χρόνου (s) σε σχέση με μάρτυρα που δε περιείχε  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Η συγκέντρωση του AA υπολογίστηκε με βάση τις τιμές

απορρόφησης και το συντελεστή μοριακής απόσβεσης  $E_M$   $290\text{nm}=2,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Η δράση της APX εκφράστηκε ως Units APX ανά g φρέσκου βάρους και 1 Unit ορίστηκε ως η ποσότητα του ενζύμου που αποικοδομεί  $1\mu\text{mol AA/s}$ .

#### 2.4.4.2 Προσδιορισμός της δραστηριότητας της υπεροξειδάσης (POD)

Η ενζυμική δράση της υπεροξειδάσης (POD) προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά και στηρίζεται στον έλεγχο του ρυθμού οξείδωσης της πυρογαλλόλης από την POD παρουσία  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Jiménez et al., 1997). Το διάλυμα δοκιμής ολικού όγκου 3 ml περιείχε 2,2 ml  $\text{dH}_2\text{O}$ , 0,32 ml 100 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH 6, 0,16 ml 0.5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  και 0,16ml πυρογαλλόλης. Η έναρξη της αντίδρασης πραγματοποιούνταν με την προσθήκη 10 μl φυτικού εκχυλίσματος και καταγράφονταν η αύξηση της απορρόφησης στη μονάδα του χρόνου σε σχέση με μάρτυρα που δεν περιείχε εκχύλισμα. Η μεταβολή της απορρόφησης ανά λεπτό χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της ποσότητας του ενζύμου στο μείγμα χρησιμοποιώντας τον συντελεστή απόσβεσης της πυρογαλλόλης:  $A_{430}=2.7 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μονάδες (Units) POD ανά γραμμάριο νωπού βάρους. Ως 1U ορίστηκε η ποσότητα του ενζύμου που προκαλεί μεταβολή της οπτικής πυκνότητας κατά μια μονάδα ανά λεπτό.

### 2.5 Στατιστική ανάλυση.

Το σχέδιο του πειράματος ήταν πλήρως τυχαίο με δώδεκα επαναλήψεις για τις φυσιολογικές, φωτοχημικές και τρεις για τις βιοχημικές παραμέτρους. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή (mean value,)  $\pm$  τυπικό σφάλμα (standard error of the mean - SEM). Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της ανάλυσης της

διακύμανσης (Analysis of Variance -ANOVA) σε επίπεδο σημαντικότητας  $\alpha=0,05$ ,  $0,01$  και  $0,001$  εφαρμόζοντας την διόρθωση κατά Bonferroni.

Ο έλεγχος ύπαρξης συσχέτισης μεταξύ φυσιολογικών, φωτοχημικών παραμέτρων με τη συγκέντρωση των μετάλλων στους φυτικούς ιστούς και τις επεμβάσεις (correlation analysis) πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του συντελεστή κατά Pearson σε επίπεδα σημαντικότητας  $\alpha=0,05$ . Όλες οι παραπάνω αναλύσεις έγιναν με τη βοήθεια του στατιστικού πακέτου GraphPad Prism ver.11.

---

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

### Αποτελέσματα & Συζήτηση

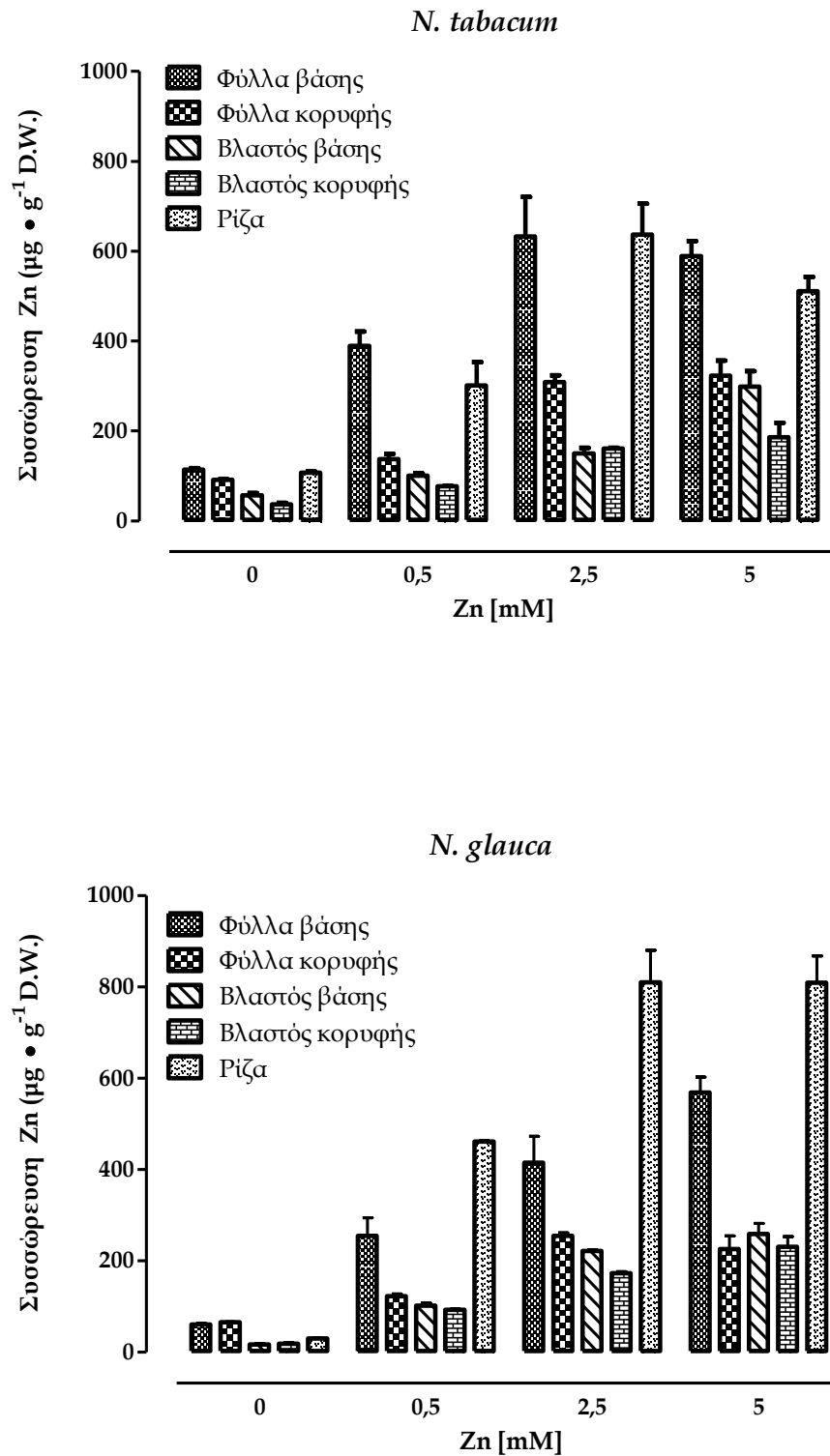
---

### 3.1 Επίδραση ψευδάργυρου στην ανάπτυξη και το μεταβολισμό των *N. tabacum* και *N. glauca*

Γενικά, ο ψευδάργυρος είναι το λιγότερο τοξικό από τα βαρέα μέταλλα για τα φυτά. Έχει πρωταρχικό ρόλο σε αρκετές σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες, όπως είναι ο μεταβολισμός των πρωτεϊνών, η γονιδιακή έκφραση, η δομική και λειτουργική ακεραιότητα των βιομεμβρανών, η φωτοσύνθεση κ.α. (Marschner, 1995). Οι διαλυτές μορφές του Zn είναι άμεσα διαθέσιμες για τα φυτά, ενώ η πρόσληψή του θεωρείται ότι αποτελεί γραμμική συνάρτηση της συγκέντρωσής του στο έδαφος (Kabata-Pendias, 2000). Αν και ο ψευδάργυρος χαρακτηρίζεται από μέτρια έως υψηλή κινητικότητα μέσα στο φυτό, συχνά το ριζικό σύστημα περιέχει μεγαλύτερη ποσότητα από ότι ο βλαστός. Αντίθετα, σε υψηλές συγκεντρώσεις μεταφέρεται από τις ρίζες συσσωρευόμενος στα υπέργεια τμήματα του φυτού (Broadley et al., 2007; Kabata-Pendias, 2000).

#### 3.1.1 Συσσώρευση ψευδαργύρου στους φυτικούς ιστούς

Στην Εικόνα 3.1 παρουσιάζεται η συσσώρευση σε σχέση με την εφαρμοζόμενη συγκέντρωση του ψευδαργύρου σε πέντε διαφορετικά τμήματα κάθε φυτικού είδους. Η πρώτη παρατήρηση που προκύπτει είναι ότι, η αύξηση της συγκέντρωσης Zn στις μεταχειρίσεις οδηγεί σε αντίστοιχη αύξηση της συσσώρευσης Zn σε όλα τα τμήματα και των δυο φυτών. Ενδεικτική είναι η συσχέτιση μεταξύ επεμβάσεων και συσσώρευσης όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.1. Μάλιστα στο βλαστό βάσης του *N. tabacum*, στα φύλλα βάσης και βλαστό κορυφής του *N. glauca* η συσχέτιση είναι στατιστικά σημαντική. Στις επεμβάσεις [Zn2,5] και [Zn5] η συσσώρευση ήταν σημαντικά αυξημένη και στα δυο είδη φυτών σε όλους τους ιστούς (Πίνακας 3.1). Όσον αφορά το υπέργειο τμήμα σημαντικά υψηλότερη είναι η συγκέντρωση Zn στα φύλλα της βάσης σε σχέση με της κορυφής και στα δυο είδη. Το γεγονός



**Εικόνα 3.1** Συσσωρευση ψευδαργύρου [ $\mu\text{g}/\text{g}$  ξηρού βάρους] στα φυτικά μέρη *N. tabacum* και *N. glauca* υπό την επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων ψευδαργύρου στο υπόστρωμα. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τυπικό σφάλμα 3 επαναλήψεων.

αυτό μπορεί να οφείλεται είτε σε μέτρια κινητικότητα και μεταφορά του Zn μέσα στο φυτό είτε στο μηχανισμό άμυνας του φυτού που επιλέγει να αποθηκεύει τοξικές συγκεντρώσεις στα γηραιότερα τμήματα του, προστατεύοντας έτσι τους νεαρούς ιστούς (Weis and Weis, 2004). Πολύ υψηλές συγκεντρώσεις παρατηρούνται επίσης στις ρίζες των φυτών. Συγκεκριμένα για το *N. tabacum* η συσσώρευση Zn είναι σχεδόν στα ίδια επίπεδα με την αντίστοιχη πολύ υψηλή συσσώρευση που παρατηρείται στα φύλλα της βάσης. Ανάλογο φαινόμενο διαπιστώνεται στο *N. glauca* και μάλιστα η συσσώρευση διαφέρει σημαντικά ακόμα και από αυτήν στα φύλλα βάσης έστω και αν αρχικά στα φυτά μάρτυρες ήταν χαμηλότερη σε σύγκριση με τα φύλλα.

**Πίνακας 3.1** Στατιστική ανάλυση των συγκεντρώσεων Zn στους ιστούς έπειτα από τις πειραματικές μεταχειρίσεις, σε σχέση με τον μάρτυρα. Επίσης συσχέτιση κατά Pearson της συγκέντρωσης των μεταχειρίσεων με την συσσώρευση στα φυτικά μέρη (n=3).

		Φύλλα βάσης	Φύλλα κορυφής	Βλαστός βάσης	Βλαστός κορυφής	Ρίζα
<i>N. tabacum</i>						
	0,5	*	ns	ns	ns	ns
Zn (mM)	2,5	***	***	*	**	***
	5,0	**	***	***	**	**
	Συσχέτιση (R <sup>2</sup> )	0,63	0,83	0,96 *	0,88	0,55
<i>N. glauca</i>						
	0,5	ns	ns	**	**	***
Zn (mM)	2,5	**	***	***	***	***
	5,0	***	***	***	***	***
	Συσχέτιση (R <sup>2</sup> )	0,90*	0,65	0,85	0,90 *	0,67

Σημαντικό όμως σημείο αυτής της εργασίας είναι ο έλεγχος της ικανότητας των συγκεκριμένων φυτών να συσσωρεύει το υπό εξέταση μέταλλο στη βιομάζα τους. Όπως έχει ειπωθεί νωρίτερα, για να χαρακτηριστεί ένα φυτό



ως υπερσυσσωρευτής ψευδαργύρου θα πρέπει να συγκεντρώνει στους ιστούς του πάνω από 10000 ppm του μετάλλου και να παρουσιάζει λόγο συγκέντρωσης υπέργειου προς ρίζα πάνω από 1 (Krämer, 2005; Lasat, 2002). Όπως είναι φανερό από την Εικόνα 3.1 στην παρούσα μελέτη τα εξεταζόμενα είδη φυτών δεν επέδειξαν ανάλογα επίπεδα συγκεντρώσεων στους φυτικούς τους ιστούς ύστερα από έκθεση στο μέταλλο για 6 εβδομάδες και κατά συνέπεια δεν μπορούν να χαρακτηριστούν ως υπερσυσσωρευτές Zn.

Μια συγκριτική αξιολόγηση των δυο φυτών (Πινάκας 3.2) αποκαλύπτει σημαντικά υψηλότερη συσσώρευση στις ρίζες του *N. glauca* σε σχέση με το *N. tabacum* ενώ αντίθετα σημαντικά μεγαλύτερη είναι η συσσώρευση στα φύλλα βάσης του *N. tabacum* συγκριτικά με *N. glauca*. Μια πιθανή εξήγηση για το γεγονός αυτό είναι η καλύτερη κινητικότητα του Zn μέσα στο φυτό του *N. tabacum* είτε παθητικά μέσω της πορείας μεταφοράς νερού, είτε με ενεργητική από το φυτό μεταφορά του μετάλλου στα φύλλα της βάσης ώστε να μη διαταραχτεί η ισορροπία των ριζών από τοξική συγκέντρωση Zn (Broadley et al., 2007; Chaney, 1993).

**Πινάκας 3.2** Σύγκριση συσσώρευσης Zn μεταξύ *N. tabacum* και *N. glauca*.

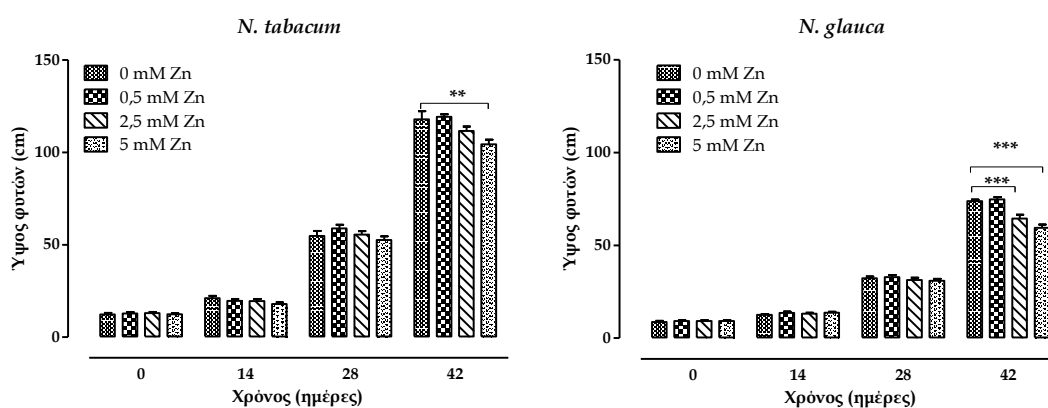
Zn (mM)	Φύλλα βάσης	Φύλλα κορυφής	Βλαστός βάσης	Βλαστός κορυφής	Ρίζα
0,0	ns	ns	ns	ns	ns
0,5	**	ns	ns	ns	**
2,5	***	ns	ns	ns	***
5,0	ns	ns	ns	ns	***

Τα δεδομένα αυτά συμφωνούν αρκετά ικανοποιητικά με ευρήματα άλλων μελετών (Barazani et al., 2004; Wenger et al., 2002) στις περιπτώσεις βεβαία που μπορεί να γίνει σύγκριση. Στην μελέτη των Wenger et al. (2002) έγιναν επεμβάσεις με 0, 50, 150, 350, 750 και 1550 mg ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O ανά kg εδάφους

και έπειτα από 55 ημέρες η συγκέντρωση του Zn ήταν  $124 \pm 11$ ,  $313 \pm 39$ ,  $624 \pm 54$ ,  $1170 \pm 188$ ,  $1780 \pm 315$ ,  $1904 \pm 159$   $\mu\text{g kg}^{-1}$  ξηρού βάρους, αντίστοιχα. Στην ίδια μελέτη τελικά διαπιστώθηκε ότι η αύξηση της συγκέντρωσης Zn στο υπόστρωμα οδηγεί σε μερικώς αύξηση της συσσώρευσης στα φυτά. Ωστόσο η περαιτέρω καταπόνηση των φυτών οδηγεί σε τουλάχιστον υποδιπλασιασμό της παραγόμενης βιομάζας και άρα η απομάκρυνση του ψευδαργύρου από το έδαφος είναι μικρότερη από την αναμενόμενη. Ικανοποιητικές κρίθηκαν οι ποσότητες ψευδαργύρου που κατάφερε να συσσωρεύσει και το *N. glauca* στην εργασία των Barazani et al. (2004) σε ανάλογες μεταχειρίσεις. Από τα βιβλιογραφικά δεδομένα και τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας προκύπτει ως συμπέρασμα ότι τα συγκεκριμένα φυτά αν και δεν παρουσιάζουν ικανότητες υπερσυσσώρευσης Zn, εντούτοις μπορούν να χρησιμοποιηθούν με πολύ καλά αποτελέσματα σε εφαρμογές φυτοαποκατάστασης. Αυτό οφείλεται στο γεγονός της καλής ανοχής τους σε εδάφη χωρίς υπερβολική ρύπανση Zn, της ικανοποιητικής απορρόφησης του μετάλλου, σε συνδυασμό με την πλούσια βιομάζα και τη γρήγορη ανάπτυξη.

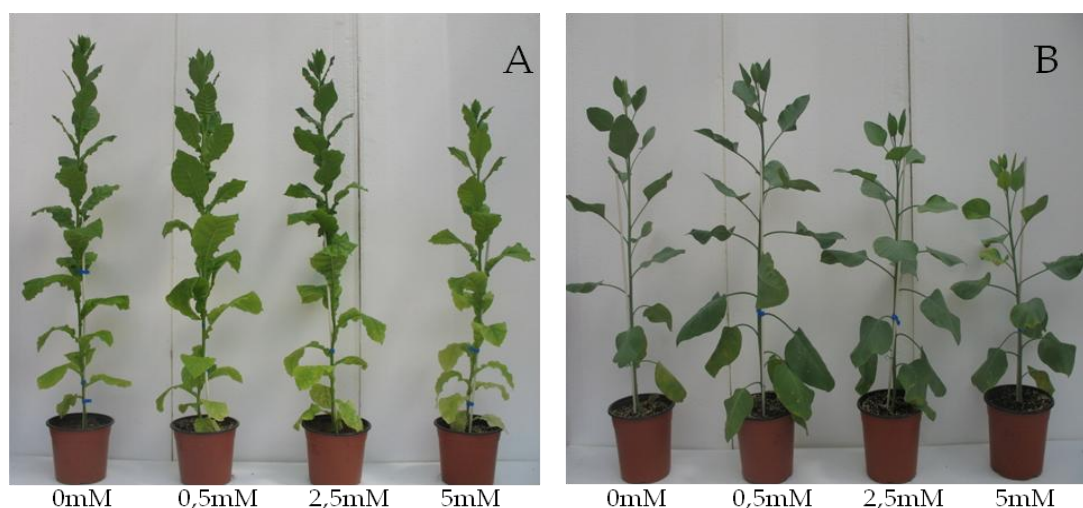
### 3.1.2 Επίδραση ψευδαργύρου στα μορφολογικά χαρακτηριστικά των φυτικών ειδών *N. tabacum* και *N. glauca*

Μέχρι την 4<sup>η</sup> εβδομάδα από την εφαρμογή του Zn στα φυτά δεν παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη διαφοροποίηση του ύψους των φυτών *N. tabacum* και *N. glauca* σε σχέση με τα φυτά μάρτυρες (Εικόνα 3.2). Αντίθετα, στο τέλος του πειράματος και στα δυο είδη τα ύψη διέφεραν σημαντικά στα φυτά με την υψηλότερη συγκέντρωση Zn ( $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$  για το *N. tabacum* και *N. glauca* αντίστοιχα). Εξίσου σημαντικά επηρεάστηκε και το ύψος των φυτών του *N. glauca* με την συγκέντρωση 2,5 mM Zn ( $p < 0,001$ ). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η επέμβαση 0,5 mM Zn δεν επηρέασε καθόλου την ανάπτυξη των φυτών, ίσως λόγω της μικρής τοξικότητας του Zn.



**Εικόνα 3.2** Μεταβολή του ύψους των φυτών κατά τη διάρκεια του πειράματος (έναρξη, 14, 28, 42 ημέρες) στις διαφορετικές συγκεντρώσεις ψευδαργύρου και στα δυο φυτικά είδη. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τυπικό σφάλμα 12 επαναλήψεων.

Στην Εικόνα 3.3 φαίνεται ένα φυτό από κάθε επέμβαση και από τα δυο είδη πριν την απεγκατάσταση του πειράματος. Είναι αντιληπτές οι διαφορές στην ανάπτυξη που περιγράφηκαν παραπάνω καθώς και ορισμένα φαινόμενα τοξικότητας στα φύλλα. Αναλυτικότερα δεδομένα για τα φαινόμενα αυτά παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.3 και στην Εικόνα 3.4.



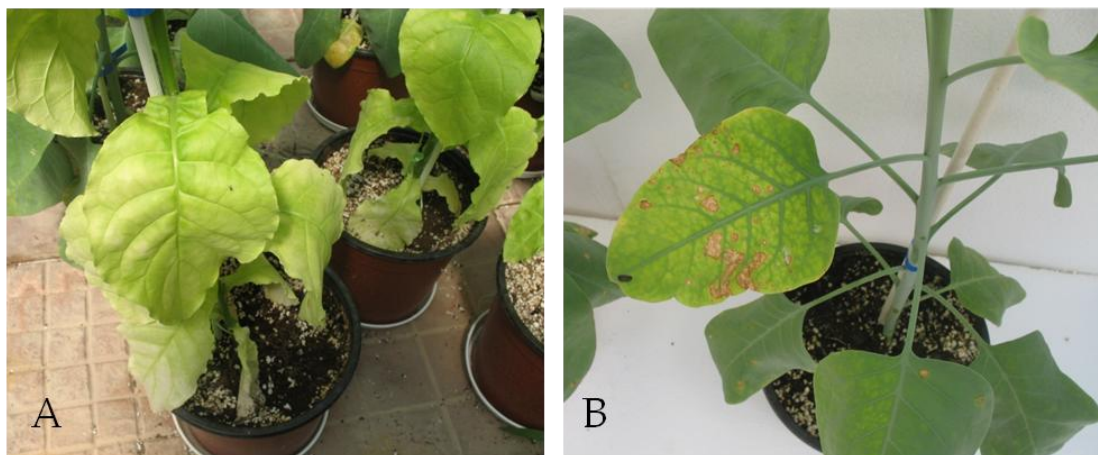
**Εικόνα 3.3** Τυχαία επιλεγμένα φυτά των τεσσάρων επεμβάσεων ψευδαργύρου (Zn) στο τέλος του πειράματος. A: *N. tabacum* και B: *N. glauca*.

Αν εξεταστεί κάθε είδος χωριστά παρατηρείται ένα μόνο σύμπτωμα τοξικότητας στο *N. tabacum*, αυτό της χλώρωσης και μάλιστα όσο αυξάνεται η συγκέντρωση ψευδαργύρου τόσο το σύμπτωμα γίνεται εντονότερο στα φύλλα βάσης, εμφανίζεται όμως και στα ανώτερα προς την κορυφή φύλλα. Η χλώρωση έξαλλου αποτελεί την πρώτη ένδειξη τοξικότητας Zn στα φυτά (Reichman, 2002), ενώ σε προχωρημένες καταστάσεις καταπόνησης παρουσιάζονται νεκρωτικές κηλίδες και μεσονεύρια χλώρωση που οδηγούν τελικά στην καταστροφή του φύλλου (Chaney, 1993; Reichman, 2002). Αντίθετα, στο *N. glauca* παρατηρηθήκαν φαινόμενα μεσονεύριας χλώρωσης στα νεαρότερα φύλλα γεγονός που μπορεί να υποδηλώνει έλλειψη μικροστοιχείων λόγω ανταγωνιστικής δράσης του Zn με άλλα μέταλλα (Fe, Mg) που συμμετέχουν σε βιοχημικά μονοπάτια της φωτοσύνθεσης και αναλύονται στην Παράγραφο 3.1.3.

**Πίνακας 3.3** Μακροσκοπικά συμπτώματα (ως προς το πλήθος και την ένταση) που παρουσιάστηκαν στα φυτά 7 εβδομάδες μετά την εφαρμογή των επεμβάσεων.

Τμήμα φυτού	Επεμβάσεις Ψευδαργύρου			
	0mM	0,5mM	2,5mM	5mM
<i>N. tabacum</i>				
κορυφή	-	-	-	-
μέση πάνω	-	-	X1	X1
μέση κάτω	-	X1	X2	X2
βάση	X1	X1	X2	X3
<i>N. glauca</i>				
κορυφή	-	-	MX1	MX3
μέση πάνω	-	-	-	MX1, NK2
μέση κάτω	-	-	-	MX1, NK1
βάση	-	-	-	-

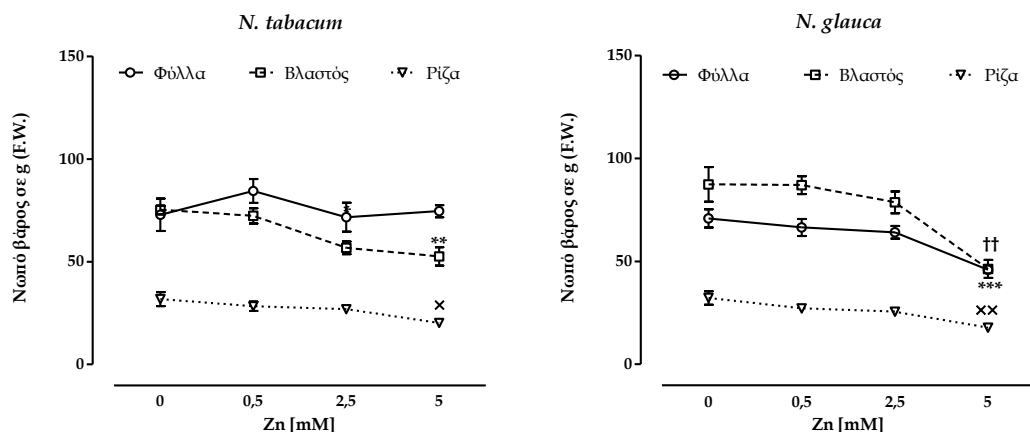
X: χλώρωση, MX: μεσονεύρια χλώρωση, NK: νεκρωτικές κηλίδες,  
1,2,3 : ένταση συμπτώματος



**Εικόνα 3.4** Χαρακτηριστικά συμπτώματα τοξικότητας στα φύλλα υπό την επίδραση 5mM Zn. A: χλώρωση φύλλων στο *N. tabacum* και B: μεσονεύρια χλώρωση και νεκρωτικές κηλίδες στα φύλλα του *N. glauca*.

Ένα επιπλέον χαρακτηριστικό της ανάπτυξης των φυτών που μετρήθηκε είναι η νωπή βιομάζα των φύλλων, του βλαστού και της ρίζας. Η μέτρηση έγινε σε πέντε τυχαία φυτά ανά επέμβαση κατά την απεγκατάσταση του πειράματος και τα δεδομένα παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.5. Σε γενικές γραμμές δεν παρατηρήθηκε σημαντική διάφορα στη βιομάζα στις επεμβάσεις με την χαμηλότερη συγκέντρωση Zn, σε κανένα από τα δυο φυτικά είδη. Αντίθετα, σημαντική μείωση της βιομάζας παρατηρήθηκε στην υψηλή συγκέντρωση Zn και ειδικότερα στο *N. glauca* οπου επηρεάστηκαν συνολικά και τα τρία εξεταζόμενα τμήματα (φύλλα, βλαστός, ρίζα).

Είναι κατανοητό ότι η βιομάζα έχει άμεσο ρόλο στην τελική ποσότητα Zn που θα απομακρυνθεί από το έδαφος και πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπόψη. Σε ανάλογη μελέτη (Wenger et al., 2002) η αύξηση της συσσώρευσης Zn ως αποτέλεσμα της αύξησης της συγκέντρωσης Zn στο υπόστρωμα δεν οδηγεί απαραίτητα σε ανάλογη αύξηση της ποσότητας του Zn που εξάγεται από το έδαφος λόγω ταυτόχρονης μείωσης της βιομάζας. Το γεγονός αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία στις περιπτώσεις φυτών μη-υπερσωρευτών αφού η αποδοτικότητά τους εξαρτάται πρωτίστως από την μεγάλη τους βιομάζα (Alloway, 1995; Brown et al., 1995).



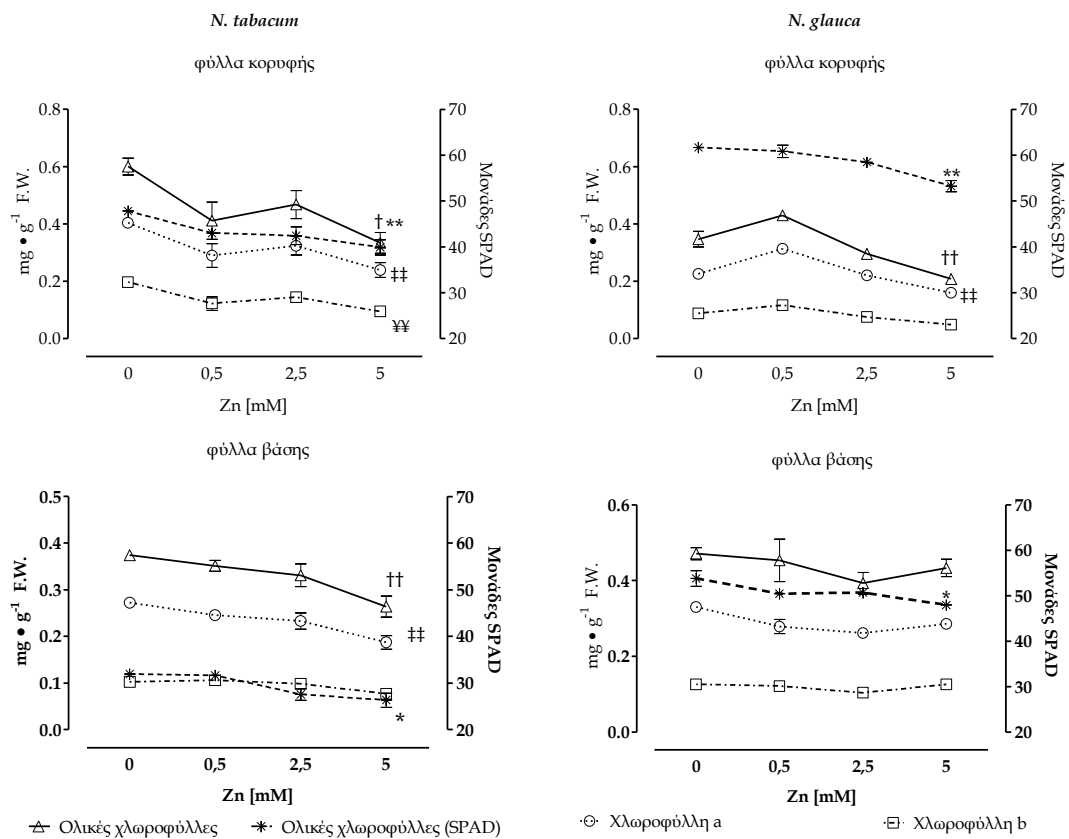
**Εικόνα 3.5** Βιομάζα (νωπό βάρος) ανά τμήμα φυτού (φύλλα, βλαστός, ριζά) σε σχέση με τις διαφορετικές επεμβάσεις ψευδαργύρου. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τυπικό σφάλμα 5 επαναλήψεων.

### 3.1.3 Επίδραση ψευδαργύρου (Zn) σε παραμέτρους της φωτοσύνθεσης

Η φωτοσύνθεση είναι μια λειτουργία που συχνά επηρεάζεται αρνητικά από παράγοντες καταπόνησης όπως τα βαρέα μέταλλα. Τα μέταλλα αντικαθιστούν το ιόν του μαγνησίου από το μόριο της χλωροφύλλης, το οποίο καθίσταται μη λειτουργικό, προκαλώντας βλάβες στη φωτοσυνθετική λειτουργία (Kürper et al., 1996). Η αντικατάσταση του S στις SH-ομάδες από τα μεταλλικά ιόντα πιστεύεται πως ευθύνεται για την αναστολή της δραστηριότητας ορισμένων ενζύμων, τα οποία συμμετέχουν στην σύνθεση της χλωροφύλλης και στον κύκλο του Calvin (Kürper et al., 1996).

Τα όρια συγκέντρωσης του ψευδαργύρου, για να γίνουν ορατά συμπτώματα που σχετίζονται με τη φωτοσύνθεση, είναι συνήθως πάνω από 300 mg Zn kg<sup>-1</sup> ξηρού βάρους φύλλων (Broadley et al., 2007). Βεβαίως, αρκετές φορές, τα όρια αυτά μπορεί να είναι εξαιρετικά μεταβλητά, ακόμη και εντός του ίδιου είδους. Η χλώρωση είναι το πιο χαρακτηριστικό σύμπτωμα τοξικότητας Zn στα φύλλα. Προκαλείται κυρίως λόγω μειωμένης σύνθεσης χλωροφύλλης (από ανεπάρκεια Fe), αλλοίωση της δομής των θυλακοειδών μεμβρανών των

χλωροπλαστών, και παρεμβολής του Zn με P, Mg και Mn (Broadley et al., 2007; Chaney, 1993; Reichman, 2002). Όσον αφορά τις φωτοσυνθετικές χρωστικές, μελέτες έχουν δείξει ότι κατά κανόνα η παρουσία τοξικών συγκεντρώσεων Zn προκαλεί μείωση των χλωροφυλλών, αλλά όχι πάντα. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στην ανθεκτικότητα ή όχι κάποιων ειδών στον Zn, στις φυσικοχημικές ιδιότητες του εδάφους κ.α (Reichman, 2002; Shi and Cai, 2009; Vaillant et al., 2005).



**Εικόνα 3.6** Μεταβολή της συγκέντρωσης των φωτοσυνθετικών χρωστικών (χλωροφύλλη a, χλωροφύλλη b, και ολικών χλωροφυλλών) στα φύλλα της βάσης και της κορυφής των φυτών *N. tabacum* και *N. glauca*. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τυπικό σφάλμα 3 επαναλήψεων. Για τις μονάδες SPAD n=12.

Στην παρούσα μελέτη, το περιεχόμενο των φωτοσυνθετικών χρωστικών βρέθηκε να επηρεάζεται αρνητικά από την παρουσία του ψευδαργύρου,

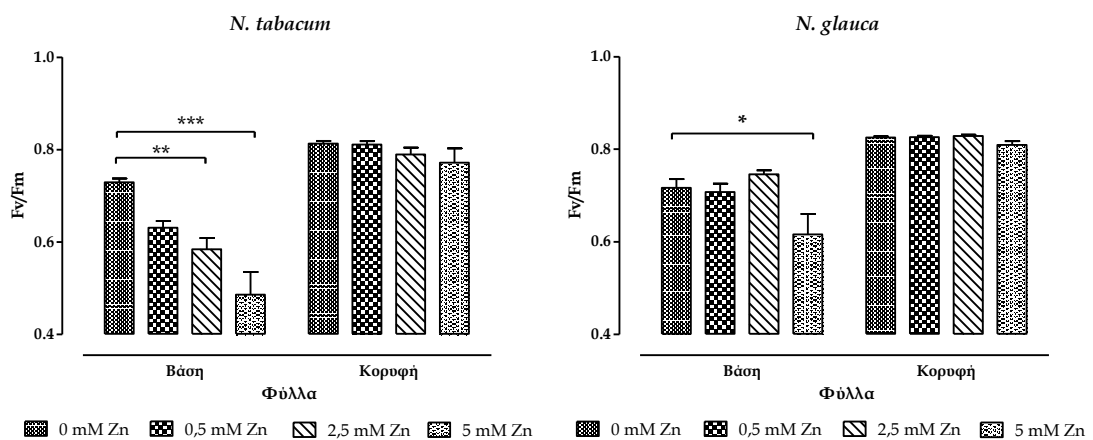
περισσότερο στο *N. tabacum* και λιγότερο στο *N. glauca*. Όσον αφορά το *N. tabacum* παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της χλωροφύλλης *a* και των ολικών χλωροφυλλών στα φύλλα βάσης και κορυφής ενώ της χλωροφύλλης *b* μόνο στα φύλλα κορυφής. Οι μετρήσεις αυτές επιβεβαιώνουν τις οπτικές παρατηρήσεις όπως παρουσιάστηκαν στις Εικόνα 3.5 και στον Πινάκα 3.1, καθώς συνδέονται άμεσα τα έντονα φαινόμενα χλώρωσης με την μείωση της ποσότητας των χλωροφυλλών. Κατ' αντιστοιχία η έλλειψη συμπτωμάτων τοξικότητας στα φύλλα βάσης του *N. glauca* συμφωνεί με την ανεπιηρέαστη ποσότητα φωτοσυνθετικών ουσιών στο ίδιο τμήμα, σε αντίθεση με την μείωση της χλωροφύλλης *a* και των ολικών χλωροφυλλών στην κορυφή, όπου και παρατηρήθηκαν φαινόμενα τοξικότητας στο έλασμα των φύλλων. Ωστόσο η οποιαδήποτε διαφοροποίηση στο περιεχόμενο των φωτοσυνθετικών χρωστικών δεν σημαίνει κατ' ανάγκη και ανάλογη διαφοροποίηση στον ευρύτερο μηχανισμό της φωτοσύνθεσης.

Είναι γνωστό ότι ο χλωροφυλλικός φθορισμός μπορεί να λειτουργήσει ως δείκτης της φωτοσυνθετικής αποτελεσματικότητας. Η χλωροφύλλη αποτελεί τον κύριο χρωστικό υποδοχέα, ο οποίος διοχετεύει την απορροφηθείσα φωτονική ενέργεια στα κέντρα αντιδράσεων όπου λαμβάνει χώρα η φωτοχημική μετατροπή της ενέργειας. Στη συνέχεια, λαμβάνουν χώρα τρεις εναλλακτικές λειτουργίες, οι τιμές των οποίων έχουν άθροισμα σταθερό. Η φωτοσύνθεση, η παραγωγή θερμότητας, που είναι ένα είδος «απώλειας» ενέργειας, και ο χλωροφυλλικός φθορισμός. Η μέγιστη απόδοση του φωτοσυστήματος  $\Pi$  (λόγος του μεταβλητού προς το μέγιστο φθορισμό  $F_v/F_m$ ) αποτελεί μία καλή ένδειξη φωτοανασταλτικών βλαβών, που μπορούν να προέρχονται από περιβαλλοντικές καταπονήσεις. Οι άριστες τιμές του  $F_v/F_m$  κυμαίνονται περί το 0,83 με φυσιολογικό εύρος τιμών από 0,75 έως 0,85 (Maxwell and Johnson, 2000).

Στην Εικόνα 3.7 παρουσιάζονται οι τιμές που μετρήθηκαν στην παρούσα εργασία. Αναλυτικά για το *N. tabacum* παρατηρείται σημαντική μείωση του



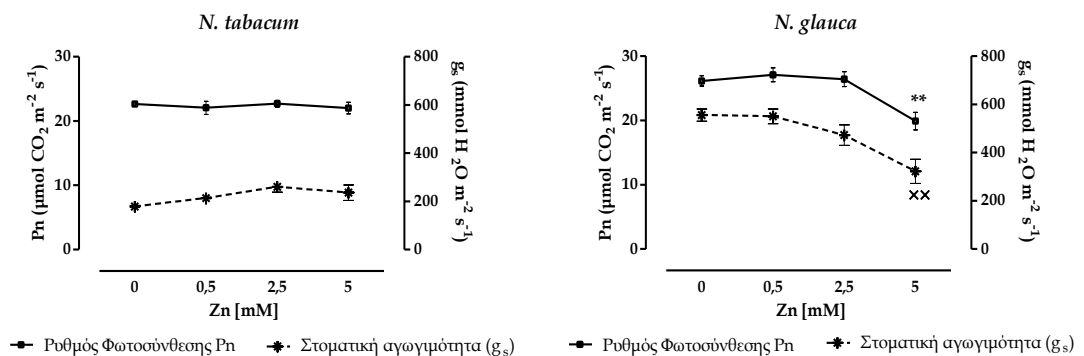
λόγου Fv/Fm στα φύλλα της βάσης όσο αυξάνεται η συγκέντρωση Zn της επέμβασης και μάλιστα και στις τρεις επεμβάσεις οι τιμές είναι χαμηλότερες από το εύρος των φυσιολογικών τιμών. Αντίθετα, στα φύλλα της κορυφής, αν και παρατηρείται ελαφρά τάση μείωσης του λόγου Fv/Fm, εντούτοις όμως δεν θεωρείται σημαντική. Μια πιθανή εξήγηση που μπορεί να δοθεί για το γεγονός αυτό είναι η κατά πολύ μικρότερη συσσώρευση Zn που παρατηρείται στα φύλλα της κορυφής (Εικόνα 3.1), αλλά και ο μικρότερος χρόνος επίδρασης του Zn στους ιστούς. Όσον αφορά το *N. glauca* παρατηρείται σημαντική μείωση του λόγου μόνο στην επέμβαση [Zn5]. Αν γίνει ταυτόχρονη αξιολόγηση και σύγκριση των δυο φυτών, ως προς την σημαντική ή όχι μείωση του λόγου Fv/Fm στα φύλλα, διακρίνεται ένα όριο (cutoff) στην συσσώρευση Zn περίπου, στα 400  $\mu\text{g Zn g}^{-1}$  που πέραν αυτής υπάρχει σαφής επίδραση του Zn στη λειτουργία του φωτοσυστήματος II.



**Εικόνα 3.7** Μέγιστη απόδοση του φωτοσυστήματος II (Fv/Fm) στα φύλλα βάσης και κορυφής φυτών *N. tabacum* και *N. glauca*, υπό διαφορετικές συγκεντρώσεις ψευδαργύρου στο υπόστρωμα. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τυπικό σφάλμα 12 επαναλήψεων. Οι μετρήσεις αφορούν την λήξη του πειράματος.

Η λειτουργία της φωτοσύνθεσης είναι αρκετά πολύπλοκη και μεταβάλλεται ποικιλοτρόπως από τα βαρέα μέταλλα, άμεσα ή έμμεσα. Για παράδειγμα, το προκαλούμενο από τα μέταλλα υδατικό στρες και η έλλειψη του

απαραίτητου υποστρώματος της φωτοσύνθεσης ( $\text{CO}_2$ ), λόγω κλεισίματος των στομάτων, συμβάλουν στην αναστολή της αφομοιωτικής λειτουργίας. Είναι λοιπόν απαραίτητο η επίδραση των μετάλλων στην φωτοσύνθεση να μελετηθεί ταυτόχρονα και με άλλες παράλληλες λειτουργίες και φαινόμενα που σχετίζονται με την ανταλλαγή αερίων στη στοματική συσκευή. Η μεταβολή της στοματικής αγωγιμότητας πιστεύεται ότι αποτελεί μία από τις πρώτες αντιδράσεις των φυτών στα μέταλλα (Moustakas et al., 1997; Poschenrieder and Barcelo, 2004; Seregin and Ivanov, 2001). Ίσως αυτός να είναι ο λόγος που ενώ δεν παρατηρείται βλάβη στο φωτοσύνθημα II (Εικόνα 3.7) στα φύλλα της κορυφής του *N. glauca*, εντούτοις ο ρυθμός φωτοσύνθεσης είναι σημαντικά μειωμένος στην επέμβαση [Zn5] (Εικόνα 3.8).



**Εικόνα 3.8** Μεταβολή του ρυθμού φωτοσύνθεσης (Pn) και της στοματικής αγωγιμότητας (gs) των φύλλων φυτών *N. tabacum* και *N. glauca*, υπό διαφορετικές συγκεντρώσεις ψευδαργύρου στο υπόστρωμα. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τυπικό σφάλμα 12 επαναλήψεων. Οι μετρήσεις αφορούν την λήξη του πειράματος

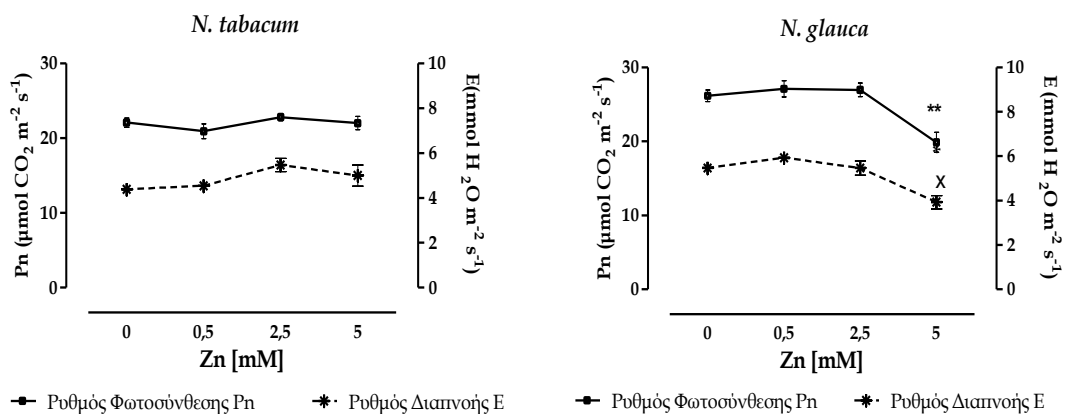
Μάλιστα, όπως φαίνεται από το ίδιο γράφημα, η ανάσχεση του φωτοσυνθετικού ρυθμού συνδέεται άμεσα με την μείωση της στοματικής αγωγιμότητας, ενώ ταυτόχρονα στο *N. tabacum* δεν παρατηρείται ανάλογη μεταβολή στη στοματική αγωγιμότητα και στην φωτοσύνθεση. Η στοματική αγωγιμότητα μειώνεται υπό την επίδραση των μετάλλων εξαιτίας, είτε της άμεσης επίδρασής τους σε επίπεδο καταφρακτικών κυττάρων, είτε μέσω της

τοξικής δράσης τους σε διάφορους φυτικούς ιστούς, με αποτέλεσμα τη μείωση της διαθεσιμότητας του νερού στα φύλλα και τελικά τη μειωμένη ικανότητα στοματικής ρύθμισης. Η μεταβολή της ροής νερού διαμέσου των καταφρακτικών κυττάρων μπορεί να πραγματοποιηθεί από τη δράση των μετάλλων είτε επί των υδατικών καναλιών είτε επί των καναλιών ιόντων (Yang et al., 2004). Επιπροσθέτως, η υψηλή συγκέντρωση βαρέων μετάλλων έχει διαπιστωθεί ότι προκαλεί αύξηση της παραγωγής αμπισοικού οξέως ABA (Seregin and Ivanov, 2001), το οποίο ως γνωστόν προκαλεί κλείσιμο των στομάτων.

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, είναι σαφής η επίδραση της στοματικής αγωγιμότητας στη διαμόρφωση του ρυθμού φωτοσύνθεσης. Θα πρέπει, όμως, πάντα να λαμβάνεται υπόψη ότι η στοματική συσκευή αποτελεί το μονοπάτι διαμέσου του οποίου πραγματοποιείται αμφίδρομη ροή μάζας αερίων, δεδομένου ότι ρυθμίζει τις ποσότητες των αερίων φάσεων, τόσο του  $H_2O$  που θα εξέλθει (διαπνοή), όσο και του  $CO_2$  που θα εισέλθει (φωτοσύνθεση). Η ποσότητα του διαπνεόμενου  $H_2O$  είναι ευθέως ανάλογη προς τη διαφορά συγκέντρωσης των υδρατμών, που τείνει να μειώνεται από τον εσωτερικό μεσοκυττάριο χώρο του φύλλου προς την ατμόσφαιρα.

Κατά τον ίδιο τρόπο, η ποσότητα πρόσληψης του  $CO_2$  είναι ευθέως ανάλογη προς τη διαφορά συγκέντρωσης του  $CO_2$ , που τείνει να μειώνεται από τον εξωτερικό προς τον εσωτερικό χώρο (θέσεις καρβοξυλίωσης του  $CO_2$ ). Η διαφορά ανάμεσα στην τιμή της ολικής αγωγιμότητας της ροής του  $CO_2$  και αυτής της ροής της αέριας φάσης του  $H_2O$  καθορίζει ποσοτικά την είσοδο του  $CO_2$  και την έξοδο του  $H_2O$  και αντανακλά, κυρίως, τη διαφορά μεταξύ των συντελεστών διάχυσης του  $CO_2$  και του  $H_2O$  (Jones, 1998; Jones, 2004). Επειδή ένα μεγάλο μέρος της διαδρομής του  $CO_2$  και των υδρατμών είναι κοινό, η διαπνοή μπορεί να θεωρηθεί ότι συνήθως λαμβάνει χώρα παράλληλα και ταυτόχρονα με τη φωτοσύνθεση. Εντούτοις, το διαφορικό διάχυσης που προκαλεί την απώλεια νερού είναι πολύ μεγαλύτερο (έως 50 φορές) από το

αντίστοιχο που προκαλεί την πρόσληψη του CO<sub>2</sub>. Επομένως, μία αύξηση της στοματικής αγωγιμότητας που ευνοεί τη διάχυση του CO<sub>2</sub> το οποίο εισέρχεται στο μεσόφυλλο ως τις θέσεις καρβοξυλίωσης αναπόφευκτα οδηγεί σε μεγάλη αύξηση των διαπνευστικών απωλειών (Chaves et al., 2004). Το κλείσιμο ή το άνοιγμα της στοματικής συσκευής θα έχει, επομένως, αντιφατικές συνέπειες πάνω σε δύο ουσιώδεις φυσιολογικές λειτουργίες του φυτού, τη διαπνοή και τη φωτοσύνθεση, και στην εν γένει παραγωγική αποτελεσματικότητα του φυτού. Προφανώς προκύπτει θέμα αριστοποίησης της λειτουργίας της στοματικής συσκευής ώστε να επιτυγχάνεται η μέγιστη αφομοίωση και η ελάχιστη διαπνοή.



**Εικόνα 3.9** Μεταβολή του ρυθμού φωτοσύνθεσης (Pn) και του ρυθμού διαπνοής των φύλλων κορυφής φυτών *N. tabacum* και *N. glauca*, υπό διαφορετικές συγκεντρώσεις ψευδαργύρου στο υπόστρωμα. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι ± τυπικό σφάλμα 12 επαναλήψεων. Οι μετρήσεις αφορούν την λήξη του πειράματος.

Η θεωρία αριστοποίησης του στοματικού ανοίγματος προβλέπει ότι το άνοιγμα των στομάτων μεταβάλλεται μέσα στην ημέρα, προκειμένου να επιτευχθεί η ελάχιστη απώλεια νερού με το μέγιστο κέρδος σε CO<sub>2</sub> (Bacon, 2004). Μολονότι οποιαδήποτε αύξηση στη στοματική αγωγιμότητα προκαλεί μία αναλογικά μεγαλύτερη αύξηση στη διαπνοή σε σχέση με την αφομοίωση του CO<sub>2</sub>, η θεωρία αριστοποίησης προβλέπει ότι μία τέτοια μεταβολή θα

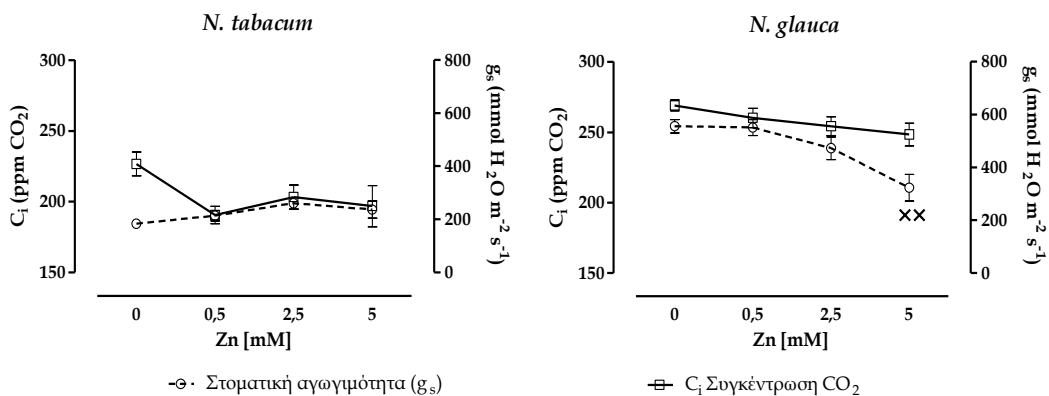
διατηρήσει τις αλλαγές στο ρυθμό διαπνοής και αφομοίωσης σταθερές, διατηρώντας την αποτελεσματικότητα χρησιμοποίησης του νερού (Bacon, 2004). Σήμερα πιστεύεται ότι η οικονομικότερη χρήση CO<sub>2</sub> σε σχέση με την απώλεια του νερού επιτυγχάνεται όταν τα στόματα λειτουργούν με τρόπο ώστε ο λόγος να παραμένει σταθερός καθ' όλη τη διάρκεια της ημέρας (Jones, 2004).

Εξ ορισμού, η μείωση της στοματικής αγωγιμότητα ασκεί περιορισμό στη διάχυση του CO<sub>2</sub> προς την υποστοματική κοιλότητα. Συνεπώς, το ερώτημα που εγείρεται είναι κατά πόσο η φωτοσυνθετική αποτελεσματικότητα σε αυτές τις περιπτώσεις μεταβάλλεται, συνεργία του υδατικού δυναμικού και μιας σειράς ανατομικών και βιοφυσικών μηχανισμών. Σε γενικές γραμμές θεωρείται ότι οι φωτοσυνθετικές παράμετροι δεν επηρεάζονται ιδιαίτερα από την υδατική καταπόνηση μέχρις ότου η διαθεσιμότητα του νερού αποκτήσει αρκετά χαμηλές τιμές. Ο ρυθμός αφομοίωσης είναι δυνατόν να μειωθεί υπό μέτρια υδατική καταπόνηση ή ακόμα και πριν να εμφανιστεί κάποια μεταβολή στην υδατική κατάσταση του φύλλου. Στις περιπτώσεις αυτές, ο στοματικός έλεγχος της διάχυσης του CO<sub>2</sub> προς το εσωτερικό του φύλλου παίζει τον σημαντικότερο ρόλο στο ρυθμό φωτοσύνθεσης, καθώς η μείωση του τελευταίου, υπό συνθήκες καταπόνησης, οφείλεται στη μικρότερη παροχή CO<sub>2</sub> προς την RuBP ή την PEP καρβοξυλάση, εξαιτίας του κλεισίματος των στομάτων (Cifre et al., 2005; Ohashi et al., 2006; Pagter et al., 2005; Silva and Arrabaça, 2004). Καθίσταται, λοιπόν, σαφές ότι η συμπεριφορά των στομάτων επηρεάζει τη συγκέντρωση του CO<sub>2</sub> μέσα στο φύλλο. Η μείωση, επομένως, της συγκέντρωσης του CO<sub>2</sub> στην υποστοματική κοιλότητα μπορεί να φανερώσει την ύπαρξη στοματικών περιορισμών της φωτοσύνθεσης (Chartzoulakis et al., 2002).

Για να εξακριβωθεί αν ισχύει ο προαναφερθείς περιορισμός στα δυο υπό εξέταση φυτικά είδη, εξετάστηκε η μεταβολή της εσωτερικής συγκέντρωσης του CO<sub>2</sub> (C<sub>i</sub>). Η συγκέντρωση του CO<sub>2</sub> παραμένει σχετικά σταθερή κάτω από

την επίδραση της ενδογενούς αύξησης της [Zn]. Ακριβέστερα στο *N. glauca* ενώ υπάρχει σημαντική πτώση της στοματικής αγωγιμότητας στην επέμβαση [Zn5] ταυτόχρονα εμφανίζεται μια μικρή μείωση της συγκέντρωσης του CO<sub>2</sub> στην υποστοματική κοιλότητα (Εικόνα 3.10) η οποία όμως δεν μπορεί να θεωρηθεί σημαντική και ικανή να δικαιολογήσει την διαπιστωμένη μείωση του ρυθμού φωτοσύνθεσης. Η σταθερότητα αυτή της εσωτερικής συγκέντρωσης του CO<sub>2</sub> στο *N. glauca* πιθανόν καταδεικνύει την ύπαρξη μη στοματικών περιορισμών στην φωτοσύνθεση (Arnau et al., 1997).

Παρά το γεγονός ότι η εκδήλωση μη στοματικών περιορισμών στη διαδικασία της φωτοσύνθεσης έχει αμφισβητηθεί έντονα (Griffiths and Parry, 2002; Pagter et al., 2005), ο αριθμός των μελετών που φανερώνουν την ύπαρξή τους, ιδίως κάτω από συνθήκες έντονης υδατικής καταπόνησης αυξάνεται ολοένα και περισσότερο (Bacelar et al., 2006; Cifre et al., 2005; Silva and Arrabaça, 2004)



**Εικόνα 3.10** Στοματική αγωγιμότητα ( $g_s$ ) και συγκέντρωση CO<sub>2</sub> στους μεσοκυττάριους χώρους ( $C_i$ ) των φύλλων κορυφής και των δυο ειδών υπό την επίδραση των επεμβάσεων ψευδαργύρου. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τυπικό σφάλμα 12 επαναλήψεων. Οι μετρήσεις αφορούν την λήξη του πειράματος.

Στους μη στοματικούς περιορισμούς της φωτοσύνθεσης είναι δυνατό να περιλαμβάνονται αλλαγές στα βιοχημικά χαρακτηριστικά της φωτοσύνθεσης (Pagter et al., 2005), όπως μείωση της δραστηριότητας του κύκλου του Benson-Calvin (Silva and Arrabaça, 2004), μείωση του ρυθμού φωτοφωσφορυλίωσης μέσω της μείωσης της συγκέντρωσης του 3-φωσφορικού εστέρα του γλυκερινικού οξέος (3-PGA) και της αύξησης της συγκέντρωσης του ανόργανου φωσφόρου (Pagter et al., 2005; Silva and Arrabaça, 2004), αναστολή της σύνθεσης αμύλου, μείωση της αναγέννησης της διφωσφορικής ριβουλόζης, μείωση της ποσότητας ή της δραστηριότητας της Rubisco και μείωση της μεταφοράς των ηλεκτρονίων (Pagter et al., 2005).

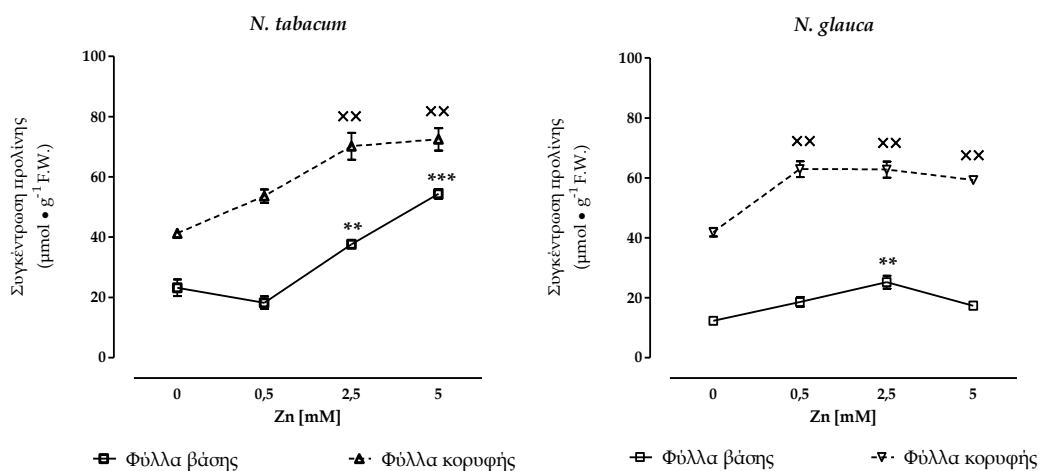
#### **3.1.4 Επίδραση του ψευδαργύρου στον αντιοξειδωτικό μηχανισμό των *N. tabacum* και *N. glauca***

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση του ψευδαργύρου στον αντιοξειδωτικό μηχανισμό των ειδών *N. tabacum* και *N. glauca*, φυτά καλλιεργήθηκαν παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων ψευδαργύρου στο υπόστρωμα καλλιέργειας. Μετά την λήξη του πειράματος προσδιορίστηκαν εργαστηριακά παράμετροι τόσο του μη ενζυμικού όσο και του ενζυμικού αντιοξειδωτικού μηχανισμού.

##### **3.1.4.1 Μη ενζυμικός αντιοξειδωτικός μηχανισμός**

Στις μη ενζυμικές μικρού μοριακού βάρους αντιοξειδωτικές ενώσεις συγκαταλέγεται η προλίνη. Είναι από τους συνηθέστερους συμβατούς οσμωλύτες που συγκεντρώνονται στα φυτά κάτω από συνθήκες καταπόνησης. Συνεισφέρει στην οσμωρύθμιση, στη διατήρηση της ενεργότητας των ενζύμων και άλλων σημαντικών κυτταρικών δομών, θεωρείται ότι εκκαθαρίζει ρίζες υδροξυλίου και ότι είναι αποθήκη άνθρακα

και αζώτου αμέσως μετά την απομάκρυνση της καταπόνησης (Rejskoná et al., 2007; Sharma and Dietz, 2006).



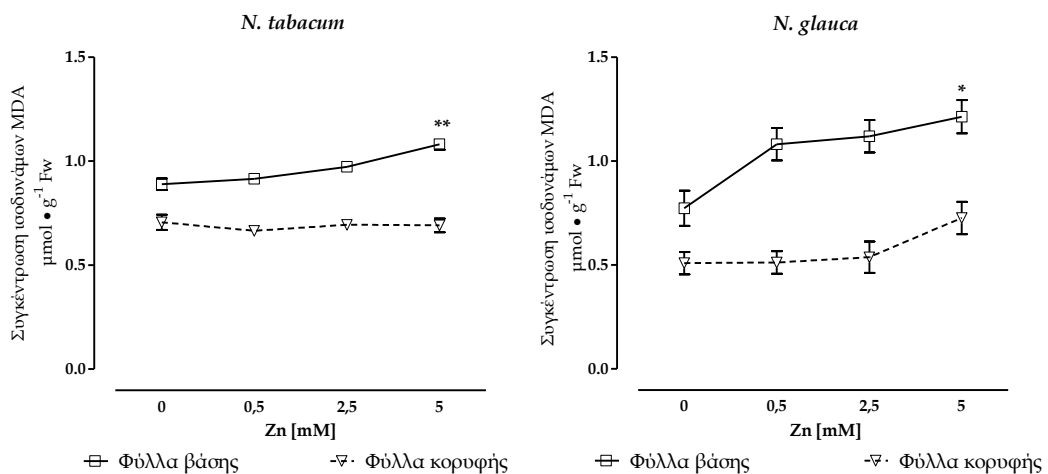
**Εικόνα 3.11** Επίπεδα προλίνης στους ιστούς των φύλλων της βάσης και της κορυφής των φυτών *N. tabacum* και *N. glauca*. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τυπικό σφάλμα 3 επαναλήψεων.

Όπως παρατηρείται στην Εικόνα 3.11 σημειώθηκε σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης της προλίνης, σε σχέση με το μάρτυρα και στα δυο φυτικά είδη, γεγονός που υποδηλώνει την προσπάθεια των φυτών να αντιμετωπίσουν την καταπόνηση που προκαλείται από την αύξηση της συγκέντρωσης του ψευδαργύρου στους ιστούς των φύλλων. Χαρακτηριστική είναι η ικανότητα του *N. tabacum* όπου φαίνεται να αυξάνει σημαντικά τα επίπεδα προλίνης σε όλα τα φύλλα ακόμα και στην επέμβαση [Zn5]. Στο *N. glauca* και συγκεκριμένα στα φύλλα κορυφής οι συγκεντρώσεις προλίνης είναι σημαντικά αυξημένες σε όλες τις επεμβάσεις εν συγκρίσει με τον μάρτυρα. Η αύξηση της προλίνης κορυφώνεται στην επέμβαση [Zn0,5] και μειώνεται ελάχιστα μέχρι την επέμβαση [Zn5]. Παρόμοια τάση παρατηρείται και στα φύλλα βάσης με την κορύφωση της συγκέντρωσης προλίνης στην επέμβαση [Zn2,5]. Αρκετές μελέτες εξάλλου υποδεικνύουν την παραγωγή προλίνης ως αντίδραση των φυτών (Mehta and Gaur, 1999; Ozden et al., 2009; Sharma and Dietz, 2006) στην καταπόνηση που προκαλείται από βαρέα



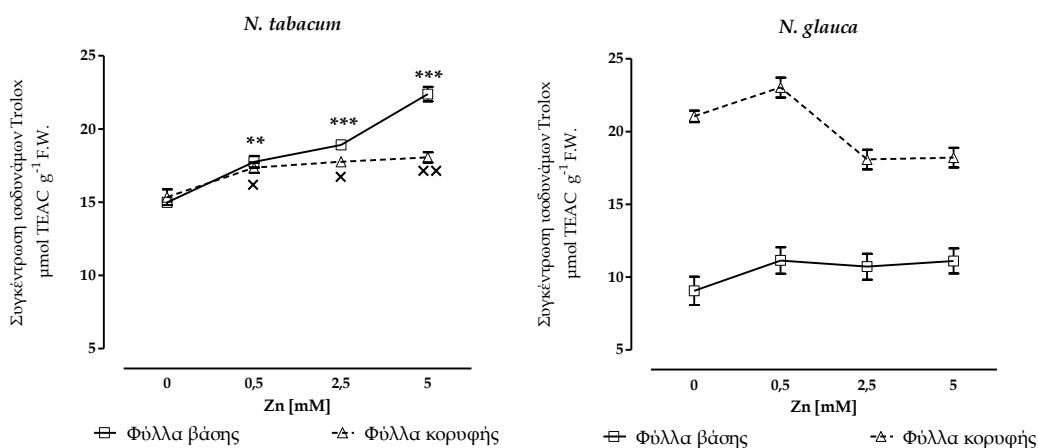
μέταλλα. Όπως έχει αναφερθεί, μεταξύ άλλων η προλίνη δρα προστατευτικά στις μεμβράνες των κυττάρων αφού μπορεί και αποσβένει ρίζες υδροξυλίου που προσβάλλουν τη μεθυλενική ομάδα των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs).

Ως δείκτης υπεροξειδωσης των λιπιδίων των φυτικών ιστών, χρησιμοποιήθηκε η συγκέντρωση ισοδύναμων μαλονδιαλδεϋδης (MDA). Όπως φαίνεται από την Εικόνα 3.12 τα ισοδύναμα MDA αυξήθηκαν σημαντικά στα φύλλα της βάσης με την επέμβαση [Zn5] και στα δυο φυτικά είδη. Πιο πρόωμη λιπιδική υπεροξειδωση παρατηρείται στο *N. glauca* αφού η [MDA] αυξήθηκε κατά 29% στην επέμβαση [Zn0,5] έναντι 3% στο *N. tabacum*. Η ίδια τάση ισχύει και στα φύλλα κορυφής που ενώ στο *N. tabacum*, δεν μεταβάλλεται η [MDA] σε καμία μεταχείριση με τον Zn, στο *N. glauca* η υπεροξειδωση των λιπιδίων είναι κατά 28% μεγαλύτερη στην επέμβαση [Zn5] σε σύγκριση πάντα με τον μάρτυρα. Συνολικά διαπιστώνονται μεγαλύτερες αυξήσεις ισοδύναμων MDA στο *N. glauca* από το *N. tabacum* γεγονός που υποδηλώνει άμεσα και αυξημένο οξειδωτικό στρες, ως συνέπεια της μεγαλύτερης καταστροφής των λιπιδίων.



**Εικόνα 3.12** Εκτίμηση της υπεροξειδωσης των λιπιδίων εκφρασμένη σε ισοδύναμα MDA. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τυπικό σφάλμα 3 επαναλήψεων.

Σαφέστερη εικόνα για τον αντιοξειδωτικό μηχανισμό των φυτών μπορεί να δώσει η μέτρηση του συνολικού περιεχομένου των αντιοξειδωτικών ουσιών εκφραζόμενη σε ισοδύναμα Trolox (TEAC). Τα αποτελέσματα των μετρήσεων όπως δίδονται στην Εικόνα 3.11 φανερώνουν σημαντικές διαφοροποιήσεις του αντιοξειδωτικού μηχανισμού μεταξύ των δυο φυτικών ειδών. Στο *N. tabacum* διαπιστώνεται γραμμική συσχέτιση ( $R^2=0,91$ ) των ισοδυνάμων TEAC με την συγκέντρωση Zn στις επεμβάσεις στα φύλλα της βάσης. Σημαντική είναι η αύξηση των ισοδυνάμων TEAC και στα φύλλα κορυφής, όπου συσχετίζεται αρκετά καλά με την συσσώρευση Zn που ανιχνεύτηκε στα φύλλα αυτά ( $R^2=0,74$ ). Τα στοιχεία αυτά δείχνουν μια πολύ καλή αντίδραση του φυτού απέναντι στη οξειδωτική καταπόνηση που προκαλείται από τον ψευδάργυρο.



**Εικόνα 3.13** Αντιοξειδωτική ικανότητα (ισοδύναμα Trolox) στα φύλλα της βάσης και της κορυφής των φυτών *N. tabacum* και *N. glauca*. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τυπικό σφάλμα 3 επαναλήψεων.

Διαφορετική όμως είναι η εικόνα που παρατηρείται στο *N. glauca*. Τόσο στα φύλλα της βάσης όσο και σε αυτά της κορυφής διαπιστώνεται μια μικρή αύξηση των ισοδυνάμων TEAC στην επέμβαση [Zn0,5] η οποία στη συνέχεια σταθεροποιείται και μειώνεται αντίστοιχα, ακόμα και σε χαμηλότερα επίπεδα από τον μάρτυρα. Είναι λοιπόν ξεκάθαρη η υστέρηση του αντιοξειδωτικού μηχανισμού του *N. glauca* σε σύγκριση με το *N. tabacum*.

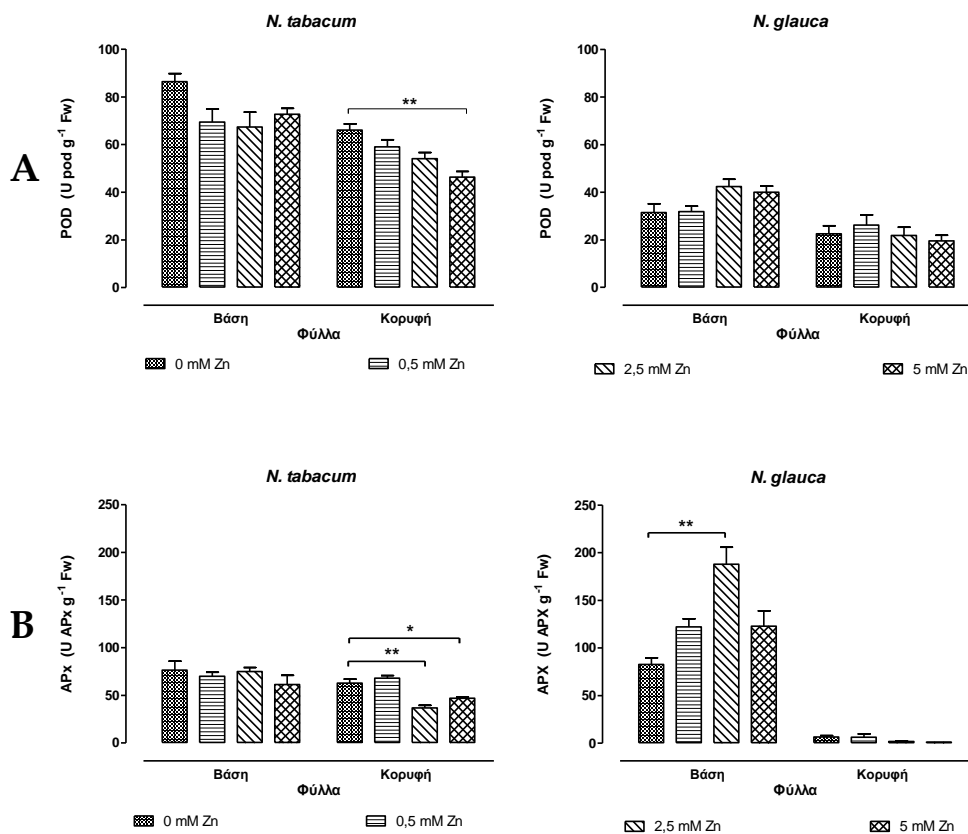
Εντόπωση ωστόσο προκαλεί το περιεχόμενο των ισοδυνάμων TEAC ακόμα και στα φυτά μάρτυρες του *N. glauca* αφού στα φύλλα βάσης βρέθηκαν σε πολύ χαμηλά επίπεδα ενώ στα φύλλα κορυφής πολύ ψηλά και μάλιστα υπερδιπλάσια από τα επίπεδα της βάσης (Εικόνα 3.13).

#### 3.1.4.2 Ενζυμικός αντιοξειδωτικός μηχανισμός

Ως μέρος του αμυντικού συστήματος έναντι στην οξειδωτική καταπόνηση, τα αντιοξειδωτικά ένζυμα είναι στοιχεία κλειδιά του αντιοξειδωτικού μηχανισμού. Αρκετές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί οι οποίες παρουσιάζουν πολλές αλλαγές της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών αυτών ενζύμων στα φυτά υπό συνθήκες καταπόνησης. Η παρουσία όμως των αντιοξειδωτικών ενζύμων δεν προϋποθέτει πάντα κάποια περιβαλλοντική καταπόνηση. Ο σκοπός τους σε τέτοιες περιπτώσεις είναι να διατηρούν τις ROS σε φυσιολογικά επίπεδα, που όπως έχει ειπωθεί παράγονται και υπό φυσιολογικές συνθήκες εξαιτίας αποκλίσεων στην πορεία της μεταφοράς των ηλεκτρονίων. Σε πλειάδα μελετών, έχει αποδειχθεί η επαγωγή των μελετώμενων στην παρούσα εργασία αντιοξειδωτικών ενζύμων σε συνθήκες καταπόνησης από βαρέα μέταλλα. Όμως όσο ο παράγοντας καταπόνησης αυξάνει ή/και η έκθεση στον παράγοντα αυτό παραμένει, η παραγωγή αντιοξειδωτικών ενζύμων είτε εξαντλείται είτε αναστέλλεται μερικώς ή και συνολικά (Cuiyun Chen et al., 2009; Gajewska and Skłodowska, 2007; Zhao et al., 2008).

Οι υπεροξειδάσες έχουν γίνει δεκτές ως «ένζυμα καταπόνησης» και η μέτρηση της δραστηριότητάς τους μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης για την αξιολόγηση της έντασης της καταπόνησης που προέρχεται από τα βαρέα μέταλλα. Στην Εικόνα 3.14 παρουσιάζεται η ενζυμική δραστηριότητα των POD, και APX στους ιστούς των φύλλων υπό την επίδραση της συγκέντρωσης Zn. Στο *N. tabacum* η ενζυμική δραστηριότητα και των δυο

ενζύμων αναστέλλεται με την αύξηση των συγκεντρώσεων Zn στις επεμβάσεις τόσο στα φύλλα κορυφής όσο και σε αυτά της βάσης. Η μεγαλύτερη πτώση της ενζυμικής δραστηριότητας καταγράφεται στα φύλλα της κορυφής στην επέμβαση [Zn5] και συγκεκριμένα 30% για την POD, και 25% για την APX. Οι αντίστοιχες μειώσεις για τα φύλλα της βάσης ήταν 16% για την POD, και 19% για την APX. Μια τέτοια μείωση της δράσης των ενζύμων στους φυτικούς ιστούς υποδεικνύει αδυναμία του ενζυμικού αντιοξειδωτικού μηχανισμού να ανταπεξέλθει στην οξειδωτική καταπόνηση. Το γεγονός αυτό πιθανότατα οφείλεται στην πολύ μεγάλη συσσώρευση του ψευδαργύρου η οποία ξεπερνά κατά πολύ τα ανώτατα όρια τοξικών συγκεντρώσεων αλλά και ο χρόνος έκθεσης των φυτών στο μέταλλο (Cuiyun Chen et al., 2009; Gajewska and Skłodowska, 2007; Zhao et al., 2008).



**Εικόνα 3.14** Ενζυμική δραστηριότητα, A: της υπεροξειδάσης (POD), B: της ασκορβικής υπεροξειδάσης (APX). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τυπικό σφάλμα 3 επαναλήψεων.

Αντίθετα, στο *N. glauca* σημειώθηκε αύξηση στην δραστηριότητα και των δυο ενζύμων στα φύλλα βάσης υποδηλώνοντας την ενεργοποίηση του ενζυμικού αντιοξειδωτικού μηχανισμού. Η διαφορά αυτή μεταξύ των δυο φυτικών ειδών μπορεί να ερμηνευτεί, εκτός από τις διαφορετικές στρατηγικές αυτοπροστασίας που εφαρμόζει το κάθε είδος και από το γεγονός ότι η συσσώρευση Zn στα φύλλα του *N. tabacum* ήταν πολύ μεγαλύτερη από ότι στο *N. glauca* (Εικόνα 3.1). Όσον αφορά την δράση των ενζύμων στα φύλλα κορυφής δεν εντοπίστηκαν διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων για την POD ενώ οι πολύ χαμηλές τιμές της APX δεν επιτρέπουν την ασφαλή αξιολόγηση των μετρήσεων.

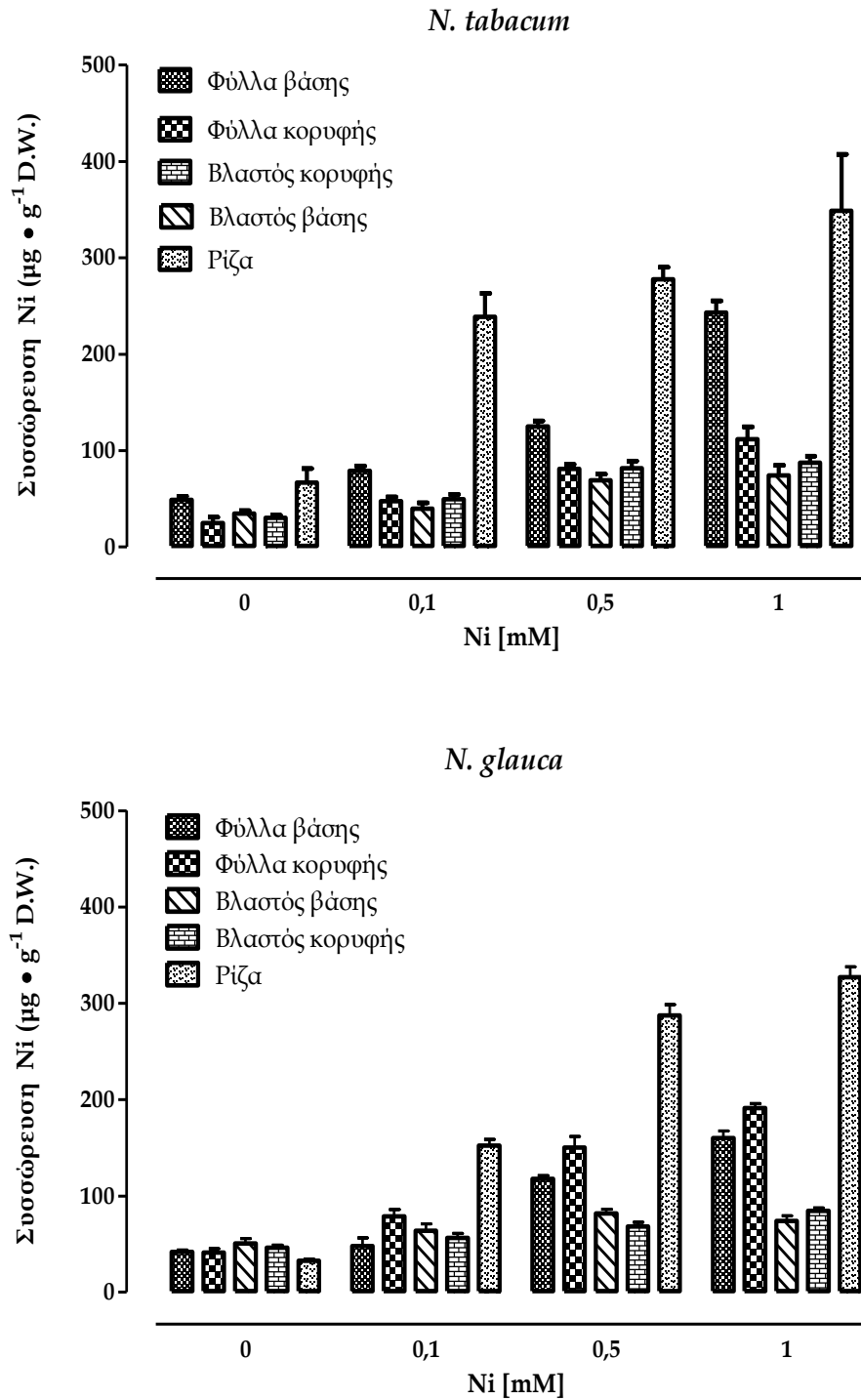
### **3.2 Επίδραση νικελίου στην ανάπτυξη και το μεταβολισμό των *N. tabacum* και *N. glauca***

Το νικέλιο απαντάται σε μία πληθώρα οξειδωτικών μορφών, αλλά μόνο η διοθενής μορφή του ( $Ni^{2+}$ ) είναι σταθερή στις οξειδοαναγωγικές συνθήκες και στο εύρος τιμών pH των εδαφών. Το μέταλλο αυτό θεωρείται σήμερα απαραίτητο ιχνοστοιχείο για την ανάπτυξη των φυτών, ενώ συχνή είναι η εμφάνιση τοξικών συγκεντρώσεων του σε διάφορα περιβάλλοντα (Cuiyun Chen et al., 2009; McGrath, 1995). Τα καλλιεργούμενα εδάφη περιέχουν νικέλιο σε ποσότητα 25  $\mu\text{g/g}$  ξηρού εδάφους κατά μέσο όρο, αν και σε ορισμένα εδάφη, όπως είναι τα προερχόμενα από σερπεντίνη, η συγκέντρωση νικελίου μπορεί να υπερβεί τα 7.000  $\mu\text{g/g}$  (Alloway, 1995). Η συγκέντρωση νικελίου σε φυτά που αναπτύσσονται σε μη ρυπασμένα και μη σερπεντινικά εδάφη είναι, σε γενικές γραμμές, της τάξης των 0,1-15  $\mu\text{g/g}$ . Το νικέλιο θεωρείται στοιχείο μεγάλης κινητικότητας μέσα στο φυτικό οργανισμό και κατά τη διάρκεια της βλαστικής ανάπτυξης των φυτών συγκεντρώνεται σε μεγάλο βαθμό στα φύλλα (McGrath, 1995). Σε γενικές γραμμές όμως πάνω από το 50% της συσσώρευσης νικελίου παραμένει στις ρίζες (Cuiyun Chen et al., 2009; Hadad et al., 2009).

### 3.2.1 Συσσώρευση νικελίου στους φυτικούς ιστούς

Όσον αφορά τη συγκέντρωση του νικελίου στους φυτικούς ιστούς των *N. tabacum*, και *N. glauca*, (Εικόνα 3.14) παρατηρείται αύξηση που αντιστοιχεί στην αύξηση της συγκέντρωσης των επεμβάσεων. Μάλιστα, έπειτα από συσχέτιση επεμβάσεων και συσσώρευσης, προκύπτει γραμμική σχέση των δυο παραγόντων (Πίνακας 3.4). Όπως και στην περίπτωση του Zn, η μεγαλύτερη συσσώρευση Ni παρατηρείται στους ιστούς της ρίζας, ενώ αρκετά σημαντική είναι η συσσώρευση στα φύλλα και των δυο φυτικών ειδών. Η συγκέντρωση νικελίου μάλιστα τόσο στο *N. tabacum* όσο και στο *N. glauca* συχνά υπερβαίνει τα ανώτατα όρια τοξικότητας, που κυμαίνονται μεταξύ 10 και 100  $\mu\text{g/g}$  (Kabata-Pendias, 2000). Όπως φαίνεται από τον Πίνακα 3.4 σημαντικά υψηλότερη σε σχέση με τον μάρτυρα βρέθηκε η συσσώρευση Ni στις επεμβάσεις [Ni0,5], [Ni1] και στα δυο είδη φυτών. Αντίθετα, η μεταχείριση [Ni0,5] δεν επηρέασε την συγκέντρωση νικελίου στους υπέργειους ιστούς παρά μόνο στην ρίζα.

Άξιο σχολιασμού αποτελεί το γεγονός της μεγαλύτερης συγκέντρωσης Ni στα φύλλα κορυφής σε σχέση με τα φύλλα βάσης του *N. glauca*. Η διαφορά αυτή μεταξύ φύλλων βάσης και κορυφής, δεν είναι στατιστικά σημαντική ωστόσο είναι υπαρκτή και στις τρεις μεταχειρίσεις και φαίνεται να συμφωνεί με τα υπόλοιπα ευρήματα του πειράματος (οπτικές παρατηρήσεις και μετρήσεις). Μάλιστα συγκριτική αξιολόγηση των δεδομένων της συσσώρευσης Ni στα δυο φυτικά είδη (Πίνακας 1.5) αποκαλύπτει ότι ενώ παρατηρείται σημαντικά μεγαλύτερη συσσώρευση Ni στα φύλλα βάσης του *N. tabacum* από το *N. glauca*, στην επέμβαση [Ni1], στα φύλλα κορυφής τα αποτελέσματα των μετρήσεων αντιστρέφονται, παρουσιάζοντας σημαντικά μεγαλύτερη συσσώρευση στο *N. glauca*.



**Εικόνα 3.15** Συσώρευση νικελίου [ $\mu\text{g}/\text{g}$  ξηρού βάρους] στα φυτικά μέρη *N. tabacum* και *N. glauca* υπό την επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων νικελίου στο υπόστρωμα. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τυπικό σφάλμα 3 επαναλήψεων

**Πίνακας 3.4** Στατιστική ανάλυση των συγκεντρώσεων Ni στους ιστούς έπειτα από τις πειραματικές μεταχειρίσεις, σε σχέση με τον μάρτυρα. Επίσης συσχέτιση κατά Pearson της συγκέντρωσης των μεταχειρίσεων με την συσσώρευση στους ιστούς (n=3).

		Φύλλα βάσης	Φύλλα κορυφής	Βλαστός βάσης	Βλαστός κορυφής	Ρίζα
<i>N. tabacum</i>						
	0,1	ns	ns	ns	ns	*
Ni (mM)	0,5	**	*	ns	**	*
	1	***	***	*	***	**
Συσχέτιση (R <sup>2</sup> )		0,97*	0,97*	0,87	0,83	0,71
<i>N. glauca</i>						
	0,1	ns	ns	ns	ns	***
Ni (mM)	0,5	***	***	ns	*	***
	1	***	***	ns	**	***
Συσχέτιση (R <sup>2</sup> )		0,96*	0,94*	0,5	0,99**	0,82

Είναι γνωστό ότι για να χαρακτηριστεί ένα φυτό ως υπερσυσσωρευτής νικελίου θα πρέπει να συσσωρεύει στους ιστούς του πάνω από 1000 ppm του μετάλλου και να παρουσιάζει λόγο συγκέντρωσης του μετάλλου στο υπέργειο τμήμα προς τη ρίζα πάνω από 1 (Krämer, 2005; Lasat, 2002). Στην παρούσα μελέτη, όπως είναι φανερό από την Εικόνα 3.15, όπου παρουσιάζεται η συσσώρευση του Ni στους φυτικούς ιστούς ύστερα από καλλιέργεια των φυτών σε ρυπασμένο με το μέταλλο υπόστρωμα, δεν μπορεί να υποστηριχθεί ο χαρακτηρισμός του υπερσυσσωρευτή Ni για τα *N. tabacum* και *N. glauca* αφού οι συγκεντρώσεις του νικελίου ειδικά στο υπέργειο τμήμα ήταν μεν αξιόλογες αλλά μικρότερες από το όριο των 1000 ppm. Εκείνο που μένει ίσως να ελεγχθεί σε μελλοντικές εργασίες είναι το κατά πόσον τα συγκεκριμένα φυτά μπορούν να ανταποκριθούν σε εφαρμογές χημικά υποβοηθούμενης φυτοαποκατάστασης.



**Πίνακας 3.5** Σύγκριση συγκεντρώσεων νικελίου μεταξύ *N. tabacum* και *N. glauca*.

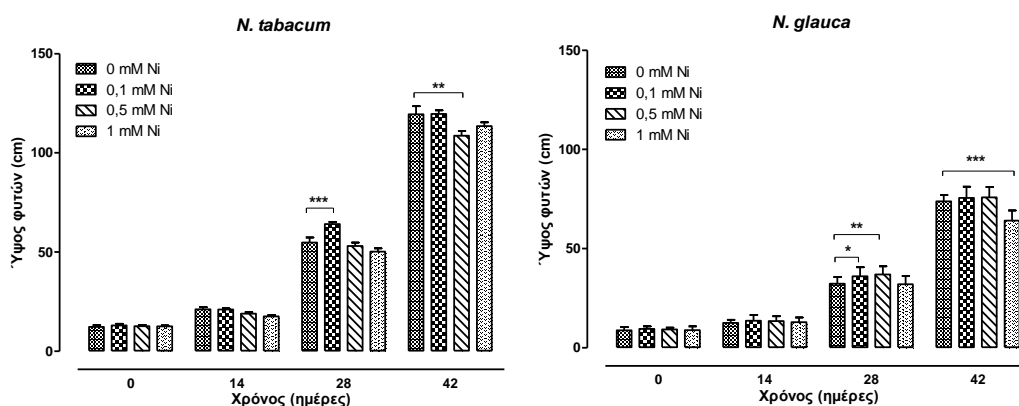
Ni (mM)	Φύλλα βάσης	Φύλλα κορυφής	Βλαστός βάσης	Βλαστός κορυφής	Ρίζα
0,0	ns	ns	ns	ns	ns
0,1	ns	ns	ns	ns	***
0,5	ns	***	ns	ns	ns
1,0	***	***	ns	ns	ns

### 3.2.2 Επίδραση νικελίου στα μορφολογικά χαρακτηριστικά των φυτικών ειδών *N. tabacum* και *N. glauca*

Κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας αξιολογήθηκαν χαρακτηριστικά της ανάπτυξης των φυτών όπως η μεταβολή του ύψους και η εμφάνιση συμπτωμάτων τοξικότητας ενώ στη λήξη του πειράματος καταγράφηκε η βιομάζα των φύλλων, του βλαστού και της ρίζας των φυτών. γινόνταν μετρήσεις σε χαρακτηριστικά που αφορούν την ανάπτυξη των φυτών. Συγκεκριμένα καταγράφηκε το ύψος των φυτών σε τέσσερις χρονικές φάσεις του πειράματος, κατά την έναρξη των επεμβάσεων και ακολούθησαν μετρήσεις ανά δυο εβδομάδες μέχρι την λήξη του πειράματος στις έξι εβδομάδες (42 ημέρες από την έναρξη). Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.16.

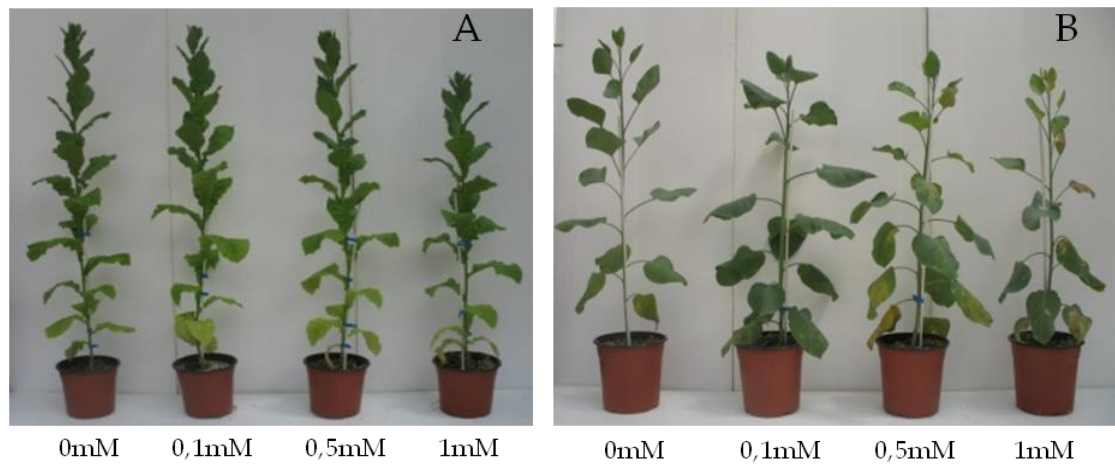
Τις δυο πρώτες εβδομάδες μετά την έναρξη των επεμβάσεων δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά στην ανάπτυξη των φυτών σε σχέση με το μάρτυρα. Τέσσερις εβδομάδες μετά την έναρξη των επεμβάσεων παρατηρήθηκε θετική επίδραση της επέμβασης [Ni0,1] στο ύψος των φυτών και στα δυο είδη ενώ θετικά επέδρασε και η επέμβαση [Ni0,5] στο *N. glauca*. Θετική επίδραση των χαμηλών συγκεντρώσεων νικελίου στην ανάπτυξη διαφόρων φυτών έχει περιγράψει και σε άλλες μελέτες (Atta-Aly, 1999).

Αντίθετα, στο τέλος του πειράματος, σημειώθηκε ανάσχεση της ανάπτυξης και στα δυο είδη, ιδιαίτερα στην μεταχείριση [Ni1].



**Εικόνα 3.16** Μεταβολή του ύψους των φυτών κατά τη διάρκεια του πειράματος (έναρξη, 14, 28, 42 ημέρες) στις διαφορετικές συγκεντρώσεις νικελίου και στα δυο φυτικά είδη. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τυπικό σφάλμα 12 επαναλήψεων

Στην Εικόνα 3.17 παρουσιάζονται τυχαία φυτά, ένα από κάθε επέμβαση, και από τα δυο είδη πριν την απεγκατάσταση του πειράματος. Είναι αντιληπτές οι διαφορές στην ανάπτυξη που περιγράφηκαν παραπάνω καθώς και ορισμένα φαινόμενα τοξικότητας στα φύλλα. Αναλυτικότερη παρουσίαση των φαινομένων αυτών παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.6 και στην Εικόνα 3.18. Αν εξεταστεί κάθε είδος χωριστά παρατηρείται ένα μόνο σύμπτωμα τοξικότητας στο *N. tabacum*, αυτό της χλώρωσης και μάλιστα όσο αυξάνεται η συγκέντρωση νικελίου τόσο το σύμπτωμα γίνεται εντονότερο στη βάση αλλά και εμφανίζεται στα ανώτερα προς την κορυφή φύλλα. Στο *N. glauca* ωστόσο, τα συμπτώματα είναι περισσότερα και εντονότερα, ένδειξη μεγαλύτερης καταπόνησης. Πιο αναλυτικά, η αύξηση της συγκέντρωσης Ni στις επεμβάσεις έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση περισσότερο και μη αναστρέψιμων βλαβών στα φύλλα όπως είναι οι νεκρωτικές κηλίδες και το κάψιμο μέρους των φύλλων. Επίσης τα φαινόμενα είναι μεγαλύτερης κλίμακας στα φύλλα κορυφής, γεγονός που ίσως ερμηνεύεται από την μεγαλύτερη συσσώρευση Ni, όπως διαπιστώθηκε παραπάνω, σε συνδυασμό με την αυξημένη ευαισθησία των νεαρών ιστών.

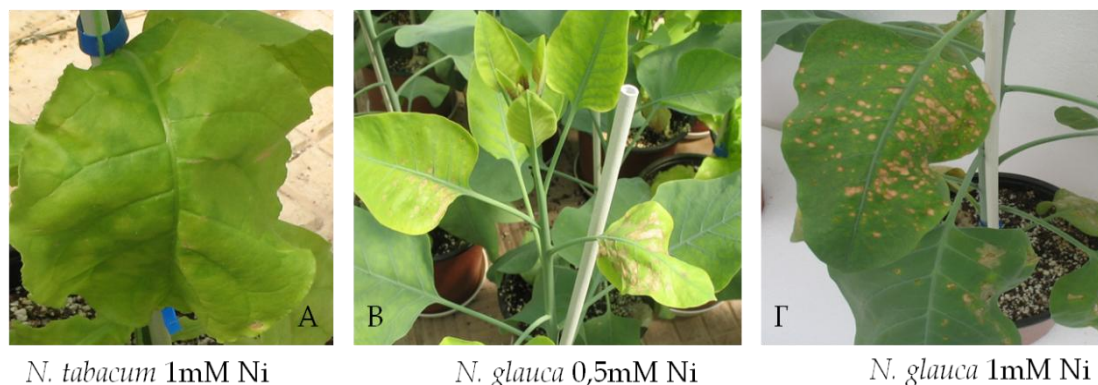


**Εικόνα 3.17** Τυχαία επιλεγμένα φυτά των τεσσάρων επεμβάσεων νικελίου (Ni) στο τέλος του πειράματος. A: *N. tabacum* και B: *N. glauca*.

**Πίνακας 3.6** Μακροσκοπικά συμπτώματα (ως προς το πλήθος και την ένταση) που παρουσίαζαν τα φυτά 42 ημέρες από την έναρξη των μεταχειρίσεων.

Τμήμα φυτού	Επεμβάσεις Νικελίου			
	0mM	0,1mM	0,5mM	1mM
<i>N. tabacum</i>				
κορυφή	-	-	-	-
μέση πάνω	-	-	X1	X2
μέση κάτω	-	X1	X2	X3
βάση	X1	X2	X3	X3
<i>N. glauca</i>				
κορυφή	-	-	MX2, XN2, ΚΦ3	MX3, NK3, ΚΦ4
μέση πάνω	-	NK1	NK3, ΚΦ3	MX2, NK3, ΚΦ3
μέση κάτω	-	NK1	NK3	M1, NK2, ΚΦ2
βάση	NK1	NK1	X1, NK2	M2, NK2, ΚΦ1

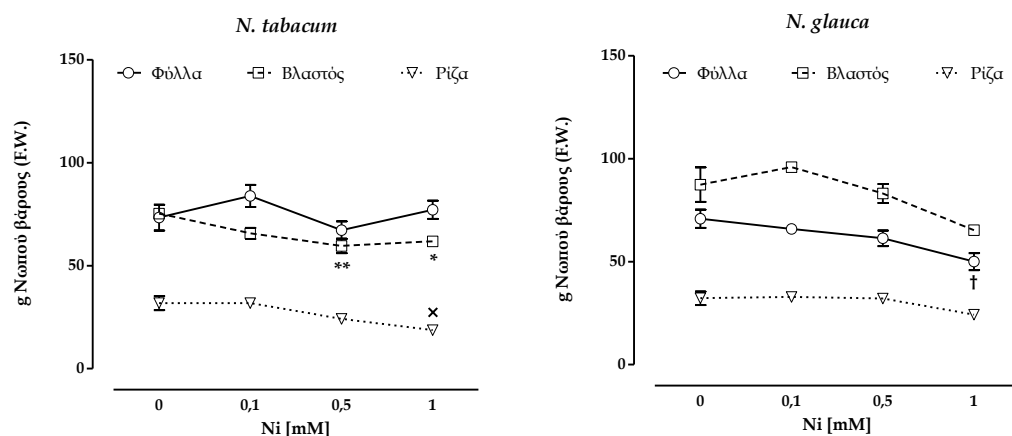
X: χλώρωση, M: μάρανση, MX: μεσοενύρια χλώρωση, NK: νεκρωτικές κηλίδες, ΚΦ: κάψιμο φύλλων, 1,2,3,4 : ένταση συμπτώματος



**Εικόνα 3.18** Χαρακτηριστικά συμπτώματα τοξικότητας στα φύλλα. Α: χλώρωση φύλλων στο *N. tabacum* και Β και Γ: μεσονεύρια χλώρωση και νεκρωτικές κηλίδες στα φύλλα του *N. glauca*

Ένα επιπλέον χαρακτηριστικό της ανάπτυξης των φυτών που μετρήθηκε είναι η νωπή βιομάζα των φύλλων, του βλαστού και της ρίζας. Η μέτρηση έγινε σε πέντε τυχαία φυτά ανά επέμβαση κατά την απεγκατάσταση του πειράματος και τα δεδομένα παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.19. Σε γενικές γραμμές δεν παρατηρήθηκε σημαντική διάφορα στη βιομάζα των φυτών της επέμβασης [Ni0,1] σε κανένα από τα δυο φυτικά είδη. Στο *N. tabacum* δεν επηρεάστηκαν ιδιαίτερα τα φύλλα σε καμία επέμβαση, ενώ επηρεάστηκε η μάζα του βλαστού στις επεμβάσεις [Ni0,5] και [Ni1] καθώς και η μάζα ρίζα στην [Ni1]. Ελαφρώς μεγαλύτερη μείωση της βιομάζας παρατηρήθηκε στο *N. glauca* στην μεταχείριση [Ni1].

Μελέτες που έχουν γίνει σχετικά με τις επιπτώσεις του Ni στην ανάπτυξη των φυτών, αναφέρουν καθυστέρηση στην ανάπτυξη του λάχανου υπό την επίδραση 0,5 mM Ni (Pandey and Sharma, 2002) και μείωση της ανάπτυξης του σιταριού παρουσία 0,2 mM Ni (Gajewska et al., 2006). Επιπλέον οι ρίζες του *N. tabacum* μεταχρωματίστηκαν σε σκούρο καφέ εντός 7-10 ημερών από την έκθεση τους σε 0,43 mM Ni ενώ η ανάπτυξη των φυτών εμποδίστηκε σε σημαντικό βαθμό (Boominathan and Doran, 2002). Άλλες εργασίες δείχνουν ότι η υψηλή συσσώρευση του Ni επηρεάζει σοβαρά την απόδοση και τα παραγωγικά χαρακτηριστικά των φυτών (Cuiyun Chen et al., 2009).



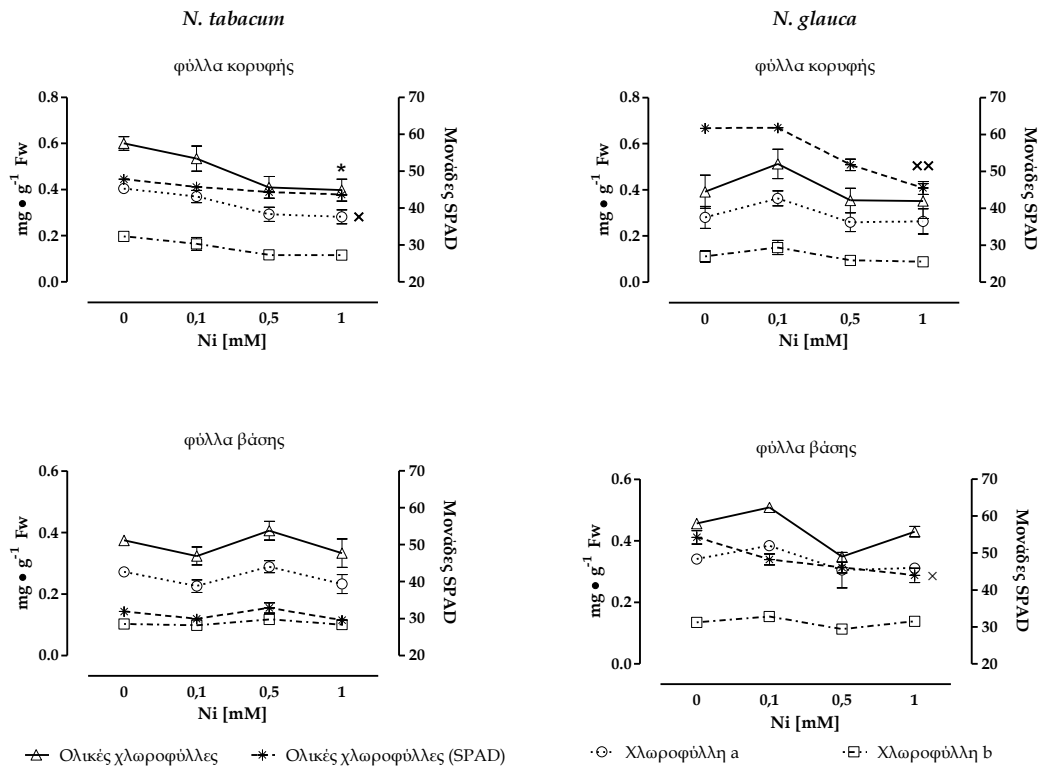
**Εικόνα 3.19** Βιομάζα (νωπό βάρος) ανά τμήμα φυτού (φύλλα, βλαστός, ριζά) σε σχέση με τις διαφορετικές επεμβάσεις νικελίου. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τυπικό σφάλμα 6 επαναλήψεων.

### 3.2.3 Επίδραση νικελίου (Ni) σε παραμέτρους της φωτοσύνθεσης

Το Ni επιδρά αρνητικά σε σχεδόν κάθε επίπεδο της οργάνωσης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού συμπεριλαμβανομένων της καταστροφής των κυττάρων του μεσοφυλλικού και επιδερμικού ιστού (Bethke and Drew, 1992) και της μείωσης των χλωροφυλλών (χλωροφύλλη a, b, λόγο a/b) (Gajewska et al., 2006; Pandey and Sharma, 2002). Το νικέλιο επίσης, επηρεάζει αρνητικά τις θυλακοειδείς μεμβράνες και τη δομή των grana των χλωροπλαστών (Cuiyun Chen et al., 2009).

Σύμφωνα με τις μετρήσεις του περιεχομένου των φωτοσυνθετικών χρωστικών (Εικόνα 3.20) δεν παρατηρήθηκαν αξιόλογες μεταβολές στην συγκέντρωση των χλωροφυλλών, ενώ οι όποιες μικρές διαφορές κατά κανόνα εντοπίστηκαν στα φύλλα κορυφής. Στο *N. tabacum* πρόεκυψε μείωση ( $p < 0,05$ ) της χλωροφύλλης a και των ολικών χλωροφυλλών στην επέμβαση [Ni1] και μόνο στα φύλλα κορυφής. Στο *N. glauca* διαφορές ( $p < 0,01$ ) εντοπίστηκαν στο

περιεχόμενο των ολικών χλωροφυλλών (μονάδες SPAD) στα φύλλα συνολικά και στις επεμβάσεις [Ni0,5] και [Ni1].

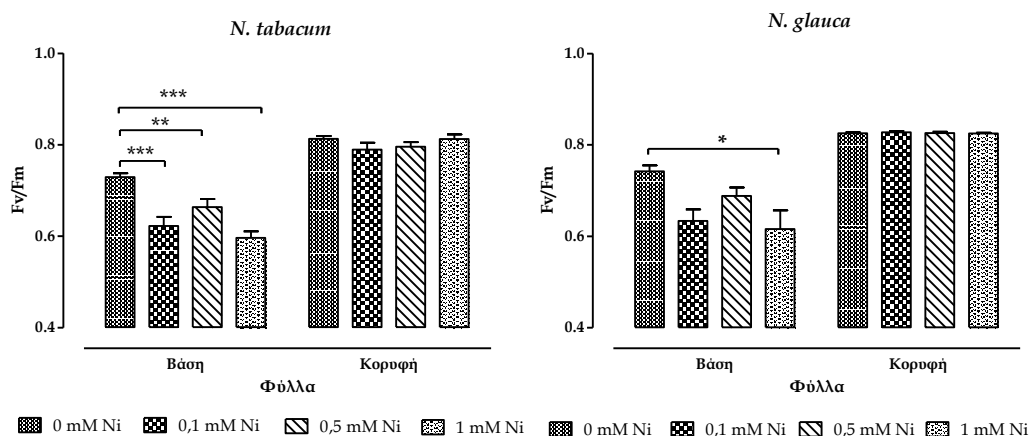


**Εικόνα 3.20** Μεταβολή της συγκέντρωσης [mg/g νωπού βάρους] των φωτοσυνθετικών χρωστικών (χλωροφύλλη a, χλωροφύλλη b, και ολικών χλωροφυλλών) στα φύλλα της βάσης και της κορυφής των φυτών *N. tabacum* και *N. glauca*. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τυπικό σφάλμα 3 επαναλήψεων. Για τις μονάδες SPAD n=12.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, σε βιοχημικό επίπεδο, το Ni έχει επιπτώσεις στο φωτοσυνθετικό σύμπλοκο, (LHCII) και στις ποσότητες ξανθοφύλλων και καροτενοειδών. Παρεμβαίνει επίσης στη φωτοσυνθετική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων και τα ενδιάμεσα προϊόντα της (όπως τα κυτοχρώματα b6f και b559) (Cuiyun Chen et al., 2009). Η παρεμπόδιση της μεταφοράς ηλεκτρονίων είναι κυρίως από την πλευρά των δοτών του φωτοσυστήματος II (PSII) και δευτερευόντως στον αποδέκτη κινίνης του φωτοσυστήματος II. Περαιτέρω μελέτες *in vivo*, έχουν προτείνει ότι το Ni

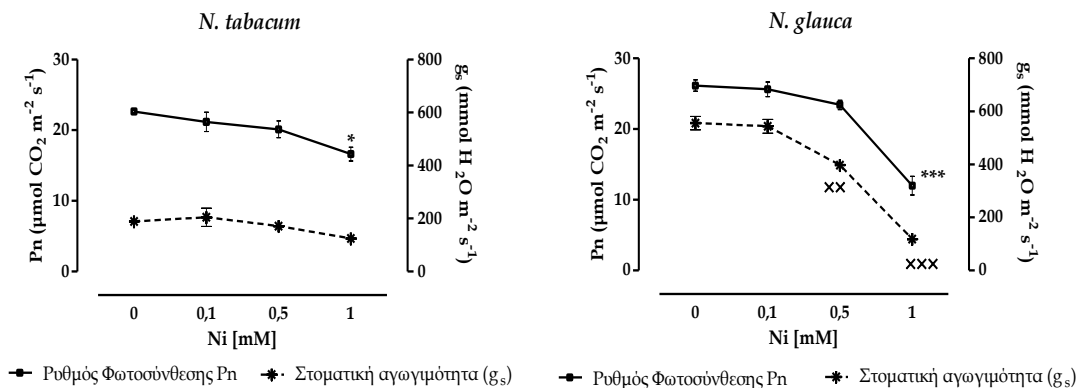
αδρανοποιεί κυρίως το φωτοσώστημα I (PSI) ενώ σε *in vitro* πειράματα φαίνεται να στοχεύει πρώτιστα το PSII (Cuiyun Chen et al., 2009). Λαμβάνοντας υπόψη τις παραπάνω μελέτες, μπορεί να ειπωθεί ότι η διαταραχή της φωτοσύνθεσης από το Ni δεν μπορεί να αποδοθεί σε κάθε μεμονωμένο παράγοντα χωριστά αλλά πιθανότατα προκύπτει συνδυαστικά.

Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.21, η επίδραση του νικελίου στον χλωροφυλλικό φθορισμό είναι παρόμοια με εκείνη που περιγράφηκενωρίτερα για τον ψευδάργυρο. Σημαντική είναι η μείωση του φθορισμού και στα δυο είδη φυτών στα φύλλα της βάσης γεγονός που υποδηλώνει μείωση της απόδοσης του φωτοσυστήματος II. Μάλιστα η τιμή του λόγου Fv/Fm σε όλες τις μεταχειρίσεις, κυμαίνεται από 0,59-0,68 όταν οι φυσιολογικές τιμές είναι πάνω από 0,75 (Maxwell and Johnson, 2000). Αντίθετα, στα φύλλα κορυφής δεν εντοπίστηκε μείωση της απόδοσης αφού οι τιμές του λόγου Fv/Fm ήταν αρκετά κοντά στο άριστο 0,83.



**Εικόνα 3.21** Μέγιστη απόδοση του φωτοσυστήματος II (Fv/Fm) στα φύλλα βάσης και κορυφής των φυτών *N. tabacum* και *N. glauca*. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τυπικό σφάλμα 12 επαναλήψεων. Οι μετρήσεις αφορούν την λήξη του πειράματος.

Τα βαρέα μέταλλα, έκτος από τις παραπάνω άμεσες παραμέτρους της φωτοσύνθεσης, επηρεάζουν επίσης σε μεγάλο βαθμό έμμεσα την φωτοσυνθετική λειτουργία καθώς επιδρούν έντονα στην στοματική συσκευή. Για παράδειγμα ενώ το νικέλιο δεν βρέθηκε να επηρεάζει την απόδοση των φωτοσυστημάτων στα φύλλα κορυφής (Εικόνα 3.21) εντούτοις ο ρυθμός φωτοσύνθεσης στο *N. glauca*, είναι σημαντικά μειωμένος στην επέμβαση [Ni1] (Εικόνα 3.22). Η μείωση αυτή της φωτοσυνθετικής ικανότητας μπορεί να αποδοθεί σε μεγάλο βαθμό στην σημαντική μείωση της στοματικής αγωγιμότητας που παρατηρήθηκε ακόμα και από την επέμβαση [Ni0,5]. Αντίθετα, στο *N. tabacum* η μικρή μείωση της στοματικής αγωγιμότητας που παρατηρήθηκε δεν φαίνεται να είναι ικανή να δικαιολογήσει τη μείωση του ρυθμού φωτοσύνθεσης.

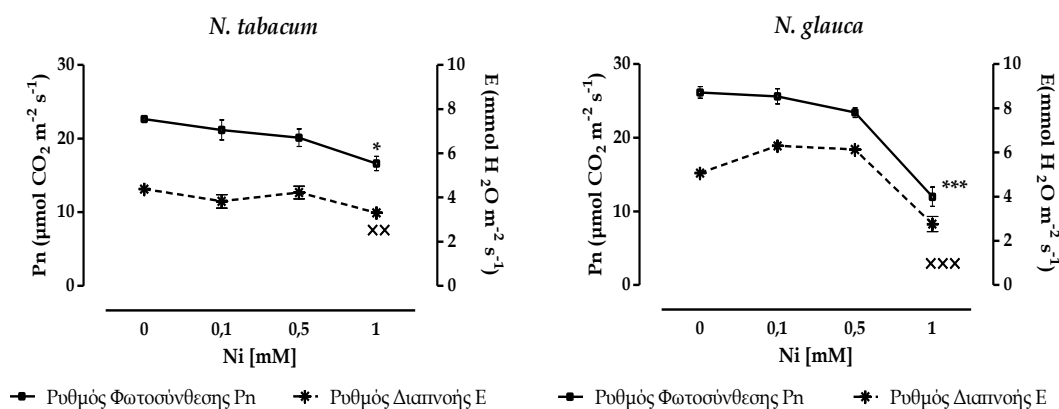


**Εικόνα 3.22** Μεταβολή του ρυθμού φωτοσύνθεσης (Pn) και της στοματικής αγωγιμότητας (gs) των φύλλων κορυφής και των δυο ειδών υπό την επίδραση των επεμβάσεων νικελίου. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τυπικό σφάλμα 12 επαναλήψεων. Οι μετρήσεις αφορούν την λήξη του πειράματος.

Προηγούμενη μελέτη με φυτά *N. tabacum* (Boominathan and Doran, 2002) έδειξε βλάβη στις ρίζες των φυτών μετά από 7 με 10 ημέρες έκθεσης σε 0,43 mM Ni. Όπως διαπιστώθηκε και στην παρούσα μελέτη (Εικόνα 3.19) οι ρίζες του *N. tabacum* ήταν σημαντικά μικρότερες στην επέμβαση [Ni1] γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη απορρόφηση του νερού. Μια τέτοια

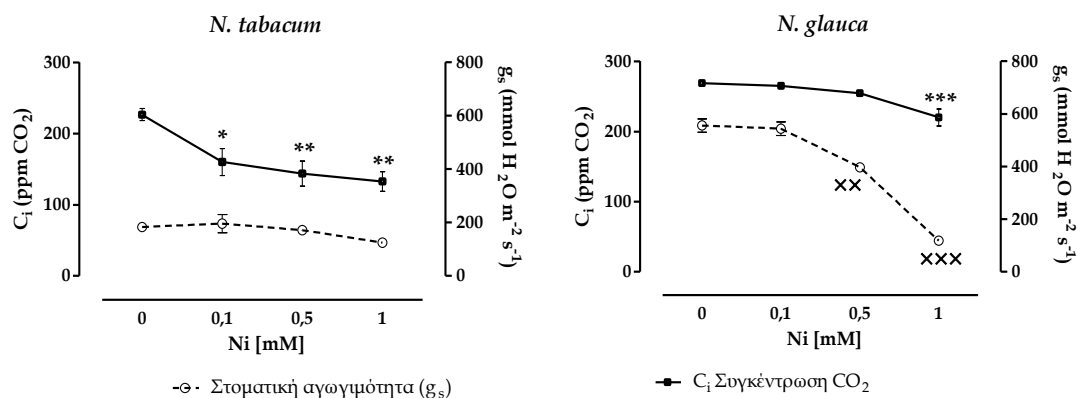


κατάσταση μπορεί να επιφέρει υδατικό έλλειμμα στα φυτά και όπως έχει αποδειχθεί εν τέλει προκαλείται και μείωση του ρυθμού φωτοσύνθεσης. Είναι επίσης γνωστό ότι οι συνθήκες υδατικού ελλείμματος προκαλούν σχεδόν πάντα μείωση της διαπνοής, ως αντίδραση του φυτού για να περιοριστούν οι απώλειες νερού. Από την Εικόνα 3.23 φαίνεται να επιβεβαιώνεται η ύπαρξη κατάστασης υδατικού ελλείμματος και στα δυο φυτικά είδη, ενώ πιο έντονο διαπιστώνεται το φαινόμενο στο *N. glauca* όπου η μείωση της διαπνοής είναι αρκετά μεγαλύτερη, 47% έναντι 24% στο *N. tabacum*.



**Εικόνα 3.23** Μεταβολή του ρυθμού φωτοσύνθεσης (Pn) και του ρυθμού διαπνοής των φύλλων κορυφής και των δυο φυτικών ειδών υπό την επίδραση των επεμβάσεων νικελίου. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τυπικό σφάλμα 12 επαναλήψεων. Οι μετρήσεις αφορούν την λήξη του πειράματος.

Τέλος, σημαντικά μεταβλήθηκε η εσωτερική συγκέντρωση του CO<sub>2</sub> (C<sub>i</sub>) και στα δυο φυτικά είδη γεγονός που ταυτίζεται με την μείωση του φωτοσυνθετικού ρυθμού (Εικόνα 3.24). Συνολικά, τα παραπάνω αποτελέσματα υποστηρίζουν ότι το νικέλιο επηρεάζει την φωτοσυνθετική λειτουργία και των δυο δοκιμαζόμενων φυτικών ειδών, σε μικρότερο ή μεγαλύτερο βαθμό, είτε άμεσα σε βιοχημικό επίπεδο (μείωση χλωροφυλλών, μείωση απόδοσης φωτοσυστημάτων), είτε έμμεσα παρεμβαίνοντας στη στοματική συσκευή, ή διαταράσσοντας την υδατική κατάσταση των φυτών.



**Εικόνα 3.24** Στοματική αγωγιμότητα ( $g_s$ ) και συγκέντρωση  $CO_2$  στους μεσοκυττάριους χώρους ( $C_i$ ) των φύλλων κορυφής και των δυο ειδών υπό την επίδραση των επεμβάσεων νικελίου. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τυπικό σφάλμα 12 επαναλήψεων. Οι μετρήσεις αφορούν την λήξη του πειράματος.

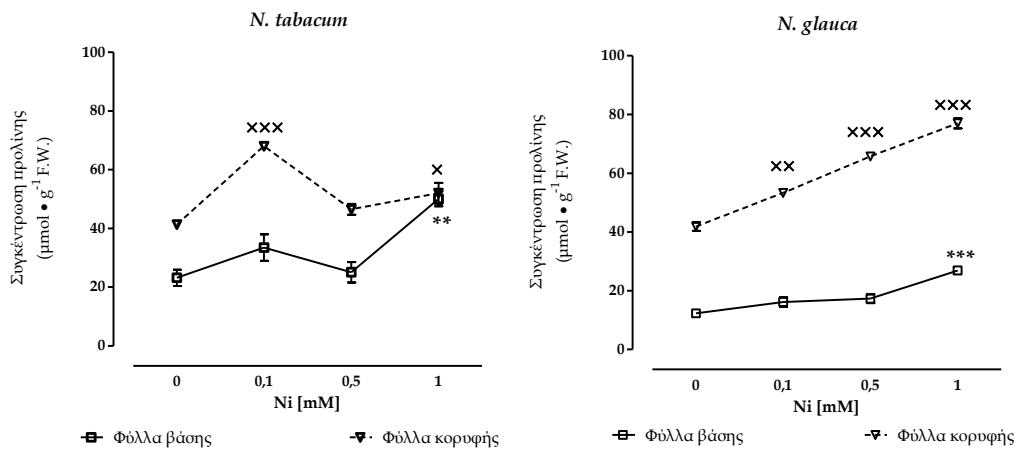
### 3.2.4 Οξειδωτική καταπόνηση

Ολοένα και περισσότερες μελέτες δείχνουν ότι η τοξικότητα Ni στα φυτά συνδέεται επίσης με το οξειδωτικό στρες (Gajewska et al., 2006; Gonnelli et al., 2001; Madhava Rao and Sresty, 2000). Η υπερβολική ποσότητα Ni οδηγεί σε σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης των ριζών υδροξυλίου, ανιόντων σουπεροξειδίου, μονοξειδίου του αζώτου και του υπεροξειδίου του υδρογόνου (Boominathan and Doran, 2002; Gajewska et al., 2006). Δεδομένου ότι το Ni δεν είναι ένα οξειδοαναγωγικά ενεργό μέταλλο, δεν μπορεί να παράγει άμεσα ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS). Ωστόσο, επηρεάζει άμεσα μια σειρά αντιοξειδωτικών ενζύμων (Gajewska and Sklodowska, 2005; Hao et al., 2006), για παράδειγμα, την δισμουτάση της ρίζας του σουπεροξειδίου (SOD), την καταλάση (CAT), την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GSH-Px), την ρεδοκτάση της γλουταθειόνης (GR), την υπεροξειδάση (POD), την υπεροξειδάση της γουαϊακόλλης (GPX), καθώς και την ασκορβική υπεροξειδάση (APX).

Η έκθεση των φυτών σε χαμηλές συγκεντρώσεις Ni ( 0,05 mM) και / ή για μικρότερο χρονικό διάστημα έχει αποδειχθεί ότι αυξάνουν τη δραστηριότητα των SOD, POD, GR, και GPX προκειμένου να ενισχυθεί η ενεργοποίηση των άλλων αμυντικών αντιοξειδωτικών και ως εκ τούτου να μειωθούν οι ROS (Cuiyun Chen et al., 2009; Gajewska and Skłodowska, 2005). Ωστόσο, η πλεονάζουσα συγκέντρωση Ni και/ ή παρατεταμένη έκθεση έχει βρεθεί ότι μειώνει τη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, και την ικανότητα των φυτών να αποσβένουν τις ROS, οδηγώντας σε συσσώρευση ROS και τελικά σε οξειδωτικό στρες (Gajewska and Skłodowska, 2007; Zhao et al., 2008). Σε τέτοιες περιπτώσεις, η αντιοξειδωτική άμυνα του φυτού φαίνεται να στηρίζεται στους μη ενζυμικούς τρόπους μείωσης και προστασίας από τις ROS (Gajewska and Skłodowska, 2007; Gajewska et al., 2006; Zhao et al., 2008).

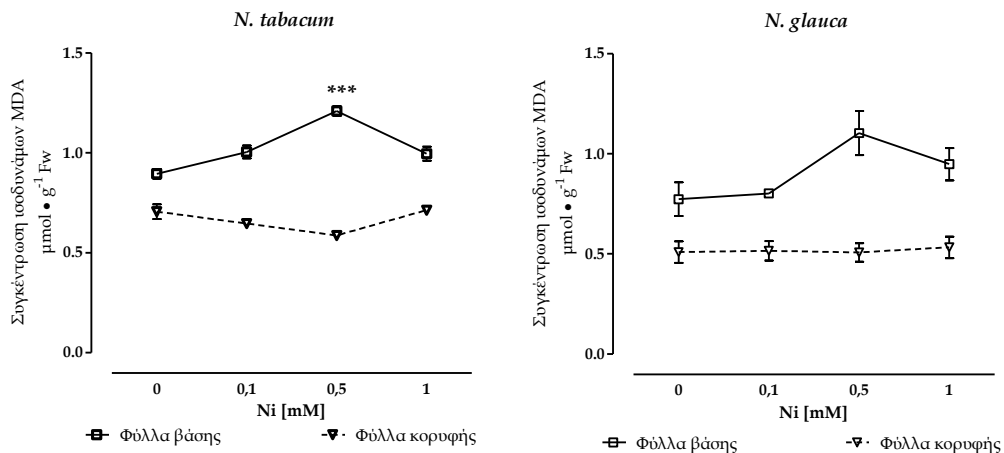
#### 3.2.4.1 Μη ενζυμικός αντιοξειδωτικός μηχανισμός

Η προλίνη όπως και στην περίπτωση του ψευδάργυρου έχει εξίσου σημαντικό ρόλο στην προστασία του φυτού από το νικέλιο. Και στα δυο είδη φυτών τα επίπεδα προλίνης αυξήθηκαν σημαντικά. Στο *N. tabacum* παρατηρήθηκε αυξομείωση μεταξύ των επεμβάσεων, πάντα όμως σε υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με τον μάρτυρα, καταλήγοντας στην επέμβαση [Ni1] με αύξηση 54% και 21% στα φύλλα βάσης και κορυφής, αντίστοιχα (Εικόνα 3.25). Παρόμοια ανταπόκριση έδειξε και το *N. glauca* αφού η συγκέντρωση προλίνης αυξήθηκε κατά 55% στα φύλλα βάσης και 47% στα φύλλα κορυφής. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με αρκετές μελέτες που αποδεικνύουν την σύνδεση της προλίνης με οσμωρυθμιστικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες, έπειτα από καταπόνηση νικελίου και άλλων μετάλλων (Gajewska et al., 2006; Sharma and Dietz, 2006).



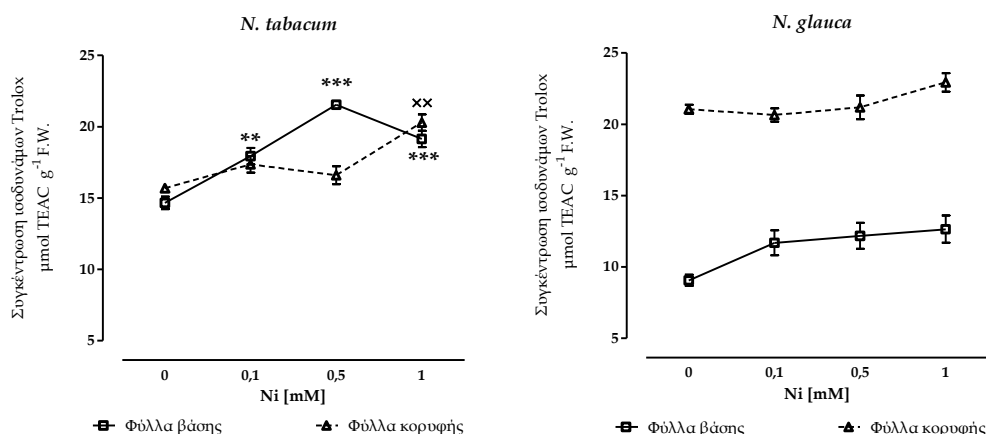
**Εικόνα 3.25** Επίπεδα προλίνης στους ιστούς των φύλλων της βάσης και της κορυφής των φυτών *N. tabacum* και *N. glauca*. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τυπικό σφάλμα 3 επαναλήψεων.

Ανάλογα συμπεράσματα με την επίδραση του ψευδάργυρου εξάγονται και από την εξέταση της υπεροξειδωσης των λιπιδίων εκφρασμένης σε ισοδύναμα MDA παρουσία νικελίου. Τα δεδομένα της Εικόνας 3.26 δείχνουν μια σαφή αύξηση των ισοδυνάμων μαλονδιαλδεϋδης στην επέμβαση [Ni0,5] ως αποτέλεσμα της υπεροξειδωσης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs) στα φύλλα της βάσης και στα δυο φυτικά είδη. Στη συνέχεια όμως διαπιστώνεται μείωση των ισοδυνάμων MDA εξίσου και στα δυο είδη. Τα αποτελέσματα αυτά θα μπορούσαν να ερμηνευτούν συσχετιζόμενα με την μεταβολή στην συγκέντρωση προλίνης. Έτσι για παράδειγμα στο *N. tabacum* και στη μεταχείριση [Ni0,5] διαπιστώθηκε μείωση της προλίνης στα επίπεδα του μάρτυρα με αντίστοιχη κορύφωση την λιπιδικής υπεροξειδωσης ενώ η αύξηση της προλίνης στην μεταχείριση [Ni0,5] οδηγεί σε πτώση της λιπιδικής υπεροξειδωσης (Εικόνα 3.26).



**Εικόνα 3.26** Εκτίμηση της υπεροξειδωσης των λιπιδίων εκφρασμένη σε ισοδύναμα MDA. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τυπικό σφάλμα 3 επαναλήψεων.

Μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα της ανταπόκρισης των φυτών στην καταπόνηση των επεμβάσεων νικελίου δίνει η συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα των φυτών, εκφραζόμενη σε ισοδύναμα Trolox. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.27, το *N. tabacum* αντιδρά καλύτερα στην επαγόμενη από το Ni καταπόνηση σε σύγκριση με το *N. glauca*. Χαρακτηριστική είναι η αύξηση των ισοδυνάμων Trolox τόσο στα φύλλα βάσης όσο και σε αυτά της κορυφής. Μπορεί βέβαια να σημειώνεται μια μείωση στα φύλλα βάσης μεταξύ των επεμβάσεων [Ni0,5] και [Ni1], ωστόσο εξακολουθεί να υπάρχει σημαντική διαφορά σε σχέση με τον μάρτυρα κατά 27%. Έξαλλου, τα φύλλα αυτά, αφενός περιέχουν τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις Ni και αφετέρου είναι περισσότερο γηρασμένα από τους άλλους ιστούς. Αντίθετα, στο *N. glauca* η σχετική τάση αύξησης που παρατηρείται στα επίπεδα των ισοδυνάμων Trolox δεν διαπιστώνεται να είναι στατιστικά σημαντική. Επιπλέον, όπως και στην περίπτωση του ψευδαργύρου, παραμένει το ερώτημα της διπλάσιας διαφοράς των ισοδυνάμων Trolox μεταξύ φύλλων κορυφής και βάσης ακόμα και στα φυτά μάρτυρες.

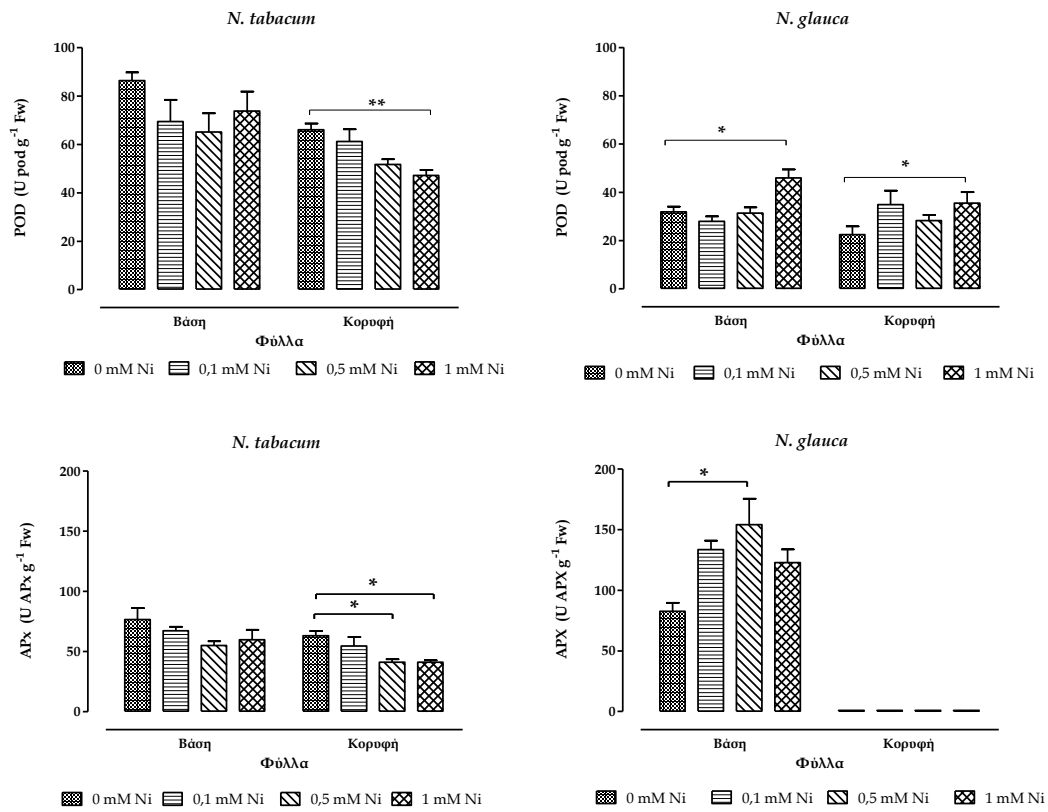


**Εικόνα 3.27** Αντιοξειδωτική ικανότητα (ισοδύναμα Trolox) στα φύλλα της βάσης και της κορυφής των φυτών *N. tabacum* και *N. glauca*. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τυπικό σφάλμα 3 επαναλήψεων.

### 3.2.4.2 Ενζυμικός αντιοξειδωτικός μηχανισμός

Στο *N. tabacum* η συγκέντρωση του Ni επηρέασε αρνητικά τα επίπεδα των ενζύμων POD και APX. Η ενζυμική δραστηριότητα της POD μειώθηκε κατά 15% στα φύλλα βάσης και κατά 29% στα φύλλα κορυφής και η APX μειώθηκε κατά 22% και 35%, αντίστοιχα. Αντίθετα σημαντικά αυξήθηκε η ενεργότητα των ενζύμων στο *N. glauca* με τα ποσοστά να κορμούνται για την POD σε 44% και 58% στα φύλλα βάσης και κορυφής όπως επίσης κατά 48% αυξήθηκε η APX στα φύλλα βάσης. Στα φύλλα της κορυφής δεν ανιχνεύτηκε ενζυμική δραστηριότητα APX.

Τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν την αδυναμία του ενζυμικού αντιοξειδωτικού μηχανισμού στο *N. tabacum* προφανώς εξαιτίας των τοξικών συγκεντρώσεων νικελίου και παράλληλα την αντοχή - ανταπόκριση του μηχανισμού στο *N. glauca*.



**Εικόνα 3.28** Ενζυμική δράση, Α: της υπεροξειδάσης (POD), Β: της ασκορβικής υπεροξειδάσης (APX). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τυπικό σφάλμα 3 επαναλήψεων.

### 3.3 Κάδμιο (Cd)

Το Cd έχει προαναφερθεί, ότι δεν αποτελεί απαραίτητο στοιχείο για την επιβίωση των φυτών. Εξαιτίας της μεγάλης κινητικότητας σε πολλά φυτικά είδη προσλαμβάνεται από τις ρίζες και μεταφέρεται στα υπέργεια τμήματα των φυτών. Σε υψηλές συγκεντρώσεις, προκαλεί σημαντικές δυσλειτουργίες στα φυτά όπως, μείωση στην αφομοίωση άνθρακα, οξειδωτική καταπόνηση, μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας, κλείσιμο των στομάτων, διαταραχές στο περιεχόμενο του νερού, αναστολή της βιοσύνθεσης της χλωροφύλλης, καταστροφή των άκρων των ριζών, μείωση της διαπνοής και αναστολή της αύξησης των φυτών (Seregin and Ivanov, 2001; Shi and Cai, 2008; Skórzyńska-Polit and Krupa, 2006; Sun et al., 2008).

#### 3.3.1 Συσσώρευση καδμίου στους φυτικούς ιστούς

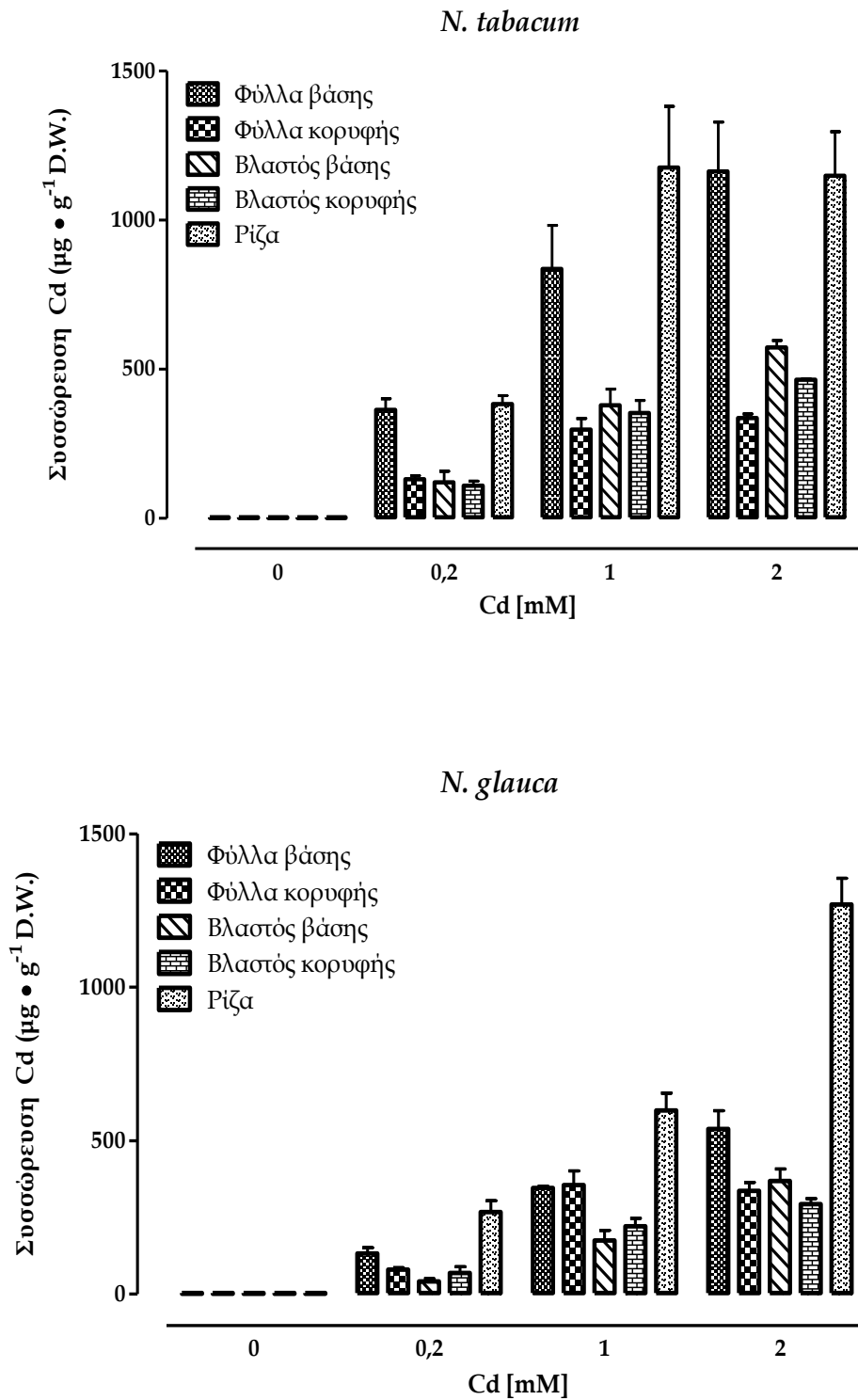
Όπως είναι φανερό από την Εικόνα 3.29 η αύξηση της συγκέντρωσης του μετάλλου στο υπόστρωμα καλλιέργειας, οδήγησε σε αυξημένη συσσώρευση του Cd στους φυτικούς ιστούς και των δυο φυτικών ειδών. Συγκεκριμένα στο *N. tabacum* παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσης στις ρίζες από 1 σε 383, 1176 και τελικά σε 1149 ppm για τις επεμβάσεις [Cd0], [Cd0,2], [Cd1] και [Cd2], αντίστοιχα. Επιπλέον, αυξημένη ήταν η συγκέντρωση του μετάλλου στα φύλλα βάσης και μάλιστα κυμάνθηκε στα ίδια περίπου επίπεδα με τις ρίζες, δηλαδή 1, 364, 836 και 1163 ppm, αντιστοίχως. Η συσχέτιση μεταξύ επεμβάσεων και συσσώρευσης στους ιστούς παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.8. Στα υπόλοιπα τμήματα η συσσώρευση του Cd ήταν σημαντικά μικρότερη από ότι στη ρίζα και στα φύλλα βάσης, ανεξαρτήτως επέμβασης. Σε όλες τις περιπτώσεις όμως τα επίπεδα συγκεντρώσεων Cd ήταν κατά πολύ μεγαλύτερα όχι μόνο από τις συγκεντρώσεις που θεωρούνται τοξικές για τα φυτά (5-30 ppm D.W), αλλά και από το όριο για να χαρακτηριστεί ένα φυτό υπερσυσσωρευτής Cd (100 ppm D.W.). Βεβαίως ένας τέτοιος χαρακτηρισμός



προϋποθέτει επίσης, ο λόγος των συγκεντρώσεων στο υπέργειο τμήμα προς την ρίζα να υπερβαίνει την μονάδα. Η συνθήκη αυτή δεν φαίνεται να ικανοποιείται καθώς η μέση συγκέντρωση των φύλλων και των βλαστών που συνιστούν το υπέργειο τμήμα δεν ξεπερνά την αντίστοιχη συγκέντρωση της ρίζας. Αξίζει να αναφερθεί ωστόσο ότι σε εδάφη χωρίς ρύπανση Cd, ο λόγος συσσώρευσης φύλλα/ρίζα είναι μεγαλύτερος από 1 (Clarke and Brennan, 1989; Lugon-Moulin et al., 2004). Παρόλο όμως που οι ρίζες του φυτού συσσωρεύουν λίγο υψηλότερες συγκεντρώσεις από ότι οι υπέργειοι ιστοί, λόγω της μεγάλης παραγόμενης βιομάζας του υπέργειου τμήματος η συνολική συσσώρευση του μετάλλου στα υπέργεια τμήματα ξεπερνά κατά πολύ την συσσώρευση των ριζών. Επομένως μεγάλη απομάκρυνση του μετάλλου από το έδαφος μπορεί να επιτευχθεί με το θερισμό του φυτού χωρίς να είναι αναγκαίο το ξερίζωμα με προκύπτων οικονομικό όφελος.

Υψηλή συσσώρευση καδμίου (900ppm) στα φύλλα και (1500ppm) στις ρίζες έχει καταγράψει επίσης σε πείραμα υδροπονίας ο Gorinova, *et al* (2007), έπειτα από πενθήμερη έκθεση φυτών *N. tabacum* σε θρεπτικό μέσο με 300 και 500  $\mu\text{M}$  Cd. Οι ερευνητές αυτοί επίσης, διαπίστωσαν ότι με τις ίδιες επεμβάσεις σε γενετικά τροποποιημένα φυτά η συσσώρευση καδμίου στους ιστούς αυξήθηκε έως και δύο φορές (Gorinova et al., 2007).

Όσον αφορά το *N. glauca* εμφανώς μικρότερη βρέθηκε η συσσώρευση καδμίου στους ιστούς (Εικόνα 3.29). Στα φύλλα βάσης μάλιστα, η συγκέντρωση Cd ήταν κατά 63%, 58% και 71% μικρότερη από το *N. tabacum* στις επεμβάσεις [Cd0,2], [Cd1] και [Cd2], αντίστοιχα. Ταυτόχρονα σημαντικά μειωμένη κατά 50% ήταν η συσσώρευση Cd στις ρίζες στη μεταχείριση [Cd1] και 30% στην μεταχείριση [Cd0,5]. Στους υπόλοιπους ιστούς (Πίνακα 3.7) δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δυο ειδών. Σε γενικές γραμμές όμως και το *N. glauca* ανταποκρίθηκε στην αύξηση της συγκέντρωσης Cd στις επεμβάσεις με ανάλογη αύξηση του μετάλλου στους ιστούς. Χαρακτηριστική είναι η σχέση επεμβάσεων συσσώρευσης στα φύλλα



**Εικόνα 3.29** Συσσωρευση καδμίου ( $\mu\text{g}/\text{g}$  ξηρού βάρους) στα φυτικά μέρη *N. tabacum* και *N. glauca* υπό την επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων καδμίου στο υπόστρωμα. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τυπικό σφάλμα 3 επαναλήψεων.

βάσης, σε όλο τον βλαστό και στη ρίζα όπου ο συντελεστής  $R^2$  υποδηλώνει γραμμική συσχέτιση ( Πίνακας 3.8).

**Πίνακας 3.7** Στατιστική ανάλυση των συγκεντρώσεων Cd στους ιστούς έπειτα από τις πειραματικές μεταχειρίσεις, σε σχέση με τον μάρτυρα. Επίσης συσχέτιση κατά Pearson της συγκέντρωσης των μεταχειρίσεων με την συσσώρευση στα φυτικά μέρη (n=3).

		Φύλλα βάσης	Φύλλα κορυφής	Βλαστός βάσης	Βλαστός κορυφής	Ρίζα
<i>N. tabacum</i>						
	0,2	ns	**	**	**	***
Cd (mM)	1	**	***	***	***	***
	2	***	***	***	***	***
Συσχέτιση ( $R^2$ )		0,92*	0,82	0,96*	0,92*	0,81
<i>N. glauca</i>						
	0,2	ns	ns	ns	**	ns
Cd (mM)	1	***	***	**	***	***
	2	***	***	***	***	***
Συσχέτιση ( $R^2$ )		0,96*	0,76	0,99***	0,93*	0,98**

**Πίνακας 3.8** Σύγκριση συγκεντρώσεων καδμίου μεταξύ *N. tabacum* και *N. glauca*.

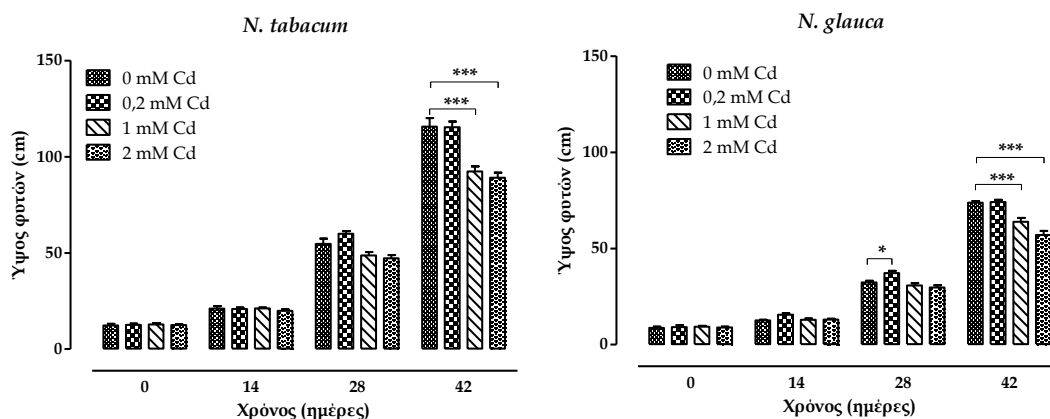
	Φύλλα βάσης	Φύλλα κορυφής	Βλαστός βάσης	Βλαστός κορυφής	Ρίζα
Cd (mM)					
0	ns	ns	ns	ns	ns
0,2	*	ns	ns	ns	ns
1	***	ns	ns	ns	***
2	***	ns	ns	ns	ns

Προηγούμενα πειράματα με *N. tabacum*, και *N. rustica*, έχουν δείξει το ρολό της ρίζας σε επίπεδο ελέγχου πρόσληψης και μεταφοράς του Cd προς το υπέργειο τμήμα. Έτσι σε εμβολιασμένα φυτά που το εμβόλιο ήταν το *N. rustica* και το υποκείμενο *N. tabacum* έπειτα από επίδραση καδμίου, τελικά στο εμβόλιο εντοπίστηκε η τυπική συσσώρευση Cd για το *N. tabacum* και το αντίστροφο (Lugon-Moulin et al., 2004). Η μεταφορά του Cd από την ρίζα στο βλαστό και τα φύλλα γίνεται από το ξύλωμα μέσω συμπλαστικής μεταφοράς, αλλά πιθανώς και μέσω των εξωκυττάρων χώρων (αποπλαστική μεταφορά), σε περιπτώσεις υψηλών επιπέδων έκθεσης. Κύριο λόγο στην μεταφορά φαίνεται να διαδραματίζει η συμπλοκοποίηση του μετάλλου με κυτρικό οξύ και λιγότερο με φυτοχηλατίνες (Salt et al., 1998). Σε γενικές γραμμές τα πρότυπα συσσώρευσης του Cd μπορεί να διαφέρει σημαντικά εντός του γένους *Nicotiana*. Για παράδειγμα, στη βιβλιογραφία το *N. tabacum* εμφανίζεται ως Cd-συσσωρευτής φύλλων και ρίζας, ενώ τα *N. glauca* και *N. rustica* έχουν αναφερθεί ως συσσωρευτές ρίζας. (Keller et al., 2003; Lugon-Moulin et al., 2006; Lugon-Moulin et al., 2004).

Σε αντιστοιχία με τις παραπάνω παρατηρήσεις βρίσκονται και τα αποτελέσματα άλλων μελετών. Στις εργασίες αυτές περιλαμβάνονται μελέτες πεδίου, σε ρυπασμένα και μη εδάφη, καθώς και πειράματα εξωγενών επεμβάσεων που έχουν ομοιότητες με την παρούσα εργασία (Barazani et al., 2004; Doroszevska and Berbeć, 2004; Gisbert et al., 2003; Lugon-Moulin et al., 2006; Lugon-Moulin et al., 2004; Lyubenova et al., 2009). Βέβαια, η σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ των μελετών είναι πολλές φορές δύσκολη, λόγω μεταβολής των συνθηκών της ανάπτυξης, του είδους των μεταχειρίσεων κλπ. Στην διεθνή βιβλιογραφία έχουν παρουσιαστεί επίσης μεγάλες διαφοροποιήσεις μεταξύ των φυτών όσον αφορά την περιοχή και τα επίπεδα συσσώρευσης του καδμίου στους φυτικούς ιστούς. Μεγάλες διαφορές παρατηρούνται επίσης μεταξύ πειραμάτων πεδίου και των υδροπονικών πειραμάτων.

### 3.3.2 Επίδραση του καδμίου στα μορφολογικά χαρακτηριστικά των φυτικών ειδών *N. tabacum* και *N. glauca*

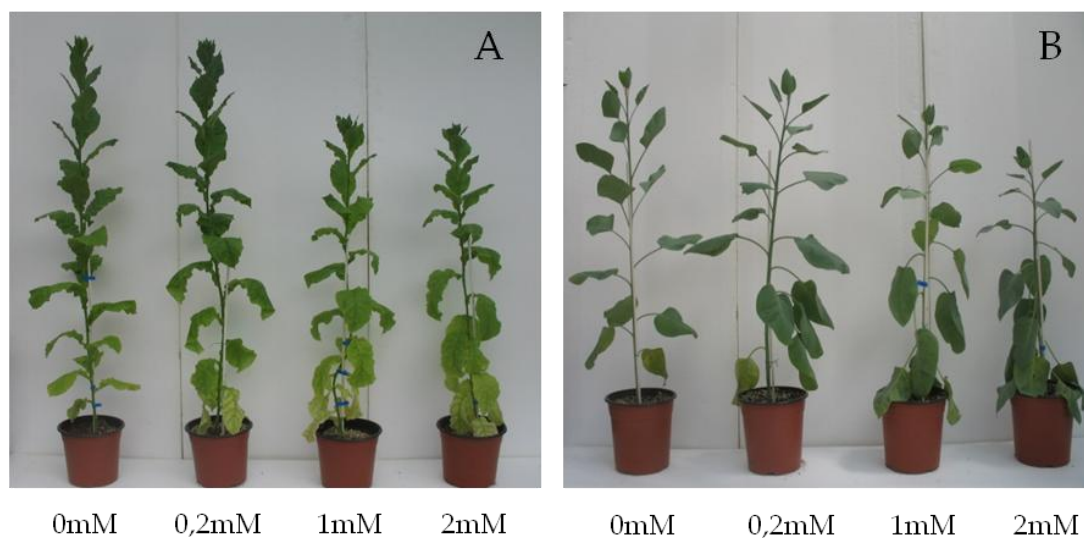
Η αύξηση της συγκέντρωσης του καδμίου στο έδαφος συνήθως προκαλεί επιδείνωση των παραμέτρων της φυσιολογίας των αναπτυσσόμενων σε αυτό φυτών (Cheng, 2003; Prasad, 2004). Η μείωση της αύξησης του φυτού, που εκφράζεται ως μειωμένος ρυθμός αύξησης ή μειωμένη βιομάζα, μπορεί να οφείλεται σε συγκεκριμένη τοξικότητα του μετάλλου στο φυτό, στον ανταγωνισμό με τις θρεπτικές ουσίες, σε μείωση της αφομοίωσης άνθρακα, σε παρεμπόδιση της διείσδυσης της ρίζας στο έδαφος ή σε παρεμπόδιση της φωτοσυνθετικής λειτουργίας (Prasad, 2004).



**Εικόνα 3.30** Μεταβολή του ύψους των φυτών κατά τη διάρκεια του πειράματος (έναρξη, 14, 28, 42 ημέρες) στις διαφορετικές συγκεντρώσεις καδμίου και στα δυο φυτικά είδη. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τυπικό σφάλμα 12 επαναλήψεων.

Στην παρούσα εργασία, όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.30 δεν εντοπίστηκε καμιά αρνητική επίδραση του Cd στο ύψος των φυτών νωρίτερα από τις 6 εβδομάδες. Μείωση παρατηρήθηκε μόνο στο τέλος του πειράματος και μόνο στις επεμβάσεις [Cd1] και [Cd2]. Η επέμβαση [Cd0,2], δεν προκάλεσε καμιά αρνητική επίδραση στην ανάπτυξη των φυτών και στα δυο

είδη, ενώ αντίθετα μέχρι τις 4 εβδομάδες είχε και θετική συνεισφορά. Παρόμοια θετική επίδραση των χαμηλών συγκεντρώσεων καδμίου έχει αναφερθεί και σε άλλες μελέτες για διαφορά φυτικά είδη, μεταξύ των οποίων και ο καπνός. Σημαντική αύξηση σημειώθηκε στο ύψος, το βάρος και τον αριθμό των φύλλων υπό την επίδραση 25ppm Cd σε φυτά *N. tabacum* (Clarke and Brennan, 1999) τόσο σε *in vivo* όσο και σε *in vitro* πειράματα, με θετική επίδραση σε καλλιέργεια κάλλων (Lugon-Moulin et al., 2006).



**Εικόνα 3.31** Τυχαία επιλεγμένα φυτά των τεσσάρων επεμβάσεων καδμίου (Cd) στο τέλος του πειράματος. A: *N. tabacum* και B: *N. glauca*.

Στην Εικόνα 3.31 εμφανίζεται ένα φυτό από κάθε επέμβαση και από τα δυο είδη πριν την απεγκατάσταση του πειράματος. Είναι αντιληπτές οι διαφορές στην ανάπτυξη που περιγράφηκαν παραπάνω καθώς και ορισμένα φαινόμενα τοξικότητας στα φύλλα. Αναλυτικότερη παρουσίαση των φαινομένων τοξικότητας δίνεται στον Πίνακα 3.9 και στην Εικόνα 3.32. Στο *N. tabacum* παρατηρούνται κατά κύριο λόγο χλωρωτικά φαινόμενα στα φύλλα, τα οποία γίνονται εντονότερα όσο αυξάνεται η συσσώρευση καδμίου και μάλιστα, στην επέμβαση [Cd2] τα φύλλα έχουν χάσει την σπαργή τους, με αποτέλεσμα να μαραθούν. Στο *N. glauca* τα συμπτώματα τοξικότητας ήταν περισσότερα σε αριθμό και σε ένταση και η αύξησή τους ακολουθεί την συσσώρευση του καδμίου στους ιστούς. Είναι λογικό στα φύλλα που

βρίσκονται πιο κοντά στη βάση στην επέμβαση [Cd2] να είναι το μέγιστο των φαινομένων αυτών. Όπως φαίνεται στον Πινάκα 3.9 στα φύλλα αυτά εντοπίζονται ιδιαίτερα έντονα συμπτώματα σε βαθμό που επέρχεται καταστροφή του φύλλου. Το πρώτο στη σειρά εμφάνισης σύμπτωμα είναι η ξήρανση του σημείου αποκοπής των φύλλων. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, το κάδμιο επάγει τη βιοσύνθεση αμπισοικού οξέος (ABA) σε αρκετά είδη φυτών και μυκήτων (Seregin and Ivanov, 2001; Talanova et al., 2000; Yürekli et al., 2004). Το ABA είναι αυξητικός αναστολέας και συνδέεται ιδιαίτερα με την αποκοπή φύλλων και καρπών. Μια ενδιαφέρουσα φυτική αντίδραση είναι και η αύξηση της συγκέντρωσης του ABA στα φύλλα φυτών που βρίσκονται σε υδατική καταπόνηση, ώστε να προκληθεί το κλείσιμο των στομάτων. Η αυξημένη συγκέντρωση ABA πιθανότατα να σχετίζεται άμεσα με τα συμπτώματα που παρατηρούνται στο *N. glauca* αφού η νέκρωση του σημείου αποκοπής στο οποίο επιδρά το ABA προκαλεί μάρανση, χλώρωση νεύρων και τελικά πτώση του φύλλου.



**Εικόνα 3.32** Χαρακτηριστικά συμπτώματα τοξικότητας στα φύλλα. Α: χλώρωση φύλλων στο *N. tabacum*, Β : μάρανση, χλώρωση και πτώση φύλλων του *N. glauca*, Γ: ξήρανση σημείου αποκοπής του φύλλου στο *N. glauca*.

**Πίνακας 3.9** Μακροσκοπικά συμπτώματα (ως προς το πλήθος και την ένταση) που παρουσίαζαν τα φυτά λίγο πριν την απεγκατάστασή τους.

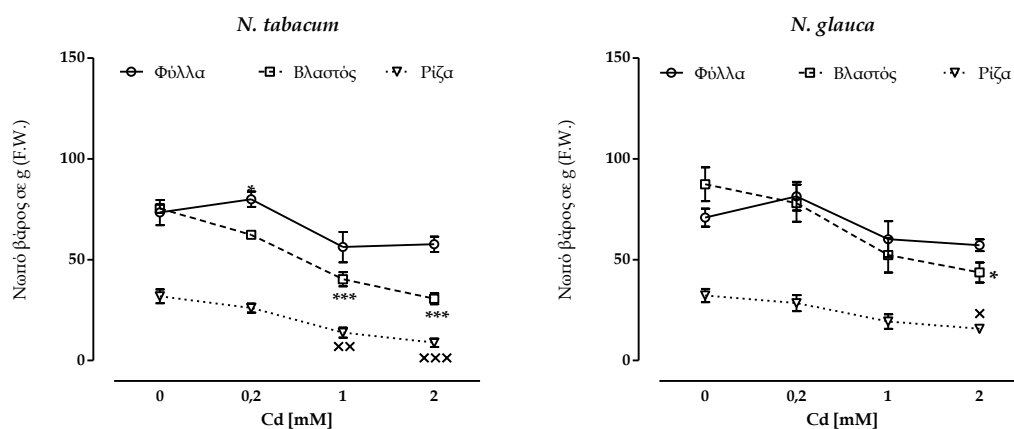
Τμήμα φυτού	Επεμβάσεις καδμίου			
	0mM	0,2mM	1mM	2mM
<i>N. tabacum</i>				
κορυφή	-	-	X1	X1
μέση πάνω	-	-	X1	X2
μέση κάτω	-	X1	X2	X3, M1
βάση	X1	X2	X3	X4, M1
<i>N. glauca</i>				
κορυφή	-	-	-	M1
μέση πάνω	-	-	M1, E1	M2, E2
μέση κάτω	-	M1, E1	M2, E2, XN2, NK1	M3, E3, XN2, NK1, ΠΦ2
βάση	NK1	M2, E1	M3, E3, XN3, NK1, ΠΦ1	M4, E3, XN3, NK1, ΠΦ3

X: χλώρωση, M: μάρανση, NK: νεκρωτικές κηλίδες, XN: χλώρωση νεύρων, E: ξήρανση σημείου αποκοπής, 1,2,3,4 : ένταση συμπτώματος

Ένα επιπλέον χαρακτηριστικό της ανάπτυξης των φυτών που μετρήθηκε είναι η νωπή βιομάζα των φύλλων, του βλαστού και της ρίζας. Η μέτρηση έγινε σε πέντε τυχαία φυτά ανά επέμβαση κατά την απεγκατάσταση του πειράματος και τα δεδομένα παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.32. Οι μετρήσεις ταυτίζονται με τις παραπάνω παρατηρήσεις αφού όπως φαίνεται, η ανάσχεση της αύξησης του φυτού είναι αντιληπτή και στη βιομάζα. Συγκεκριμένα μείωση της μάζας προκύπτει υπό τις επεμβάσεις [Cd1] και [Cd2] και στα δυο φυτικά είδη κυρίως στον βλαστό και τη ρίζα και λιγότερο στα φύλλα. Μάλιστα η επέμβαση [Cd0,2] επέδρασε θετικά στην αύξηση της μάζας των φύλλων. Η αύξηση αυτή της βιομάζας και του ύψους, ίσως οφείλεται στην αύξηση των θεικών αλάτων κυρίως ασβεστίου και μαγνησίου, λόγω της ανταγωνιστικής δράσης τους με το κάδμιο στο έδαφος,



μιας και το μέταλλο προστέθηκε ως θειικό άλας (Escrig and Morell, 1998; Temminghoff et al., 1995)



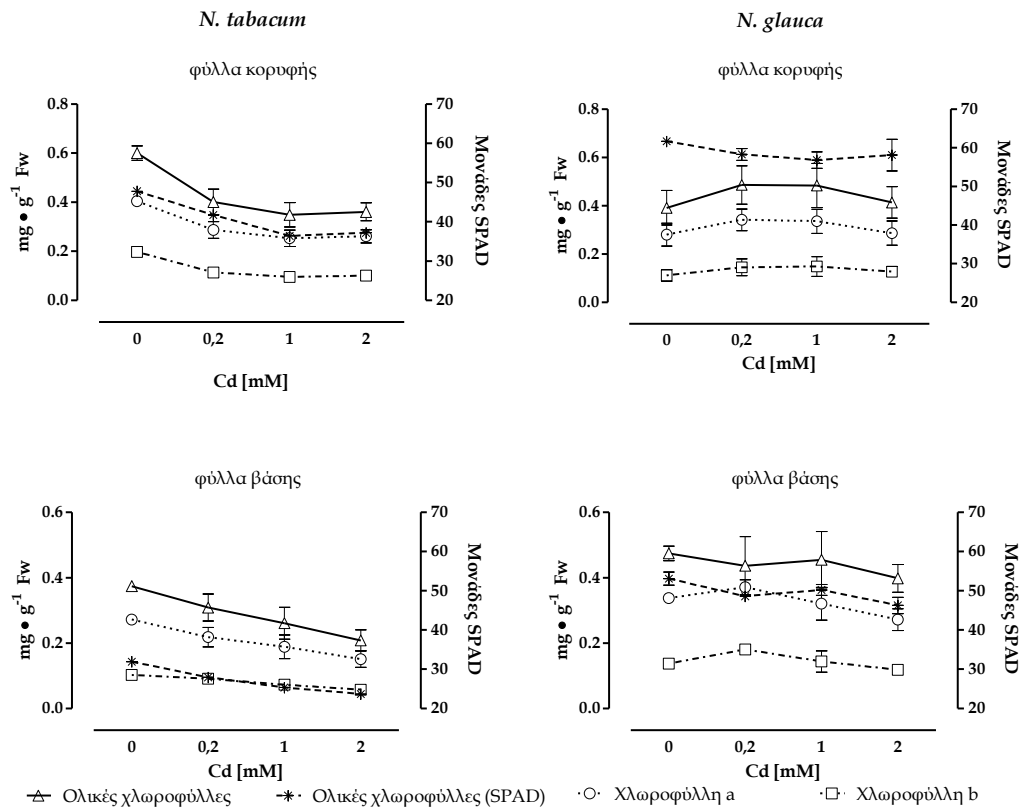
**Εικόνα 3.33** Βιομάζα (νωπό βάρος) ανά τμήμα φυτού (φύλλα, βλαστός, ρίζα) σε σχέση με τις διαφορετικές επεμβάσεις καδμίου. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τυπικό σφάλμα 6 επαναλήψεων.

### 3.3.3 Επίδραση καδμίου σε παραμέτρους της φωτοσύνθεσης

Όπως προαναφέρθηκε, το κάδμιο παρεμποδίζει την σύνθεση της χλωροφύλλης, όμως επιπλέον έχει βρεθεί να μεταβάλλει και την αναλογία μεταξύ της χλωροφύλλης a και χλωροφύλλης b του συμπλόκου συλλογής του φωτός II (LHCII). Είναι γενικά αποδεκτό ότι η χλώρωση είναι μια καλή πρώτη ένδειξη των συγκεντρώσεων χλωροφυλλών στα φύλλα. Σύμφωνα με τον Πίνακα 3.9, το φαινόμενο της χλώρωσης καταγράφηκε μόνο στο *N. tabacum* και εντονότερο στη βάση του φυτού ενώ τα συμπτώματα στο *N. glauca* ήταν εντελώς διαφορετικής φύσεως. Οι παρατηρήσεις αυτές επαληθεύουν τελικά το περιεχόμενο των χλωροφυλλών και στα δυο φυτικά είδη όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.34. Λόγω του πλήθους των μετρήσεων, η ανάλυση που ακολουθεί αφορά την επέμβαση [Cd<sup>2+</sup>].

Συγκεκριμένα, στα φύλλα βάσης του *N. tabacum* παρατηρήθηκε μείωση των ολικών χλωροφυλλών, και της χλωροφύλλης a και b κατά 44% ( $P < 0,05$ ). Στα

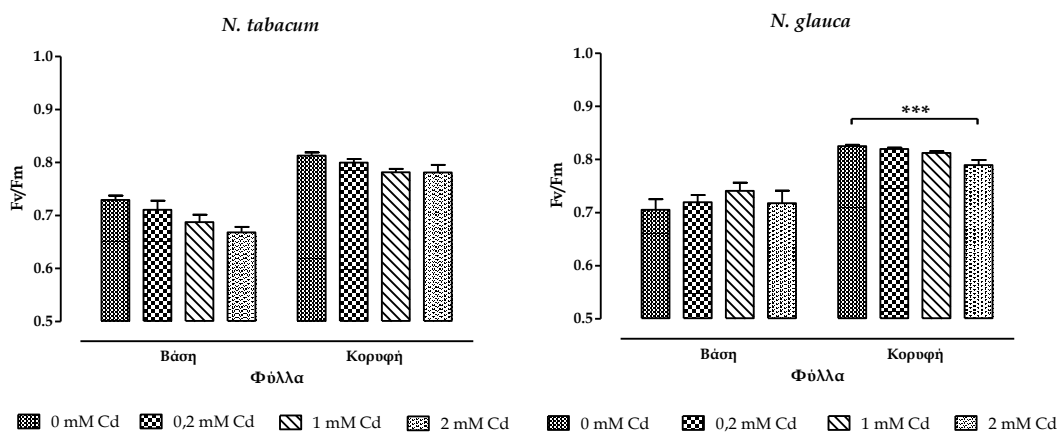
φύλλα κορυφής οι ολικές χλωροφύλλες μειώθηκαν κατά 40% ενώ οι χλωροφύλλες b και a παρουσίασαν μείωση κατά 50% και 35% αντίστοιχα. Συνεπώς ο λόγος a/b αυξήθηκε κατά 27% στη βάση, σε αντίθεση με την κορυφή που παρέμεινε αμετάβλητος. Όσον αφορά το *N. glauca*, δεν παρατηρήθηκε καμιά μεταβολή στην περιεκτικότητα χλωροφυλλών στην κορυφή αλλά ούτε και στην αναλογία a/b ενώ στην βάση το ποσοστό της μείωσης στις ολικές καθώς και επιμέρους, στην a και b δεν ξεπέρασε το 15%, ενώ ο λόγος a/b να μειώνεται κατά 7%.



**Εικόνα 3.34** Μεταβολή της συγκέντρωσης των φωτοσυνθετικών ουσιών (χλωροφύλλη a, χλωροφύλλη b, και ολικών χλωροφυλλών) στα φύλλα της βάσης και της κορυφής των φυτών *N. tabacum* και *N. glauca*. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τυπικό σφάλμα 3 επαναλήψεων. Για τις μονάδες SPAD n=12.

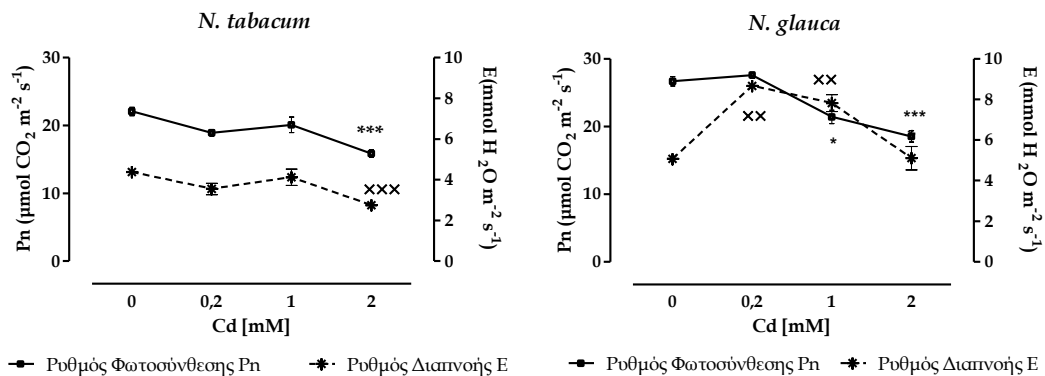
Η μέγιστη φωτοχημική αποτελεσματικότητα του φωτοσυστήματος II (Fv/Fm) παρουσίασε τάση μείωσης στο *N. tabacum*, τόσο στη βάση όσο και στην

κορυφή, ενώ αντίστοιχη μείωση παρατηρήθηκε στα φύλλα κορυφής του *N. glauca*. Δεδομένου ότι οι άριστες τιμές του  $F_v/F_m$  κυμαίνονται περί το 0.83 (Maxwell and Johnson, 2000), οι εδώ (Εικόνα 3.35) εμφανιζόμενες χαμηλότερες τιμές πιθανότατα σημαίνουν ότι το μέγιστο δυναμικό της φωτοχημικής αποδόσεως του φωτοσυστήματος II έχει μειωθεί προφανώς υπό την επίδραση καταπονήσεως. Στην προκειμένη περίπτωση είναι σαφής η επίδραση του καδμίου στη λειτουργία του φωτοσυστήματος II. Από την Εικόνα 3.35 φαίνεται επίσης η αποκλίνουσα απόδοση του φωτοσυστήματος II από το φυσιολογικό στα φύλλα βάσης αφού οι τιμές του  $F_v/F_m$  στα φυτά μάρτυρες είναι χαμηλότερες από το κατώτατο φυσιολογικό όριο που είναι 0,75 (Maxwell and Johnson, 2000). Το γεγονός αυτό μπορεί να ερμηνευτεί λαμβάνοντας υπόψη ότι στα φύλλα αυτά έχουν ανασταλεί οι περισσότερες φυσιολογικές λειτουργίες εξαιτίας της γήρανσης. Για το λόγο αυτό που οι μετρήσεις που παρουσιάζονται παρακάτω και αφορούν την ανταλλαγή αερίων της στοματικής συσκευής αναφέρονται μόνο στα φύλλα κορυφής.



**Εικόνα 3.35** Μέγιστη απόδοση του φωτοσυστήματος II ( $F_v/F_m$ ) στα φύλλα βάσης και κορυφής των φυτών *N. tabacum* και *N. glauca*. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τυπικό σφάλμα 12 επαναλήψεων. Οι μετρήσεις αφορούν την λήξη του πειράματος.

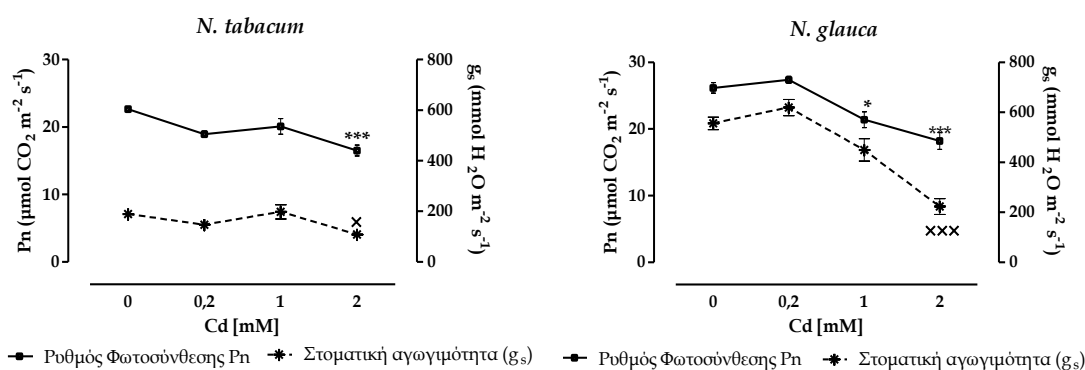
Σημαντική μείωση στο ρυθμό φωτοσύνθεσης και στα δυο φυτικά είδη, επέφερε η αύξηση της συγκέντρωσης καδμίου στις επεμβάσεις (Εικόνα 3.35). Στο *N. tabacum* η φωτοσυνθετική δραστηριότητα μειώθηκε κατά 31% στην επέμβαση [Cd2] ενώ παρόμοια μείωση 37% εντοπίστηκε στην διαπνοή. Όπως είναι γνωστό φωτοσύνθεση και διαπνοή είναι δυο παράλληλα εξελισσόμενες διεργασίες, οπότε ένας στοματικός περιορισμός είναι λογικό να επηρεάζει και τις δυο δραστηριότητες. Βέβαια στον κανόνα αυτό υπάρχουν εξαιρέσεις και αυτό αποδεικνύεται από τα αντίστοιχα δεδομένα για το *N. glauca* όπου ενώ ο ρυθμός φωτοσύνθεσης μειώθηκε κατά 30% σε σχέση με τον μάρτυρα δεν συνέβη και το ίδιο με την διαπνοή που παρέμεινε σχετικά αμετάβλητη. Αν όμως γίνει σύγκριση με την επέμβαση [Cd0,2] παρατηρείται ανάλογη μείωση κατά 40% και στη διαπνοή. Το φαινόμενο αυτό της αύξησης της διαπνοής υπό την επίδραση μικρών συγκεντρώσεων καδμίου δεν είναι σύνηθες ωστόσο έχει παρατηρηθεί και σε άλλα φυτά χωρίς όμως να έχει αποσαφηνιστεί γιατί συμβαίνει (Greger and Johansson, 1992; Sayed, 1997).



**Εικόνα 3.36** Μεταβολή του ρυθμού φωτοσύνθεσης (Pn) και του ρυθμού διαπνοής των φύλλων κορυφής και των δυο ειδών υπό την επίδραση των επεμβάσεων καδμίου. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι ± τυπικό σφάλμα 12 επαναλήψεων. Οι μετρήσεις αφορούν την λήξη του πειράματος.

Είναι γνωστό ότι η κατάσταση της στοματικής συσκευής επηρεάζει άμεσα τόσο τον ρυθμό φωτοσύνθεσης όσο και την ένταση διαπνοής. Η στοματική

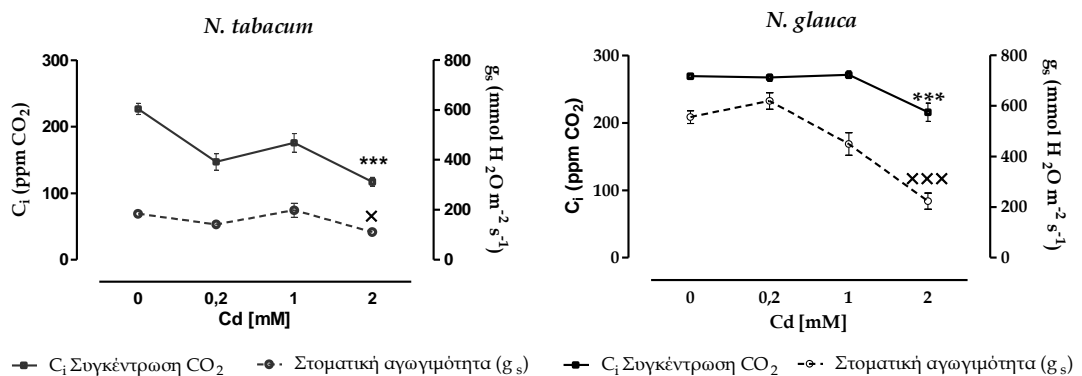
αγωγιμότητα έχει δείχθει στην παρούσα μελέτη, αλλά και από πληθώρα άλλων εργασιών ότι επηρεάζεται δυσμενώς από την παρουσία βαρέων μετάλλων. Η μείωση της στοματικής αγωγιμότητας που προκαλείται από το κάδμιο φαίνεται να οφείλεται κυρίως σε δυο καταστάσεις που κατά κανόνα συνυπάρχουν. Άμεσα με την παρεμβολή του Cd στα ιοντικά κανάλια καλίου και ασβεστίου στα καταφρακτικά κύτταρα των στομάτων, που οδηγεί σε αδυναμία οσμωρύθμισης και κλείσιμο των στομάτων. Έμμεσα, εξαιτίας της αδυναμίας πρόσληψης και μεταφοράς νερού λόγω βλαβών στην ρίζα και στο σύστημα μεταφοράς νερού. Δεν είναι λοιπόν δύσκολο να εξηγηθεί η μείωση της διαπνοής και της φωτοσύνθεσης, αν ληφθεί υπόψιν η μείωση της στοματικής αγωγιμότητας που προκαλείται από την παρουσία καδμίου.



**Εικόνα 3.37** Μεταβολή του ρυθμού φωτοσύνθεσης (Pn) και της στοματικής αγωγιμότητας (gs) των φύλλων κορυφής και των δυο ειδών υπό την επίδραση των επεμβάσεων καδμίου. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τυπικό σφάλμα 12 επαναλήψεων. Οι μετρήσεις αφορούν την λήξη του πειράματος.

Επιπρόσθετα, απόδειξη του στοματικού περιορισμού που ασκείται στη φωτοσύνθεση είναι η μείωση CO<sub>2</sub> δηλαδή του βασικού υποστρώματος για να ξεκινήσει η αφομοιωτική λειτουργία (Εικόνα 3.38). Είτε άμεσα είτε έμμεσα, είναι αντιληπτό ότι η αύξηση των συγκεντρώσεων καδμίου στις επεμβάσεις επιδρά αρνητικά στην στοματική αγωγιμότητα και στα δυο είδη φυτών (Εικόνα 3.37). Στο *N. tabacum*, η μείωση της στοματικής αγωγιμότητας στην μεταχείριση [Cd2] είναι της τάξης του 40% ενώ στο *N. glauca* είναι ακόμη

μεγαλύτερη πλησιάζοντας το 59%. Βεβαία, η μεγαλύτερη μείωση στο *N. glauca* είναι πιθανόν να οφείλεται και στην παρουσία ABA όπως περιγράφηκε νωρίτερα. Ως επακόλουθο της μείωσης της στοματικής αγωγιμότητα είναι η μειωμένη εισροή του CO<sub>2</sub> στην υποστοματική κοιλότητα και συνεπώς η μειωμένη παρουσία του στα κέντρα αντιδράσεων της φωτοσυνθετικής λειτουργίας. Αυτό επιβεβαιώνεται από την Εικόνα 3.38 όπου στην επέμβαση [Cd2] παρατηρείται μείωση κατά 49% της συγκέντρωσης CO<sub>2</sub> στο *N. tabacum* και κατά 20% στο *N. glauca*.



**Εικόνα 3.38** Στοματική αγωγιμότητα (g<sub>s</sub>) και συγκέντρωση CO<sub>2</sub> στους μεσοκυττάριους χώρους (C<sub>i</sub>) των φύλλων κορυφής και των δυο ειδών υπό την επίδραση των επεμβάσεων καδμίου. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι ± τυπικό σφάλμα 12 επαναλήψεων. Οι μετρήσεις αφορούν την λήξη του πειράματος.

### 3.3.4 Οξειδωτική καταπόνηση

Όλοι οι παράγοντες καταπόνησης, βιοτικοί και αβιοτικοί, είναι γνωστοί ότι προκαλούν οξειδωτική καταπόνηση στα φυτά λόγω της αύξησης του ρυθμού παραγωγής ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS). Τα βαρέα μέταλλα λοιπόν συμπεριλαμβανομένου και του καδμίου ως αβιοτικοί παράγοντες καταπόνησης προκαλούν οξειδωτική καταπόνηση στα φυτά λόγω της δημιουργίας ROS οι οποίες στην συνέχεια αποδομούν σημαντικά από βιολογική άποψη μόρια, όπως τα λιπίδια των μεμβρανών, πρωτεΐνες, χρωστικές των χλωροπλαστών, τα ένζυμα, τα νουκλεϊκά οξέα. Για την

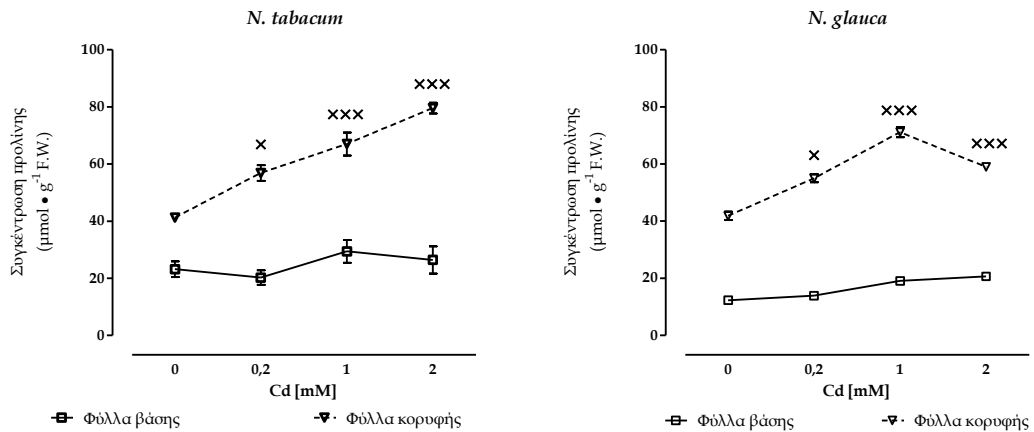
εξουδετέρωση των τοξικών ελευθέρων ριζών τα φυτά διαθέτουν αμυντικούς μηχανισμούς που περιλαμβάνουν αντιοξειδωτικά ένζυμα και ορισμένους μεταβολίτες με αποτέλεσμα την προστασία τους από τις καταστρεπτικές οξειδωτικές αντιδράσεις, την προσαρμογή και επιβίωσή τους (Καραμπουρνιώτης, 2003; Κωνσταντινίδου, 2003).

#### 3.3.4.1 Μη ενζυμικός αντιοξειδωτικός μηχανισμός

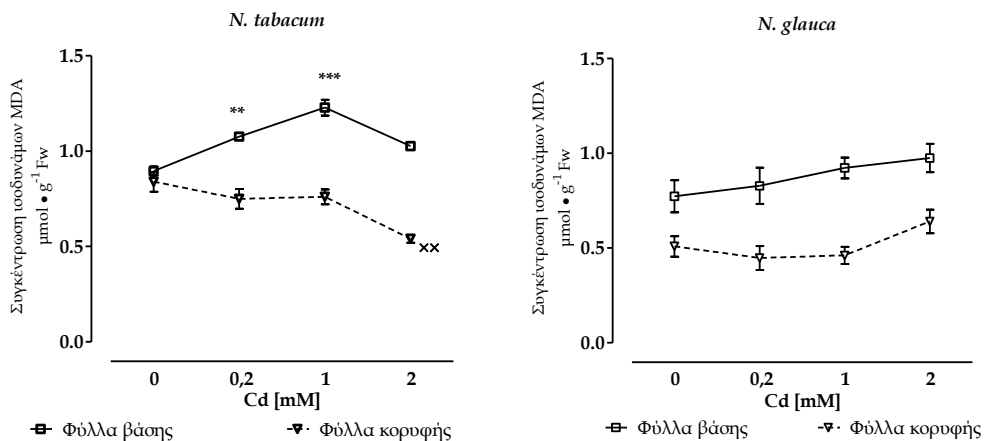
Στην παρούσα εργασία η συγκέντρωση του καδμίου επηρέασε τα επίπεδα προλίνης με τρόπο παρόμοιο όπως και στην περίπτωση των Zn και Ni (Εικόνα 3.39). Αυτό αποδεικνύει ότι η προλίνη αποτελεί άμυνα πρώτης γραμμής και στα δυο φυτικά είδη αφού εντοπίζεται κυρίως στα νεαρότερα φύλλα και λιγότερο στα μεγαλύτερης ηλικίας φύλλα, στην βάση των φυτών (Εικόνα 3.39). Σημαντική αύξηση παρατηρήθηκε και στα δυο είδη στα φύλλα κορυφής. Συγκεκριμένα στο *N. tabacum* η αύξηση μεταξύ του μάρτυρα και της επέμβασης [Cd2] κυμάνθηκε στο 92% και στο *N. glauca* στο 41%, μειούμενη από το 71% που παρατηρείται στην επέμβαση [Cd1]. Αντίστοιχα, στα φύλλα βάσης, η προλίνη αυξήθηκε κατά 13% στο *N. tabacum* και κατά 41% στο *N. glauca*, χωρίς ωστόσο οι αυξήσεις αυτές να χαρακτηρίζονται στατιστικά σημαντικές.

Επιβεβαίωση του σημαντικού ρόλου της προλίνης αποτελούν και οι μετρήσεις των ισοδυνάμων μαλονδιαλδεΐδης που παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.40. Όπως φαίνεται η προλίνη εκτός της οσμωρύθμισης προστατεύει τις μεμβράνες των κυττάρων και των οργανιδίων από την οξείδωση που προκαλούν οι ROS. Πιθανή απόδειξη αποτελεί το γεγονός της σημαντικής μείωσης των ισοδυνάμων MDA στα φύλλα κορυφής του *N. tabacum*, όσο η συγκέντρωση της προλίνης αυξάνει. Παρομοίως στο *N. glauca* τα ισοδύναμα MDA είναι ελαφρώς μειούμενα στις επεμβάσεις που η συγκέντρωση προλίνης αυξάνεται ενώ αντίθετα στην επέμβαση [Cd2] όπου η προλίνη

μειώνεται σε σχέση με τη επέμβαση [Cd1], η συγκέντρωση των ισοδυνάμων MDA αυξάνει. Εξάλλου, στα φύλλα της βάσης και των δυο φυτικών ειδών όπου η συγκέντρωση προλίνης είναι σε χαμηλά επίπεδα, η συγκέντρωση των ισοδυνάμων MDA είναι αυξημένη.



**Εικόνα 3.39** Επίπεδα προλίνης στους ιστούς των φύλλων της βάσης και της κορυφής των φυτών *N. tabacum* και *N. glauca*. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τυπικό σφάλμα 3 επαναλήψεων.

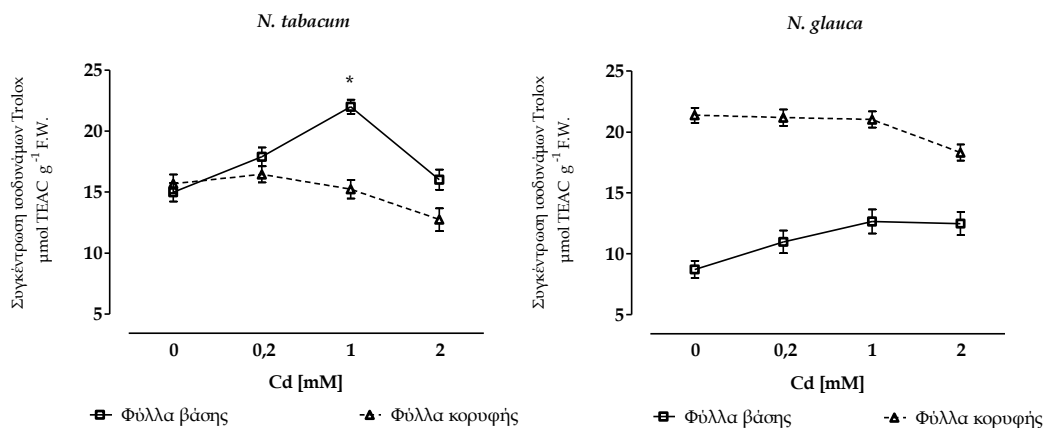


**Εικόνα 3.40** Εκτίμηση της υπεροξειδωσης των λιπιδίων εκφρασμένη σε ισοδύναμα MDA. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τυπικό σφάλμα 3 επαναλήψεων.

Μια συνολική εικόνα για την κατάσταση του αντιοξειδωτικού μηχανισμού των φυτών δίνεται από τις μετρήσεις των ισοδυνάμων Trolox που εκφράζουν



την αντιοξειδωτική ικανότητα. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.41 στα φύλλα βάσης του *N. tabacum* σημειώνεται αύξηση των ισοδυνάμων Trolox έως και 47% στην επέμβαση [Cd1] ενώ η αύξηση στην επέμβαση [Cd2] δεν ξεπέρασε το 6% σε σχέση με τον μάρτυρα. Παράλληλα η μεγαλύτερη μείωση 18% παρατηρήθηκε στα φύλλα κορυφής στην επέμβαση [Cd2]. Αντίστοιχα στο *N. glauca* η μείωση στην κορυφή δεν ξεπέρασε το 15% και στη βάση η αύξηση το 43%.

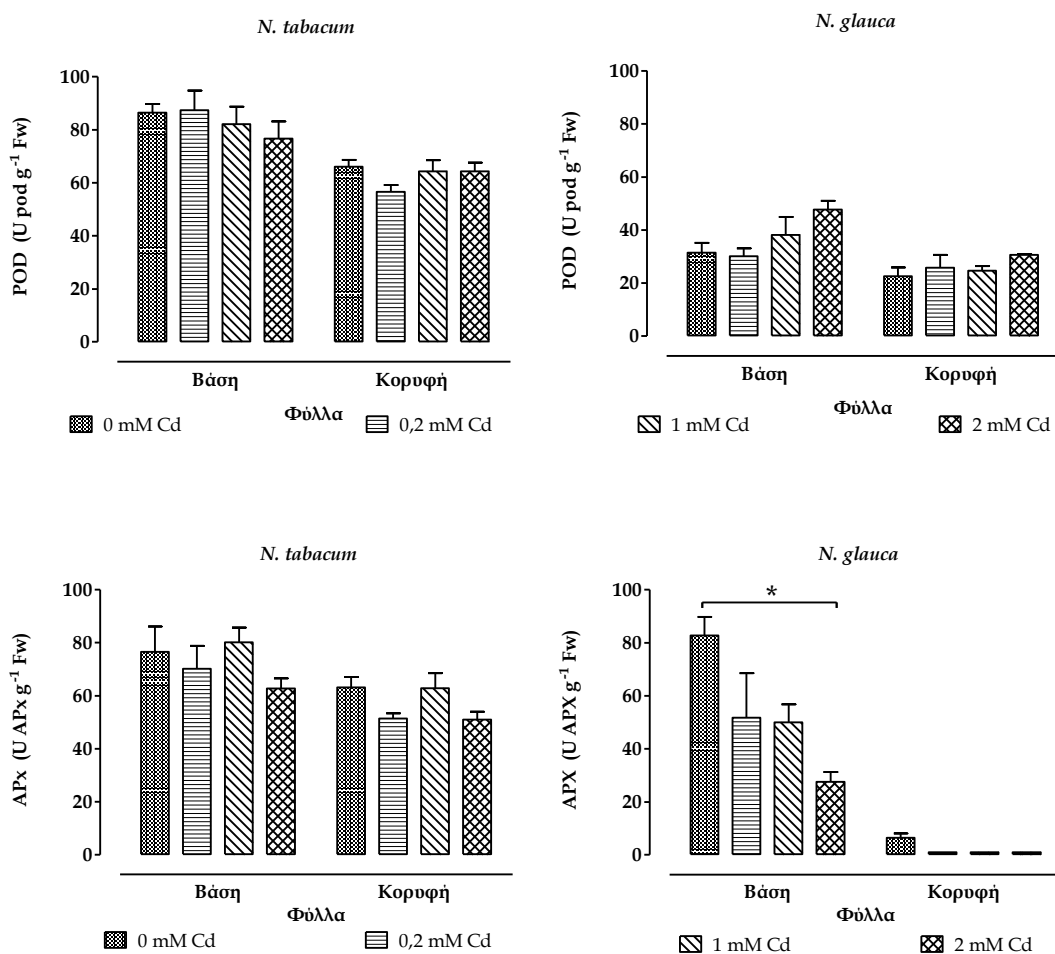


**Εικόνα 3.41** Αντιοξειδωτική ικανότητα (ισοδύναμα Trolox) στα φύλλα της βάσης και της κορυφής των φυτών *N. tabacum* και *N. glauca*. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τυπικό σφάλμα 3 επαναλήψεων.

### 3.3.4.2 Ενζυμικός αντιοξειδωτικός μηχανισμός

Ταυτόσημα αποτελέσματα όσον αφορά τα αντιοξειδωτικά ένζυμα με τον ψευδάργυρο και το νικέλιο καταγραφήκαν και στην περίπτωση του καδμίου με εξαίρεση τη μείωση της αντιοξειδωτικής δράσης της APX στα φύλλα βάσης του *N. glauca*. Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.42 η ενζυμική δραστηριότητα και των δυο ενζύμων μειώθηκε συνολικά στα φύλλα του *N. tabacum*. Σημαντική μείωση υπέστη και η δραστηριότητα της APX στα φύλλα βάσης του *N. glauca* σε αντίθεση με τα μέχρι τώρα δεδομένα για τα μέταλλα Zn και Ni, επιβεβαιώνοντας την διαφορετική επιρροή των μετάλλων στους

επιμέρους μηχανισμούς των φυτών. Τέλος, μικρή αύξηση παρατηρήθηκε στην δράση της POD, σε φύλλα βάσης και κορυφής του *N. glauca*.



**Εικόνα 3.42** Ενζυμική δραστηριότητα, Α: της υπεροξειδάσης (POD), Β: της ασκορβικής υπεροξειδάσης (APX). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τυπικό σφάλμα 3 επαναλήψεων.

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, σε σχέση με τα επίπεδα των αντιοξειδωτικών ενζύμων που μελετήθηκαν, συμφωνούν με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, όπου αναφέρεται διαφοροποιημένη δραστηριότητα των ενζύμων ανάλογα με το φυτικό είδος, τη συγκέντρωση που εφαρμόζεται, τις πειραματικές συνθήκες, αλλά και την χρονική διάρκεια της καταπόνησης (Domínguez et al., 2010; Gajewska and Skłodowska, 2007; Seregin and Ivanov, 2001; Szollosi et al., 2009).

---

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ

### Συμπεράσματα & Προοπτικές

---

#### 4.1 Συμπεράσματα-προοπτικές

Η αύξηση των συγκεντρώσεων βαρέων μετάλλων στο περιβάλλον και η συνεπακόλουθη πρόκληση τοξικοτήτων σε όλο το φάσμα των ζωντανών οργανισμών, αποτελεί σήμερα μείζον περιβαλλοντικό πρόβλημα. Τρία από τα πλέον συχνότερα συναντώμενα βάρεια μέταλλα είναι τα Zn, Ni και Cd και τα οποία προκαλούν στα φυτά ποικίλες μορφολογικές και βιοχημικές δυσλειτουργίες. Τα φυτικά είδη *N. tabacum* και *N. glauca*, λόγω διαφόρων χαρακτηριστικών τους όπως πλούσια βιομάζα, βαθύ ριζικό σύστημα, ανοχή σε βαρέα μέταλλα, παρουσιάζουν ενδιαφέρον για αξιοποίηση σε εφαρμογές αποκατάστασης υποβαθμισμένων περιοχών. Στην παρούσα εργασία έγινε συγκριτική μελέτη της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων των τριών μετάλλων σε μακροσκοπικές και βιοχημικές παραμέτρους των δύο φυτικών ειδών με εστίαση σε παραμέτρους του αντιοξειδωτικού μηχανισμού των φυτών.

Με βάση τα αποτελέσματα της εργασίας, τα υπό εξέταση φυτικά είδη φαίνεται να είναι ανθεκτικά και στα τρία μέταλλα που δοκιμάστηκαν, δεδομένου των περιορισμένων μακροσκοπικών συμπτωμάτων τοξικότητας που παρουσίασαν ακόμα και σε κατά πολύ υψηλότερες από τις επιτρεπτές συγκεντρώσεις των μετάλλων στο υπόστρωμα καλλιέργειας. Στη διαπίστωση αυτή συνηγορεί το γεγονός ότι η ανάπτυξη των φυτών παρέμεινε σχετικά ανεπηρέαστη, η ανάσχεση της φωτοσυνθετικής λειτουργίας ήταν περιορισμένη, ενώ ο αντιοξειδωτικός μηχανισμός ανταποκρίθηκε ικανοποιητικά έναντι της καταπόνησης που επιφέρουν τα μέταλλα.

Αναλυτικότερα, όσον αφορά τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των φυτών, τόσο του *N. tabacum* όσο και του *N. glauca*, η οποιαδήποτε σοβαρή αρνητική επίδραση των μετάλλων εντοπίστηκε κυρίως στις επεμβάσεις με την υψηλότερη συγκέντρωση στο υπόστρωμα καλλιέργειας. Αντίθετα στις μεταχειρίσεις με τις δυο πιο χαμηλές συγκεντρώσεις των μετάλλων, των

οποίων το επίπεδο ρύπανσης είναι απαντώμενο και στην πραγματικότητα, τα συμπτώματα τοξικότητας που εμφανίστηκαν ήταν αρκετά περιορισμένα, η συνολική παραγόμενη βιομάζα δεν επηρεάστηκε σημαντικά, ενώ το ύψος των φυτών παρουσίασε μικρή αύξηση και στα δυο φυτικά είδη.

Παρόμοια επίδραση της συγκέντρωσης των μετάλλων διαπιστώθηκε και στην φωτοσυνθετική λειτουργία των *N. tabacum* και *N. glauca*. Συγκεκριμένα τα επίπεδα χλωροφυλλών, ο επαγωγικός φθορισμός των χλωροφυλλών (Fv/Fm) και ο ρυθμός της φωτοσύνθεσης (Pn) δεν διαφοροποιήθηκαν σημαντικά από το φυσιολογικό, στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις των μετάλλων, όπως άλλωστε και οι παράμετροι διαπνοή, στοματική αγωγιμότητα, και εσωτερικό περιεχόμενο CO<sub>2</sub>.

Όσον αφορά τον αντιοξειδωτικό μηχανισμό των φυτών φαίνεται ότι τα βαρέα μέταλλα μέσω της καταπόνησης σε διάφορους φυσιολογικούς μηχανισμούς, άμεσα ή έμμεσα, εν τέλει οδηγούν σε περίσσεια ROS στους ιστούς. Οι ROS είναι η αιτία της υπεροξειδωσης των λιπιδίων που παρατηρήθηκε και στα δυο φυτικά είδη υπό την επίδραση των τριών μετάλλων που μελετήθηκαν. Βέβαια, σε γενικές γραμμές, μπορεί να προκλήθηκε μείωση της δραστηριότητας του ενζυμικού μηχανισμού εξαιτίας της έντονης αλλά κυρίως της παρατεταμένης καταπόνησης, ωστόσο τα φυτά ανταποκρίθηκαν με αύξηση την συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας εκφραζόμενη σε ισοδύναμα Trolox.

Τα δύο φυτικά είδη παρουσίασαν παρόμοια πρότυπα πρόσληψης και μετακίνησης των μετάλλων τα οποία έδειξαν κινητικότητα από τις ρίζες στο υπέργειο τμήμα των φυτών. Τα μέταλλα ανιχνεύτηκαν σε μεγάλες συγκεντρώσεις στους ιστούς της ρίζας αλλά και στα γηραιότερα φύλλα. Αυξανόμενη μάλιστα της συγκέντρωσης των μετάλλων στο υπόστρωμα, παρατηρήθηκε αύξηση της συσσώρευσης των στοιχείων σε όλους τους υπό εξέταση φυτικούς ιστούς. Η μεγάλη συσσώρευση μετάλλων στους υπέργειους

ιστούς και των δυο φυτικών ειδών και ειδικότερα του καδμίου, συνδυαζόμενη με τη μεγάλη βιομάζα που παρουσιάζουν τα φυτά αυξάνει την τελική απομάκρυνση των μετάλλων από το έδαφος. Με βάση τα δεδομένα αυτά αναδεικνύεται η ανάγκη ενδελεχούς έρευνας, με εφαρμογές πεδίου, των υπό εξέταση φυτών ώστε να διερευνηθεί περαιτέρω η καταλληλότητά τους για φυτοαποκατάσταση εδαφών. Επιπλέον, σημαντικές πληροφορίες θα μπορούσαν να προκύψουν από τη μελέτη της ανταπόκρισης των *N. tabacum* και *N. glauca* στα πλαίσια της χημικά υποβοηθούμενης φυτοσυσσώρευσης.

Τέλος τα φυτά αυτά μπορούν να αποτελέσουν και αντικείμενο βιοτεχνολογικών προσεγγίσεων με μεταφορά γονιδίων ανθεκτικότητας και συσσώρευσης μετάλλων από φυτά υπερευαλωτά που ήδη έχουν μελετηθεί εκτενώς.

---

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

---

- Alloway B.J. (1995) Heavy Metals in Soils. 2nd Edition ed. Blackie Academic and Professional, London.
- Anderson C.W.N., Brooks R.R., Chiarucci A., LaCoste C.J., Leblanc M., Robinson B.H., Simcock R., Stewart R.B. (1999) Phytomining for nickel, thallium and gold. *Journal of Geochemical Exploration* 67:407-415.
- Apel K., Hirt H. (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55:373-99.
- Arnau G., Monneveux P., This D., Alegre L. (1997) Photosynthesis of six barley genotypes as affected by water stress. *Photosynthetica* 34:67-76.
- Atta-Aly M.A. (1999) Effect of nickel addition on the yield and quality of parsley leaves. *Scientia Horticulturae* 82:9-24.
- Azevedo Neto A.D., Prisco J.T., Eneas-Filho J., Medeiros J.V., Gomes-Filho E. (2005) Hydrogen peroxide pre-treatment induces salt-stress acclimation in maize plants. *J Plant Physiol* 162:1114-22.
- Baccouch S., Chaoui A., Ferjani E.E. (1998) Nickel-induced oxidative damage and antioxidant responses in *Zea mays* shoots. *Plant Physiology and Biochemistry* 36:689-694.
- Bacelar E.A., Santos D.L., Moutinho-Pereira J.M., Gonçalves B.C., Ferreira H.F., Correia C.M. (2006) Immediate responses and adaptative strategies of three olive cultivars under contrasting water availability regimes: Changes on structure and chemical composition of foliage and oxidative damage. *Plant Science* 170:596-605.
- Bacon M. (2004) *Water Use Efficiency in Plant Biology* Wiley-Blackwell, Oxford.
- Baker A.J.M., Walker P.L. (1989) Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants, in: A. Jonathan Shaw (Ed.), *Heavy Metal Tolerance in Plants: Evolutionary Aspects*, CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 155-173.
- Barazani O., Sathiyamoorthy P., Manandhar U., Vulkan R., Golan-Goldhirsh A. (2004) Heavy metal accumulation by *Nicotiana glauca* Graham in a solid waste disposal site. *Chemosphere* 54:867-872.
- Baryl A., Laborde C., Montillet J.L., Triantaphylidès C., Chagvardieff P. (2000) Evaluation of lipid peroxidation as a toxicity bioassay for plants exposed to copper. *Environmental Pollution* 109:131-135.



- Bassi R., Sharma S.S. (1993) Changes in Proline Content Accompanying the Uptake of Zinc and Copper by *Lemna minor*. *Annals of Botany* 72:151-154.
- Bates L.S., Waldren R.P., Teare I.D. (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* 39:205-207.
- Baycu G., Tolunay D., Ozden H., Gunebakan S. (2006) Ecophysiological and seasonal variations in Cd, Pb, Zn, and Ni concentrations in the leaves of urban deciduous trees in Istanbul. *Environ Pollut* 143:545-54.
- Bethke P.C., Drew M.C. (1992) Stomatal and Nonstomatal Components to Inhibition of Photosynthesis in Leaves of *Capsicum annuum* during Progressive Exposure to NaCl Salinity. *Plant Physiol.* 99:219-226.
- Bolan N.S., Adriano D., Naidu R., Rogers S., Gupta V., Kookana R.S. (2003) Bioavailability of metals in the soil-plant environment and its potential role in risk assessment.
- Boominathan R., Doran P.M. (2002) Ni-induced oxidative stress in roots of the Ni hyperaccumulator, *Alyssum bertolonii*. *New Phytologist* 156:205-215.
- Boscolo P.R., Menossi M., Jorge R.A. (2003) Aluminum-induced oxidative stress in maize. *Phytochemistry* 62:181-9.
- Boyd R., Martens S. (1998) Nickel hyperaccumulation by *Thlaspi montanum* var. *montanum* (Brassicaceae): a constitutive trait. *Am. J. Bot.* 85:259-.
- Broadley M.R., White P.J., Hammond J.P., Zelko I., Lux A. (2007) Zinc in plants. *New Phytologist* 173:677-702.
- Brown S.L., Angle J.S., Chaney R.L., Baker A.J.M. (1995) Zinc and Cadmium Uptake by Hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* Grown in Nutrient Solution. *Soil Sci Soc Am J* 59:125-133.
- Callahan D.L., Roessner U., Dumontet V., Perrier N., Wedd A.G., O'Hair R.A.J., Baker A.J.M., Kolev S.D. (2008) LC-MS and GC-MS metabolite profiling of nickel(II) complexes in the latex of the nickel-hyperaccumulating tree *Sebertia acuminata* and identification of methylated aldaric acid as a new nickel(II) ligand. *Phytochemistry* 69:240-251.
- Callender E. (2003) Heavy Metals in the Environment--Historical Trends, in: D. H. Heinrich and K. T. Karl (Eds.), *Treatise on Geochemistry*, Pergamon, Oxford. pp. 67-105.

- Chaney R.L. (1993) Zinc phytotoxicity, in: A. D. Robson (Ed.), Zinc in soils and plants, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Chaney R.L., Angle J.S., Broadhurst C.L., Peters C.A., Tappero R.V., Sparks D.L. (2007) Improved Understanding of Hyperaccumulation Yields Commercial Phytoextraction and Phytomining Technologies. *J Environ Qual* 36:1429-1443.
- Chardonnens A.N., Koevoets P.L.M., van Zanten A., Schat H., Verkleij J.A.C. (1999) Properties of Enhanced Tonoplast Zinc Transport in Naturally Selected Zinc-Tolerant *Silene vulgaris*. *Plant Physiol.* 120:779-786.
- Chartzoulakis K., Patakas A., Kofidis G., Bosabalidis A., Nastou A. (2002) Water stress affects leaf anatomy, gas exchange, water relations and growth of two avocado cultivars. *Scientia Horticulturae* 95:39-50.
- Chaves M.M., Osorio J., Pereira J.S. (2004) Water use efficiency and photosynthesis, in: M. Bacon (Ed.), *Water Use Efficiency in Plant Biology*, Wiley-Blackwell, Oxford. pp. 42-74.
- Cheng S. (2003) Effects of Heavy metals on plants and resistance mechanisms. *Environmental Science and Pollution Research* 10:256-264.
- Choi C.W., Kim S.C., Hwang S.S., Choi B.K., Ahn H.J., Lee M.Y., Park S.H., Kim S.K. (2002) Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Science* 163:1161-1168.
- Choi Y.E., Harada E., Wada M., Tsuboi H., Morita Y., Kusano T., Sano H. (2001) Detoxification of cadmium in tobacco plants: formation and active excretion of crystals containing cadmium and calcium through trichomes. *Planta* 213:45-50.
- Choudhary M., Jetley U.K., Abash Khan M., Zutshi S., Fatma T. (2007) Effect of heavy metal stress on proline, malondialdehyde, and superoxide dismutase activity in the cyanobacterium *Spirulina platensis*-S5. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 66:204-209.
- Christophoridis C., Dedepsidis D., Fytianos K. (2009) Occurrence and distribution of selected heavy metals in the surface sediments of Thermaikos Gulf, N. Greece. Assessment using pollution indicators. *Journal of Hazardous Materials* 168:1082-1091.
- Cifre J., Bota J., Escalona J.M., Medrano H., Flexas J. (2005) Physiological tools for irrigation scheduling in grapevine (*Vitis vinifera* L.): An open gate to improve water-use efficiency? *Agriculture, Ecosystems & Environment* 106:159-170.

- Clarke B.B., Brennan E. (1989) Differential cadmium accumulation and phytotoxicity in sixteen tobacco cultivars. *Journal of the Air and Waste Management Association* 39:1319-1322.
- Clarke B.B., Brennan E. (1999) Differential cadmium accumulation and phytotoxicity in sixteen tobacco cultivars. *Journal of the Air and Waste Management Association* 39:1319-1322.
- Clemens S. (2001) Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* 212:475-86.
- Clemens S., Palmgren M.G., Krämer U. (2002) A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends in Plant Science* 7:309-315.
- Cobbett C., Goldsbrough P. (2002) Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu Rev Plant Biol* 53:159-82.
- Cuiyun Chen, Dejun Huang, Jianquan Liu. (2009) Functions and Toxicity of Nickel in Plants: Recent Advances and Future Prospects. *Clean - Soil, Air, Water* 37:304-313.
- Cunningham S.D. (1996) Phytoremediation of Soils Contaminated with Organic Pollutants. *Advances in Agronomy* 56:55-114.
- Dermont G., Bergeron M., Mercier G., Richer-Lafèche M. (2008) Soil washing for metal removal: A review of physical/chemical technologies and field applications. *Journal of Hazardous Materials* 152:1-31.
- Desikan R., S A.H.-M., Hancock J.T., Neill S.J. (2001) Regulation of the Arabidopsis transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiol* 127:159-72.
- Domínguez D.M., García F.C., Raya A.C., Santiago R.T. (2010) Cadmium-induced oxidative stress and the response of the antioxidative defense system in *Spartina densiflora*. *Physiologia Plantarum* 139.
- Doroszewska T., Berbec A. (2004) Variation for cadmium uptake among *Nicotiana* species. *Genetic Resources and Crop Evolution* 51:323-333.
- Escrig I., Morell I. (1998) Effect of Calcium on the Soil Adsorption of Cadmium and Zinc in Some Spanish Sandy Soils. *Water, Air, and Soil Pollution* 105:507-520.
- Finzgar N., Lestan D. (2008) The two-phase leaching of Pb, Zn and Cd contaminated soil using EDTA and electrochemical treatment of the washing solution. *Chemosphere* 73:1484-1491.

- Freeman J.L., Quinn C.F., Marcus M.A., Fakra S., Pilon-Smits E.A.H. (2006) Selenium-Tolerant Diamondback Moth Disarms Hyperaccumulator Plant Defense. *Current Biology* 16:2181-2192.
- Gajewska E., Skłodowska M. (2005) Antioxidative responses and proline level in leaves and roots of pea plants subjected to nickel stress. *Acta Physiologiae Plantarum* 27:329-340.
- Gajewska E., Skłodowska M. (2007) Effect of nickel on ROS content and antioxidative enzyme activities in wheat leaves. *BioMetals* 20:27-36.
- Gajewska E., Skłodowska M., Słaba M., Mazur J. (2006) Effect of nickel on antioxidative enzyme activities, proline and chlorophyll contents in wheat shoots. *Biologia Plantarum* 50:653-659.
- Gardea-Torresdey J.L., Peralta-Videa J.R., de la Rosa G., Parsons J.G. (2005) Phytoremediation of heavy metals and study of the metal coordination by X-ray absorption spectroscopy. *Coordination Chemistry Reviews* 249:1797-1810.
- Ghosh M., Singh S.P. (2005) A review on phytoremediation of five heavy metals and utilization of its byproducts. *Applied Ecology and Environmental Research* 3:1-18.
- Gisbert C., Ros R., De Haro A., Walker D.J., Pilar Bernal M., Serrano R., Navarro-Aviñó J. (2003) A plant genetically modified that accumulates Pb is especially promising for phytoremediation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 303:440-445.
- Gonnelli C., Galardi F., Gabbrielli R. (2001) Nickel and copper tolerance and toxicity in three Tuscan populations of *Silene paradoxa*. *Physiologia Plantarum* 113:507-514.
- González-Duarte P. (2003) Metallothioneins, in: J. A. McCleverty and T. J. Meyer (Eds.), *Comprehensive Coordination Chemistry II*, Pergamon, Oxford. pp. 213-228.
- Gorinova N., Nedkovska M., Todorovska E., Simova-Stoilova L., Stoyanova Z., Georgieva K., Demirevska-Kepova K., Atanassov A., Herzig R. (2007) Improved phytoaccumulation of cadmium by genetically modified tobacco plants *Nicotiana tabacum* L. Physiological and biochemical response of the transformants to cadmium toxicity. *Environmental Pollution* 145:161-170.
- Gouia H., Suzuki A., Brulfert J., Ghorbal M.H. (2003) Effects of cadmium on the co-ordination of nitrogen and carbon metabolism in bean seedlings. *Journal of Plant Physiology* 160:367-376.

- Greger M., Johansson M. (1992) Cadmium effects on leaf transpiration of sugar beet (*Beta vulgaris*). *Physiologia Plantarum* 86:465-473.
- Griffiths H., Parry M.A.J. (2002) Plant Responses to Water Stress. *Ann Bot* 89:801-802.
- Grispen V.M.J., Nelissen H.J.M., Verkleij J.A.C. (2006) Phytoextraction with *Brassica napus* L.: A tool for sustainable management of heavy metal contaminated soils. *Environmental Pollution* 144:77-83.
- Haag-Kerwer A., Schafer H., Heiss S., Walter C., Rausch T. (1999) Cadmium exposure in *Brassica juncea* causes a decline in transpiration rate and leaf expansion without effect on photosynthesis. *J. Exp. Bot.* 50:1827-1835.
- Hadad H., Maine M., Pinciroli M., Mufarrege M. (2009) Nickel and phosphorous sorption efficiencies, tissue accumulation kinetics and morphological effects on *Eichhornia crassipes*. *Ecotoxicology* 18:504-513.
- Hall J.L. (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J. Exp. Bot.* 53:1-11.
- Halliwell B., Gutteridge J. (2007) *Free Radicals in Biology and Medicine* Oxford U. Press, London.
- Hannink N.K., Subramanian M., Rosser S.J., Basran A., Murray J.A., Shanks J.V., Bruce N.C. (2007) Enhanced transformation of tnt by tobacco plants expressing a bacterial nitroreductase. *Int J Phytoremediation* 9:385-401.
- Hao F., Wang X., Chen J. (2006) Involvement of plasma-membrane NADPH oxidase in nickel-induced oxidative stress in roots of wheat seedlings. *Plant Science* 170:151-158.
- Henry J.R. (2000) *An Overview of the Phytoremediation of Lead and Mercury*. U.S. Environmental Protection Agency.
- Hernández L.E., Gárate A., Carpena-Ruiz R. (1997) Effects of cadmium on the uptake, distribution and assimilation of nitrate in *Pisum sativum*. *Plant and Soil* 189:97-106.
- Hussein H.S., Ruiz O.N., Terry N., Daniell H. (2007) Phytoremediation of mercury and organomercurials in chloroplast transgenic plants: enhanced root uptake, translocation to shoots, and volatilization. *Environ Sci Technol* 41:8439-46.

- Jiménez A., Hernández J.A., Del Río L.A., Sevilla F. (1997) Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiology* 114:275-284.
- Jones H. (1992) *Plants and microclimate A quantitative approach to environmental plant physiology*. 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- Jones H. (1998) Stomatal control of photosynthesis and transpiration. *J. Exp. Bot.* 49:387-398.
- Jones H. (2004) What is water use efficiency?, in: M. Bacon (Ed.), *Water Use Efficiency in Plant Biology*, Wiley-Blackwell, Oxford. pp. 27-41.
- Küpper H., Küpper F., Spiller M. (1996) Environmental relevance of heavy metal-substituted chlorophylls using the example of water plants. *J. Exp. Bot.* 47:259-266.
- Küpper H., Küpper F., Spiller M. (1998) In situ detection of heavy metal substituted chlorophylls in water plants. *Photosynthesis Research* 58:123-133.
- Kabata-Pendias A. (2000) *Trace Elements in Soils and Plants*. 3rd ed. Crcpress., Pulawy.
- Kambhampati M.S., Begonia G.B., Begonia M.F.T., Bufford Y. (2003) Phytoremediation of a Lead-Contaminated Soil Using Morning Glory (*Ipomoea lacunosa*): Effects of a Synthetic Chelate. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 71:0379-0386.
- Kannavou A., Serelis K., Chronopoulou-Sereli A. (2001) Assessment of Cd and Pb content of soils and plants of heavily contaminated site, First European Bioremediation Conference, Chania, Crete.
- Keller C., Hammer D., Kayser A., Richner W., Brodbeck M., Sennhauser M. (2003) Root development and heavy metal phytoextraction efficiency: comparison of different plant species in the field. *Plant and Soil* 249:67-81.
- Kirkham M.B. (2006) Cadmium in plants on polluted soils: Effects of soil factors, hyperaccumulation, and amendments. *Geoderma* 137:19-32.
- Kontopoulos A., Komnitsas K., Xenidis A., Papassiopi N. (1995) Environmental characterisation of the sulphidic tailings in Lavrion. *Minerals Engineering* 8:1209-1219.
- Kramer P.J., Boyer J.S. (1995) *Water relations of plants and soils* Academic Press, San Diego.

- Krämer U. (2005) Phytoremediation: novel approaches to cleaning up polluted soils. *Current Opinion in Biotechnology* 16:133-141.
- Krause G.H., Weis E. (1991) Chlorophyll Fluorescence and Photosynthesis - The Basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42:313-349.
- Lai H.-Y., Chen Z.-S. (2004) Effects of EDTA on solubility of cadmium, zinc, and lead and their uptake by rainbow pink and vetiver grass. *Chemosphere* 55:421-430.
- Lai H.-Y., Chen Z.-S. (2005) The EDTA effect on phytoextraction of single and combined metals-contaminated soils using rainbow pink (*Dianthus chinensis*). *Chemosphere* 60:1062-1071.
- Lasat M.M. (2002) Phytoextraction of Toxic Metals: A Review of Biological Mechanisms. *J Environ Qual* 31:109-120.
- León A.M., Palma J.M., Corpas F.J., Gómez M., Romero-Puertas M.C., Chatterjee D., Mateos R.M., del Río L.A., Sandalio L.M. (2002) Antioxidative enzymes in cultivars of pepper plants with different sensitivity to cadmium. *Plant Physiology and Biochemistry* 40:813-820.
- Lidon F.C., Barreiro M.G., Ramalho J.C. (2004) Manganese accumulation in rice: implications for photosynthetic functioning. *J Plant Physiol* 161:1235-44.
- Liqin C., Limin Y., Qiuquan W. (2009) In vivo phytochelatin and Hg-phytochelatin complexes in Hg-stressed *Brassica chinensis* L. *Metallomics* 1:101-106.
- Lugon-Moulin N., Martin F., Krauss M.R., Ramey P.B., Rossi L. (2006) Cadmium concentration in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) from different countries and its relationship with other elements. *Chemosphere* 63:1074-1086.
- Lugon-Moulin N., Zhang M., Gadani F., Rossi L., Koller D., Krauss M., Wagner G.J. (2004) Critical Review of the Science and Options for Reducing Cadmium in Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) and Other Plants, in: L. S. Donald (Ed.), *Advances in Agronomy*, Academic Press. pp. 111-180.
- Lyubenova L., Nehnevajova E., Herzig R., Schröder P. (2009) Response of antioxidant enzymes in *Nicotiana tabacum* clones during phytoextraction of heavy metals. *Environmental Science and Pollution Research* 16:573-581.

- Ma L.Q., Komar K.M., Tu C., Zhang W., Cai Y., Kennelley E.D. (2001) A fern that hyperaccumulates arsenic. *Nature* 409:579-579.
- MacNair M.R. (2003) The hyperaccumulation of metals by plants. *Advances in Botanical Research* 40:63-105.
- Madhava Rao K.V., Sresty T.V.S. (2000) Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses. *Plant Science* 157:113-128.
- Manetas Y., Grammatikopoulos G., Kyparissis A. (1998) The use of the portable, non-destructive, SPAD-502 (Minolta) chlorophyll meter with leaves of varying trichome density and anthocyanin content. *Journal of plant physiology* 153:513-516.
- Marschner H. (1995) Mineral nutrition of higher plants Academic Press, london.
- Martens S.N., Boyd R.S. (1994) The ecological significance of nickel hyperaccumulation: a plant chemical defense. *Oecologia* 98:379-384.
- Mavrakis A., Dasaklis S., Christides A. (2007) Study of the characteristics of the Thriassion plain streams and their contribution to the degradation of the marine environment of the Elefsis gulf, 10th International Conference on Environmental Science and Technology, Kos island, Greece.
- Maxwell K., Johnson G.N. (2000) Chlorophyll fluorescence--a practical guide. *J Exp Bot* 51:659-68.
- McGrath D., McCormack. R.J. (1999) The significance of heavy metal and organic micropollutants in soils, Irish Agriculture and Food Development Authority.
- McGrath S.P. (1995) Chromium and Nickel, in: B. J. Alloway (Ed.), *Heavy Metals in Soils*, Springer, London. pp. 152-178.
- McGrath S.P., Zhao F.J. (2003) Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils. *Curr Opin Biotechnol* 14:277-82.
- McGrath S.P., Zhao F.J., Lombi E. (2001) Plant and rhizosphere processes involved in phytoremediation of metal-contaminated soils. *Plant and Soil* 232:207-214.
- Mehta S.K., Gaur J.P. (1999) Heavy-Metal-Induced Proline Accumulation and Its Role in Ameliorating Metal Toxicity in *Chlorella vulgaris*. *New Phytologist* 143:253-259.



- Mench M., Martin E. (1991) Mobilization of cadmium and other metals from two soils by root exudates of *Zea mays* L., *Nicotiana tabacum* L. and *Nicotiana rustica* L. *Plant and Soil* 132:187-196.
- Miller G., Wile I., Hitchin G. (1983) Patterns of accumulation of selected metals in members of the soft-water macrophyte flora of central Ontario lakes. *Aquatic Botany* 15:53-64.
- Milone M.T., Sgherri C., Clijsters H., Navari-Izzo F. (2003) Antioxidative responses of wheat treated with realistic concentration of cadmium. *Environmental and Experimental Botany* 50:265-276.
- Mithöfer A., Schulze B., Boland W. (2004) Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals. *FEBS Letters* 566:1-5.
- Mittler R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7:405-410.
- Monni S., Uhlig C., Hansen E., Magel E. (2001) Ecophysiological responses of *Empetrum nigrum* to heavy metal pollution. *Environmental Pollution* 112:121-129.
- Moustakas M., Ouzounidou G., L.Symeonidis, Karataglis S. (1997) Field study of the effects of excess copper on wheat photosynthesis and productivity Japanese Society of Soil Science and Plant Nutrition, Tokyo, Japan.
- Muhammad N.A., Islam U.K., Z. I., Mukhtar A., Fahim A.Q. (2008) Modified 2,2'-Azinobis(3-Ethylbenzo Thiazoline)-6-Sulphonic Acid Radical Cation Decolorization Assay for Antioxidant Activity of Human Plasma and Extracts of Traditional Medicinal Plants. *Acta chimica slovenica* 55:408-418.
- Mulligan C.N., Yong R.N., Gibbs B.F. (2001) Remediation technologies for metal-contaminated soils and groundwater: an evaluation. *Engineering Geology* 60:193-207.
- Nakos G. (1982) Pollution of soil and vegetation in the Thriasian Plain, Greece. *Plant and Soil* 66:271-277.
- Nascimento C.W.A.d., Xing B. (2006) Phytoextraction: a review on enhanced metal availability and plant accumulation. *Scientia Agricola* 63:299-311.
- Ohashi Y., Nakayama N., Saneoka H., Fujita K. (2006) Effects of drought stress on photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence and stem diameter of soybean plants. *Biologia Plantarum* 50:138-141.

- Oncel I., Keles Y., Ustun A.S. (2000) Interactive effects of temperature and heavy metal stress on the growth and some biochemical compounds in wheat seedlings. *Environmental Pollution* 107:315-320.
- Ozden M., Demirel U., Kahraman A. (2009) Effects of proline on antioxidant system in leaves of grapevine (*Vitis vinifera* L.) exposed to oxidative stress by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Scientia Horticulturae* 119:163-168.
- Ozgen M., Reese R.N., Z. T.A., Scheerens J.C., Miller A.R. (2006) Modified 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods. *Journal of agricultural and food chemistry* 54:1151-1157.
- Pagter M., Bragato C., Brix H. (2005) Tolerance and physiological responses of *Phragmites australis* to water deficit. *Aquatic Botany* 81:285-299.
- Pandey N., Sharma C.P. (2002) Effect of heavy metals Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> on growth and metabolism of cabbage. *Plant Science* 163:753-758.
- Pandey N., Sharma C.P. (2003) Chromium interference in iron nutrition and water relations of cabbage. *Environmental and Experimental Botany* 49:195-200.
- Papapostolou I., Georgiou C.D. (2010) Superoxide radical induces sclerotial differentiation in filamentous phytopathogenic fungi: a superoxide dismutase mimetics study. *Microbiology* 156:960-966.
- Pearcy R.W., Mooney H.A., Ehleringer J.R. (1991) *Plant Physiological Ecology: Field Methods and Instrumentation* Chapman & Hall, London.
- Peralta-Videa J.R., Lopez M.L., Narayan M., Saupe G., Gardea-Torresdey J. (2009) The biochemistry of environmental heavy metal uptake by plants: Implications for the food chain. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41:1665-1677.
- Pletsch M. (2004) Plants and the environment-Phytoremediation. *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*,:781-786.
- Poschenrieder C., Barcelo J. (2004) Water relation in heavy metals stressed plants, in: M. N. V. Prasad (Ed.), *Heavy Metal Stress in Plants: From Biomolecules to Ecosystems*, Springer Verlag, Berlin. pp. 249-269.
- Prasad M.N.V. (1995) Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. *Environmental and Experimental Botany* 35:525-545.

- Prasad M.N.V. (2004) Heavy Metal Stress in Plants: From Biomolecules to Ecosystems. 2nd ed. Springer, New York.
- Rao M., Halfhill M., Abercrombie L., Ranjan P., Abercrombie J., Gouffon J., Saxton A., Stewart C. (2009) Phytoremediation and phytosensing of chemical contaminants, RDX and TNT: identification of the required target genes. *Functional & Integrative Genomics*.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26:1231-7.
- Reichman S. (2002) The responses of plants to metal toxicity. A review focusing on copper, manganese & zinc Australian Minerals & Energy Environment Foundation, Melbourne.
- Rejsková A., Patková L., Stodulková E., Lipavská H. (2007) The effect of abiotic stresses on carbohydrate status of olive shoots (*Olea europaea* L.) under in vitro conditions. *Journal of Plant Physiology* 164:174-184.
- Rooney C.P., Zhao F.-J., McGrath S.P. (2007) Phytotoxicity of nickel in a range of European soils: Influence of soil properties, Ni solubility and speciation. *Environmental Pollution* 145:596-605.
- Rout G., Das P. (2009) Effect of Metal Toxicity on Plant Growth and Metabolism: I. Zinc, in: E. Lichtfouse, et al. (Eds.), *Sustainable Agriculture*, Springer Netherlands. pp. 873-884.
- Ruttens A., Colpaert J.V., Mench M., Boisson J., Carleer R., Vangronsveld J. (2006) Phytostabilization of a metal contaminated sandy soil. II: Influence of compost and/or inorganic metal immobilizing soil amendments on metal leaching. *Environmental Pollution* 144:533-539.
- Salt D.E., Smith R.D., Raskin I. (1998) Phytoremediation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49:643-668.
- Sanità di Toppi L., Gabbrielli R. (1999) Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany* 41:105-130.
- Sarret G., Harada E., Choi Y.E., Isaure M.P., Geoffroy N., Fakra S., Marcus M.A., Birschwilks M., Clemens S., Manceau A. (2006) Trichomes of tobacco excrete zinc as zinc-substituted calcium carbonate and other zinc-containing compounds. *Plant Physiol* 141:1021-34.
- Sayed S. (1997) Effect of Cadmium and Kinetin on Transpiration Rate, Stomatal Opening and Leaf Relative Water Content in Safflower Plants. *Journal of Islamic Academy of Sciences* 10.

- Schützendübel A., Nikolova P., Rudolf C., Polle A. (2002) Cadmium and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in *Populus canescens* roots. *Plant Physiology and Biochemistry* 40:577-584.
- Schutzendubel A., Schwanz P., Teichmann T., Gross K., Langenfeld-Heyser R., Godbold D.L., Polle A. (2001) Cadmium-Induced Changes in Antioxidative Systems, Hydrogen Peroxide Content, and Differentiation in Scots Pine Roots. *Plant Physiol.* 127:887-898.
- Seregin I.V., Ivanov V.B. (2001) Physiological Aspects of Cadmium and Lead Toxic Effects on Higher Plants. *Russian Journal of Plant Physiology* 48:523-544.
- Sharma S.S., Dietz K.J. (2006) The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *J Exp Bot* 57:711-26.
- Sheoran V., Sheoran A.S., Poonia P. (2009) Phytomining: A review. *Minerals Engineering* 22:1007-1019.
- Shi G., Cai Q. (2008) Photosynthetic and anatomic responses of peanut leaves to cadmium stress. *Photosynthetica* 46:627-630.
- Shi G., Cai Q. (2009) Photosynthetic and anatomic responses of peanut leaves to zinc stress. *Biologia Plantarum* 53:391-394.
- Silva J.M.d., Arrabaça M.C. (2004) Contributions of soluble carbohydrates to the osmotic adjustment in the C<sub>4</sub> grass *Setaria sphacelata*: A comparison between rapidly and slowly imposed water stress. *Journal of Plant Physiology* 161:551-555.
- Skórzyńska-Polit E., Krupa Z. (2006) Lipid Peroxidation in Cadmium-Treated *Phaseolus coccineus* Plants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 50:482-487.
- Smeets K., Cuypers A., Lambrechts A., Semane B., Hoet P., Van Laere A., Vangronsveld J. (2005) Induction of oxidative stress and antioxidative mechanisms in *Phaseolus vulgaris* after Cd application. *Plant Physiology and Biochemistry* 43:437-444.
- Stamatis N., Ioannidou D., Christoforidis A., Koutrakis E. (2002) Sediment Pollution by Heavy Metals in the Strymonikos and Ierissos Gulfs, North Aegean Sea, Greece. *Environmental Monitoring and Assessment* 80:33-49.
- Sun Y., Zhou Q., Diao C. (2008) Effects of cadmium and arsenic on growth and metal accumulation of Cd-hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. *Bioresource Technology* 99:1103-1110.

- Suresh B., Ravishankar G.A. (2004) Phytoremediation--a novel and promising approach for environmental clean-up. *Crit Rev Biotechnol* 24:97-124.
- Symeonidis L., Mcneily T., Bradhaw A.D. (1985) Differential tolerance of three cultivars of *Agrostis capillaris* L. to Cadmium, Copper, Lead, Nickel and Zinc. *New Phytologist* 101:309-315.
- Szollosi R., Varga I.S., Erdei L., Mihalik E. (2009) Cadmium-induced oxidative stress and antioxidative mechanisms in germinating Indian mustard (*Brassica juncea* L.) seeds. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72:1337-1342.
- Talanova V.V., Titov A.F., Boeva N.P. (2000) Effect of Increasing Concentrations of Lead and Cadmium on Cucumber Seedlings. *Biologia Plantarum* 43:441-444.
- Taylor D. (1983) The significance of the accumulation of cadmium by aquatic organisms. *Ecotoxicol Environ Saf* 7:33-42.
- Temminghoff E.J.M., Zee S.E.A.T.M., Haan F.A.M. (1995) Speciation and calcium competition effects on cadmium sorption by sandy soil at various pHs. *European Journal of Soil Science* 46:649-655.
- Tyler G., Pålsson A.M.B., Bengtsson G., Bååth E., Tranvik L. (1989) Heavy-metal ecology of terrestrial plants, microorganisms and invertebrates. *Water, Air, & Soil Pollution* 47:189-215.
- Uluturhan E. (2009) Heavy metal concentrations in surface sediments from two regions (Saros and Gökova Gulfs) of the Eastern Aegean Sea. *Environmental Monitoring and Assessment*.
- Vaillant N., Monnet F., Hitmi A., Sallanon H., Coudret A. (2005) Comparative study of responses in four *Datura* species to a zinc stress. *Chemosphere* 59:1005-1013.
- Van Aken B. (2008) Transgenic plants for phytoremediation: helping nature to clean up environmental pollution. *Trends in Biotechnology* 26:225-227.
- Van Breusegem F., Vranova E., Dat J.F., Inze D. (2001) The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Science* 161:405-414.
- Van Nevel L., Mertens J., Oorts K., Verheyen K. (2007) Phytoextraction of metals from soils: How far from practice? *Environmental Pollution* 150:34-40.

- Vasilatos C., Megremi I., Economou-Eliopoulos M., Mitsis I. (2008) Hexavalent chromium and other toxic metals in groundwaters of the Asopos valley (Attica) Greece, 26th European Conference: Society of Environmental Geochemistry and Health, Athens, Greece.
- Veltman K., Huijbregts M.A.J., Kolck M.v., Wang W.-X., Hendriks A.J. (2008) Metal Bioaccumulation in Aquatic Species: Quantification of Uptake and Elimination Rate Constants Using Physicochemical Properties of Metals and Physiological Characteristics of Species. *Environmental Science & Technology* 42:852-858.
- Verma S., Dubey R.S. (2003) Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science* 164:645-655.
- Vos C.H.R., Schat H., Waal M.A.M., Vooijs R., Ernst W.H.O. (1991) Increased resistance to copper-induced damage of the root cell plasmalemma in copper tolerant *Silene cucubalus*. *Physiologia Plantarum* 82:523-528.
- Wagner B.A., Buettner G.R., Burns C.P. (1994) Free Radical-Mediated Lipid Peroxidation in Cells: Oxidizability Is a Function of Cell Lipid bis-Allylic Hydrogen Content. *Biochemistry* 33:4449-4453.
- Watanabe M.E. (1997) Phytoremediation on the brick of comercialization. *Environmental Science and Technology* 31:182-186.
- Wei S., Teixeira da Silva J.A., Zhou Q. (2008) Agro-improving method of phytoextracting heavy metal contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials* 150:662-668.
- Weis J.S., Weis P. (2004) Metal uptake, transport and release by wetland plants: implications for phytoremediation and restoration. *Environ Int* 30:685-700.
- Wenger K., Gupta S.K., Furrer G., Schulin R. (2002) Zinc Extraction potential of two common crop plants, *Nicotiana tabacum* and *Zea mays*. *Plant and Soil* 242:217-225.
- Willey N. (2007) Soils contaminated with Radionuclides, *Phytoremediation: Methods and Reviews*, Humana Press. pp. 305-317.
- Xenidis A., Papassiopi N., Komnitsas K. (2003) Carbonate-rich mining tailings in Lavrion: risk assessment and proposed rehabilitation schemes. *Advances in Environmental Research* 7:479-494.
- Yürekli F., Ünyayar A., Porgali Z.B., Mazmanci M.A. (2004) Effects of Cadmium Exposure on Phytochelatin and the Synthesis of Abscisic Acid in *Funalia trogii*. *Engineering in Life Sciences* 4:378-380.

- Yang H.M., Zhang X.Y., Wang G.X. (2004) Effects of Heavy Metals on Stomatal Movements in Broad Bean Leaves. *Russian Journal of Plant Physiology* 51:464-468.
- Yang J.-G., Yang J.-Y., Peng C.-H., Tang C.-B., Zhou K.-C. (2009) Recovery of zinc from hyperaccumulator plants: *Sedum plumbizincicola*. *Environmental Technology* 30:693 - 700.
- Ye Z., Rodriguez R., Tran A., Hoang H., de los Santos D., Brown S., Vellanoweth R.L. (2000) The developmental transition to flowering represses ascorbate peroxidase activity and induces enzymatic lipid peroxidation in leaf tissue in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci* 158:115-127.
- Yoon J., Cao X., Zhou Q., Ma L.Q. (2006) Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site. *Science of The Total Environment* 368:456-464.
- Zamora R., Alaiz M., Hidalgo F.J. (1997) Feed-Back Inhibition of Oxidative Stress by Oxidized Lipid/Amino Acid Reaction Products. *Biochemistry* 36:15765-15771.
- Zavaleta-Mancera H., Franklin K., Ougham H., Thomas H., Scott I. (1999) Regreening of senescent *Nicotiana* leaves. I. Reappearance of NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase and light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein. *J. Exp. Bot.* 50:1677-1682.
- Zenk M.H. (1996) Heavy metal detoxification in higher plants - a review. *Gene* 179:21-30.
- Zhao J., Shi G., Yuan Q. (2008) Polyamines content and physiological and biochemical responses to ladder concentration of nickel stress in *Hydrocharis dubia* (Bl.) Backer leaves. *BioMetals* 21:665-674.
- Καραμπουρνιώτης Γ. (2003) Φυσιολογία καταπονήσεων των φυτών Έμβριο, Αθήνα.
- Κωνσταντινίδου Ε.Ι. (2003) Φυσιολογία αβιοτικών καταπονήσεων, in: Κ. Α. Ρουμπελάκη-Αγγελάκη (Ed.), Φυσιολογία φυτών. Από το μόριο στο περιβάλλον, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο.
- Μήτσιος Ι.Κ. (2004) Γονιμότητα εδαφών: Θρεπτικά στοιχεία φυτών: Μακροθρεπτικά, μικροθρεπτικά και βαρέα μέταλλα. Zymel, Αθήνα.
- Τσικαλός Π. (2003) Θρέψη φυτών- γονιμότητα εδαφών. Σημειώσεις μαθήματος, Τμήμα Φυτικής Παραγωγής, ΤΕΙ Κρήτης, Ηράκλειο