



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΟΝΑΔΑ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ : ΑΓΓΕΛΟΣ Μ. ΕΥΑΓΓΕΛΟΥ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ

ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΦΥΤΩΝ ΚΑΠΝΟΥ ΣΤΑ ΕΠΙΚΙΝΔΥΝΑ

ΓΙΑ ΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΤΟΥ ΚΑΠΝΙΣΜΑΤΟΣ

(Αλληλεπιδράσεις βαρέων μετάλλων και επιβλαβών αζωτούχων ενώσεων

στο προϊόν κατανάλωσης ποικιλιών καπνού κατά την πειραματική

ανάπτυξή τους σε ιλύ β' βαθμίου βιολογικού καθαρισμού)

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΔΗΜΗΤΡΑ-ΚΛΕΟΠΑΤΡΑ Ι. ΔΟΥΜΑ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ MSc

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2001



ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000345801





ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ : ΑΓΓΕΛΟΣ Μ. ΕΥΑΓΓΕΛΟΥ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΜΟΝΑΔΑ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΥΠΕΥΘΥΝΗ : ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΚΑΛΦΑΚΑΚΟΥ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

**Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΦΥΤΩΝ ΚΑΠΝΟΥ ΣΤΑ ΕΠΙΚΙΝΔΥΝΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΤΟΥ
ΚΑΠΝΙΣΜΑΤΟΣ**

**(Αλληλεπιδράσεις βαρέων μετάλλων και επιβλαβών αζωτούχων ενώσεων στο προϊόν
κατανάλωσης ποικιλιών καπνού κατά την πειραματική ανάπτυξή τους σε ιλύ β'
βάθμιου βιολογικού καθαρισμού)**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΔΗΜΗΤΡΑ-ΚΛΕΟΠΑΤΡΑ Ι. ΔΟΥΜΑ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ MSc

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2001



Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή, δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα.

(Νόμος, 5343/32, άρθρο 202, παράγρ. 2)



Η ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Β. Καλφακάκου (Επιβλέπουσα)

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας
Ιατρική Σχολή - Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Α. Ευαγγέλου (Μέλος)

Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας
Ιατρική Σχολή - Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Β. Μάϊπα (Μέλος)

Επικουρη Καθηγήτρια Υγιεινής
Ιατρική Σχολή - Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων



Η ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Στ. Κωνσταντόπουλος

Καθηγητής Παθολογίας - Πνευμονολογίας

Ιατρική Σχολή - Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Φ. Πομώνης

Καθηγητής Βιομηχανικής Χημείας

Τμήμα Χημείας - Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Π. Ευθυμιάδης

Καθηγητής Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

Β. Καλφακάκου (Επιβλέπουσα)

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας

Ιατρική Σχολή - Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Α. Ευαγγέλου

Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας

Ιατρική Σχολή - Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Β.Μάϊπα

Επίκουρη Καθηγήτρια Υγιεινής

Ιατρική Σχολή - Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

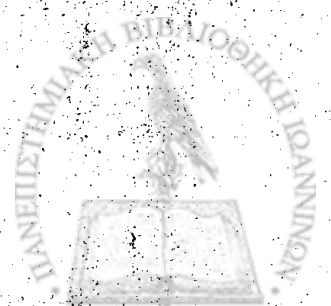
Μ. Σύρρου

Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογίας

Ιατρική Σχολή - Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων



στους γονείς μου



στον σύζυγό μου Ανδρέα

στην κόρη μου Ελένη



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Το φυτό του καπνού είναι είδος που χαρακτηρίζεται από υψηλή συσσωρευτική ικανότητα βαρέων μετάλλων καθώς και υψηλή συγκέντρωση νικοτίνης στην οποία και οφείλεται ο αποδεδειγμένος εθισμός που προκαλεί στους καπνιστές.

Στο αέριο προϊόν του που εισπνέουν ενεργητικοί και παθητικοί καπνιστές, περιέχονται πολλοί καρκινογόνοι παράγοντες όπως επιβλαβή μέταλλα και N-νιτροζαμίνες, η συγκέντρωση των οποίων εξαρτάται από τις καλλιεργητικές συνθήκες, τον γονότυπο και το επίπεδο ωρίμανσης των φύλλων του φυτού.

Τα βαρέα μέταλλα, εκτός από την τοξικότητα που προκαλούν λόγω αλληλεπίδρασης με τα απαραίτητα ιχνοστοιχεία, έχουν και αποδεδειγμένη σχέση με την καρκινογένεση.

Οι ειδικές N-νιτροζαμίνες του καπνού (TSNA) παράγονται από το μεταβολισμό της νικοτίνης και ευθύνονται για την ανάπτυξη πολλών τύπων καρκίνου. Εκτός από τη νικοτίνη, κύρια παράμετρο για την παραγωγή TSNA αποτελεί και η αυξημένη συσσώρευση νιτρικών που σχετίζεται με τον τύπο και την ποσότητα της παρεχόμενης λίπανσης.

Η αξιοποίηση της λάσπης βιολογικών καθαρισμών στην γεωργία αποτελεί διεθνώς μια σύγχρονη και οικολογική λύση, η διάθεσή της δε, συνιστά ένα ιδιαίτερα οξύ πρόβλημα των ανεπτυγμένων περιοχών, συμπεριλαμβανομένης της περιοχής του λεκανοπεδίου των Ιωαννίνων.

Η διεθνής βιβλιογραφία και τα πειραματικά πρωτόκολλα που έχουν μέχρι σήμερα εφαρμοσθεί για τη μελέτη της χρήσης λάσπης στην καλλιέργεια του καπνού, αφορούν προσδιορισμό των συγκεντρώσεων βαρέων μετάλλων σε αμερικάνικες κυρίως ποικιλίες (flue-cured) και δεν συμπεριλαμβάνουν συνεκτιμήσεις των αζωτούχων ενώσεων και συγκριτικά δεδομένα σε σχέση με υποστρώματα ανόργανης λίπανσης.

Η σημασία της σύστασης του καπνού στην υγεία των καπνιστών και η δυνατότητα σύγχρονης λύσης του προβλήματος διάθεσης της λάσπης του βιολογικού καθαρισμού, οδήγησαν στην εκπόνηση της παρούσας διατριβής.

Στην εργασία αναπτύχθηκαν δύο ελληνικές ποικιλίες καπνού ανατολικού τύπου (sun-cured) σε εδάφη διαφορετικού pH, εμπλουτισμένα με επεξεργασμένη λάσπη βιολογικού καθαρισμού υπό διάφορες αναλογίες ή με ανόργανη λίπανση.

Η συλλογή και ξήρανση των φύλλων πραγματοποιήθηκε με βάση την τοπική γεωργική πρακτική.



Ακολούθησε ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης : α) 5 βαρέων μετάλλων (Cd, Pb, Cr, Cu και Zn) β) ολικού αζώτου και γ) δύο επιμέρους κλασμάτων του διαλυτού αζώτου (νικοτίνης και νιτρικών).

Η διατριβή κατέληξε σε σημαντικά στοιχεία για την συμπεριφορά των δύο ποικιλιών στις διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης και σε συγκριτική ανάλυση των πλεονεκτημάτων των διαφόρων υποστρωμάτων όσον αφορά την συνολική επιβάρυνση σε καρκινογόνους παράγοντες.

Τέλος τα συμπεράσματα οδήγησαν σε σημαντικές προτάσεις για την δυνατότητα διάθεσης της λάσπης που προκύπτει από το εργοστάσιο αστικών λυμάτων Ιωαννίνων στις τοπικές καλλιέργειες.

Η παρούσα έρευνα πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Πειραματικής Φυσιολογίας (Μονάδα Περιβαλλοντικής Φυσιολογίας) του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κατά το διάστημα 1995-2000.

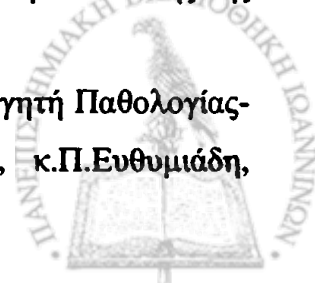
Η καλλιέργεια και ξήρανση των φυτών του καπνού πραγματοποιήθηκε στο αγρόκτημα της Σχολής Γεωπονίας των ΤΕΙ Ηπείρου.

Οφείλω να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στην Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας κα. Β. Καλφακάκου για την ανάθεση της παρούσας διδακτορικής διατριβής, την ιδιαιτερότητα του θέματος, την ειδική σημασία του για την υγεία των καταναλωτών και τα τοπικά περιβαλλοντικά προβλήματα καθώς και για την συνεχή και ακούραστη καθοδήγηση κατά την εκπόνησή της. Ο χρόνος που αφιέρωσε και η συνεχής στήριξή της, σε επιστημονικό και προσωπικό επίπεδο, αποτέλεσαν βασική προϋπόθεση για την ολοκλήρωση αυτής της μελέτης.

Ευχαριστώ επίσης θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή Φυσιολογίας κ.Α.Ευαγγέλου, μέλος της συμβουλευτικής επιτροπής, που με βοήθησε πολλαπλά με τις πολύτιμες επιστημονικές παρατηρήσεις και οδηγίες του και με την ηθική υποστήριξή του σε όλα τα στάδια της εργασίας.

Επίσης, ευχαριστώ την Επίκουρη Καθηγήτρια Υγιεινής κα. Β. Μάϊπα, μέλος της συμβουλευτικής επιτροπής για τις χρήσιμες υποδείξεις της κατά την διάρκεια αυτής της μελέτης.

Ευχαριστώ θερμά τους καθηγητές : κ. Σ.Κωνσταντόπουλο, Καθηγητή Παθολογίας-Πνευμονολογίας, κ.Φ.Πομώνη, Καθηγητή Βιομηχανικής Χημείας, κ.Π.Ευθυμιάδη,



Καθηγητή Γεωπονικού Πανεπιστημίου και κα. Μ.Σύρρου, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογίας που δέχτηκαν να συμμετέχουν στην επταμελή εξεταστική επιτροπή.

Θέλω να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την Επίκουρη Καθηγήτρια Φυσιολογίας κα.Π.Βεζυράκη, για τις εύστοχες επιστημονικές υποδείξεις της και για το προσωπικό ενδιαφέρον της καθ' όλο το διάστημα εκπόνησης της εργασίας.

Θεωρώ επίσης υποχρέωση να ευχαριστήσω θερμά τους συναδέλφους μου καθηγητές ΤΕΙ, Δρ. Γ.Μάνο, Δρ. Γ.Παπαδόπουλο και κα. Ε. Λενέτη-Μάνου για την σημαντικότητα συμβολή τους στην ανάπτυξη της μεθοδολογίας και εφαρμογής της πειραματικής καλλιέργειας και ξήρανσης των φυτών.

Ευχαριστώ επίσης πολύ τον Δρ. Ι. Παπαγιάννη για την βοήθειά του στον προσδιορισμό των βαρέων μετάλλων και τους κ.κ. Σ. Διβανίδη και Σ. Χαλιβόπουλο ερευνητές του Καπνολογικού Ινστιτούτου, για την βοήθειά τους στον προσδιορισμό των αζωτούχων ενώσεων.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Α. Κατσαράκη, μαθηματικό-στατιστικό, για την αμέριστη βοήθεια που μου προσέφερε στην στατιστική ανάλυση και επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Ευχαριστώ επίσης :

- τον κ.Γ.Τσιμαράκη, προϊστάμενο του Εργοστασίου Βιολογικού Καθαρισμού, για την βοήθειά του στην εξασφάλιση της ύλης και την παροχή στοιχείων.

-τους κ.κ. Ν.Γκάλκο, Π.Γρίβα και την Ε.Γούλα, ΕΔΤΠ του Εργαστηρίου Φυσιολογίας καθώς και την κ.Β.Υφαντή, εργαστηριακό συνεργάτη του Τμήματος Φυτικής Παραγωγής των ΤΕΙ Ηπείρου για την σημαντική βοήθεια που μου προσέφεραν σε τεχνικό και γραμματειακό επίπεδο.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την οικογένειά μου για την πολύτιμη συμπαράσταση και βοήθεια που μου προσέφεραν και για την μεγάλη κατανόησή τους κατά την εκπόνηση της εργασίας.



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	I-IV
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ.....	V-VII

1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1	ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΚΑΠΝΟΥ.....	1
1.1.1	Γενικά.....	1
1.1.2	Βιοχαρακτηριστικά του <i>Nicotiana tabacum</i> (Καπνός).....	1
1.1.3	Απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία.....	4
1.1.4	Αφομοίωση αζώτου στα ανώτερα φυτά.....	8
1.1.5	Αζωτούχες ενώσεις του καπνού.....	9
1.1.6	Αλκαλοειδή του καπνού.....	10
1.1.7	Βιοσύνθεση νικοτίνης.....	11
1.2	ΑΕΡΙΟ ΠΡΟΪΟΝ ΤΟΥ ΚΑΠΝΟΥ ΚΑΙ ΑΛΚΑΛΟΕΙΔΗ.....	14
1.2.1	Γενικά.....	14
1.2.2	Αέριο προϊόν καπνού.....	14
1.2.3	Κατηγορίες αέριου προϊόντος.....	15
1.2.4	Κλάσματα καπνού τσιγάρου.....	15
1.2.5	Σύσταση αέριου προϊόντος καπνού και καρκινογόνοι παράγοντες.....	17
1.2.6	Χημεία-Βιοχημεία των TSNA	18
1.2.7	Μεταβολισμός των TSNA.....	21
1.2.8	Καρκινογόνος δράση των TSNA.....	24
1.3	ΒΑΡΕΑ ΜΕΤΑΛΛΑ ΚΑΙ ΦΥΤΑ.....	30
1.3.1	Γενικά.....	30
1.3.2	Μέταλλα και γονότυπος.....	31
1.3.3	Μέταλλα και φυτικά τμήματα.....	33
1.3.4	Μέταλλα στο έδαφος και στα φυτά.....	34
1.3.5	Μέταλλα και διαθεσιμότητά τους.....	36
1.3.6	Μέταλλα και ιλύς βιολογικού καθαρισμού.....	37
1.3.6.α	Αρχές λειτουργίας των εγκαταστάσεων επεξεργασίας αστικών λυμάτων (Ε.Ε.Α.Λ).....	37
1.3.6.β	Πρόσληψη μετάλλων.....	40
1.4	ΑΕΡΙΟ ΠΡΟΪΟΝ ΚΑΠΝΟΥ ΚΑΙ ΒΑΡΕΑ ΜΕΤΑΛΛΑ.....	43
1.4.1	Γενικά	43
1.4.2	Συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων στους καπνιστές.....	43
1.4.3	Μέταλλα και καρκινογένεση.....	45
1.4.4	Ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και καρκινογένεση.....	48
1.4.5	Οξειδωτική βλάβη DNA και βαρέα μέταλλα.....	50
1.4.6	Μηχανισμοί παραγωγής προμεταλλακτικών βλαβών DNA και βαρέα μέταλλα.....	51
1.4.6.α	Καταστροφή βάσεων DNA.....	51
1.4.6.β	Σταυροσύνδεση	52
1.4.6.γ	Σχάσεις	52
1.4.6.δ	Απουρίνωση.....	52

1.4.7	Μεταλλαξογένεση/Καρκινογένεση και βαρέα μέταλλα.....	53
1.4.8	Αυτοοξειδωση και βαρέα μέταλλα.....	56
1.4.9	Βαρέα μέταλλα και γονιδιακή έκφραση.....	57
1.4.10	Αλληλεπίδραση βαρέων μετάλλων και επιδιορθωτικών μηχανισμών.....	60
1.4.11	Συμμετοχή μετάλλων στο οξειδωτικό stress.....	62
1.4.11.α	Υπεροξειδωση των λιπιδίων.....	62
1.4.11.β	Αναστολή μηχανισμών άμυνας : μείωση γονιδιακής λειτουργίας.....	65
1.4.11.γ	Αναστολή μηχανισμών άμυνας : μείωση της ενζυματικής λειτουργίας αντιοξειδωτικών ενζύμων ή ενίσχυση συστημάτων ενεργοποίησης οξυγόνου.....	67
1.4.11.δ	Αναστολή ή προστασία μηχανισμών άμυνας : αμφιλεγόμενη δράση MT.....	69
1.4.11.ε	Αναστολή ή διέγερση αμυντικών μηχανισμών.....	71
1.4.11.στ	Μέταλλα και φλεγμονή.....	71
2.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	74
2.1	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ.....	74
2.1.1	Συνθήκες πειραματισμού.....	74
2.2	ΣΥΛΛΟΓΗ ΤΩΝ ΦΥΛΛΩΝ.....	75
2.2.1	Ημερομηνίες συλλογής των φύλλων.....	75
2.2.2	Τρόπος συλλογής των φύλλων.....	75
2.2.3	Αρμάθιασμα φύλλων.....	76
2.2.4	Χρόνοι αποξήρανσης των φύλλων.....	76
2.3	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΒΑΡΕΩΝ ΜΕΤΑΛΛΩΝ.....	76
2.3.1	Προετοιμασία δειγμάτων.....	76
2.3.2	Όργανα.....	77
2.3.3	Μέθοδοι.....	77
2.3.4	Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων.....	77
2.3.5	Όξινη πέψη φυτικών ιστών.....	79
2.3.6	Διήθηση.....	79
2.3.7	Αραιώσεις.....	80
2.3.8	Υπολογισμοί συγκεντρώσεων των μετάλλων.....	80
2.4	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΩΝ ΑΛΚΑΛΟΕΙΔΩΝ (ΩΣ ΝΙΚΟΤΙΝΗ) ΣΤΟΝ ΚΑΠΝΟ (CORESTA STANDARD METHOD).....	80
2.4.1	Προετοιμασία δειγμάτων.....	80
2.4.2	Όργανα.....	80
2.4.3	Απόσταξη.....	80
2.4.4	Φασματοφωτομετρία.....	81
2.5	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΟΥ ΑΖΩΤΟΥ ΣΤΟΝ ΚΑΠΝΟ (ΜΕΘΟΔΟΣ KJELDAHL).....	81
2.5.1	Αντιδραστήρια.....	82
2.5.2	Όργανα.....	82
2.5.3	Προετοιμασία δείγματος.....	82
2.5.4	Απόσταξη.....	82
2.5.5	Υπολογισμός ολικού αζώτου (%).....	83
2.6	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΙΟΝΤΩΝ (NO₃⁻) ΣΤΟΝ ΚΑΠΝΟ.....	83
2.6.1	Όργανα.....	83
2.6.2	Αντιδραστήρια.....	83

2.6.3	Παρασκευή διαλυμάτων.....	84
2.6.4	Προσδιορισμός ανιόντων.....	84
2.7	ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	85
3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	86
3.1	ΜΕΤΑΛΛΑ.....	86
3.1.1	Επίπεδα μετάλλων στον καπνό συναρτήσει χρόνου συλλογής και υποστρώματος.....	86
3.1.1.α	Ποικιλία I-pH 1.....	86
3.1.1.β	Ποικιλία I-pH 2.....	91
3.1.1.γ	Ποικιλία II-pH 1.....	96
3.1.1.δ	Ποικιλία II-pH 2.....	101
3.1.2	Επίπεδα μετάλλων συναρτήσει χρόνου συλλογής και pH και ανεξαρτήτως υποστρώματος.....	106
3.1.2.α	Ποικιλία I-pH 1, pH 2.....	106
3.1.2.β	Ποικιλία II-pH 1, pH 2.....	108
3.1.3	Επίπεδα μετάλλων συναρτήσει χρόνου συλλογής και ανεξαρτήτως pH και υποστρώματος.....	110
3.1.3.α	Ποικιλία I.....	110
3.1.3.β	Ποικιλία II.....	111
3.1.4	Επίπεδα μετάλλων συναρτήσει υποστρώματος και ανεξαρτήτως χρόνου συλλογής.....	112
3.1.4.α	Ποικιλία I-pH 1.....	112
3.1.4.β	Ποικιλία I-pH 2.....	114
3.1.4.γ	Ποικιλία II-pH 1.....	116
3.1.4.δ	Ποικιλία II-pH 2.....	118
3.1.5	Επίπεδα μετάλλων συναρτήσει υποστρώματος και ανεξαρτήτως χρόνου συλλογής και pH.....	120
3.1.5.α	Ποικιλία I.....	120
3.1.5.β	Ποικιλία II.....	122
3.1.6	Επίπεδα μετάλλων συναρτήσει pH.....	124
3.1.6.α	Ποικιλία I.....	124
3.1.6.β	Ποικιλία II.....	125
3.1.7	Επίπεδα μετάλλων συναρτήσει ποικιλίας.....	126
3.1.8	Επίπεδα μετάλλων συναρτήσει ποικιλίας και pH.....	127
3.2	ΑΖΩΤΟΥΧΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ.....	128
3.2.1	Επίπεδα αζωτούχων ενώσεων στον καπνό συναρτήσει χρόνου συλλογής και υποστρώματος.....	128
3.2.1.α	Ποικιλία I-pH 1.....	128
3.2.1.β	Ποικιλία I-pH 2.....	131
3.2.1.γ	Ποικιλία II-pH 1.....	134
3.2.1.δ	Ποικιλία II-pH 2.....	137



3.2.2	Επίπεδα αζωτούχων ενώσεων συναρτήσει χρόνου συλλογής και pH και ανεξαρτήτως υποστρώματος.....	140
3.2.2.α	Ποικιλία I-pH 1,pH 2.....	140
3.2.2.β	Ποικιλία II-pH 1,pH 2.....	142
3.2.3	Επίπεδα αζωτούχων ενώσεων συναρτήσει χρόνου συλλογής και ανεξαρτήτως pH και υποστρώματος.....	144
3.2.3.α	Ποικιλία I.....	144
3.2.3.β	Ποικιλία II.....	145
3.2.4	Επίπεδα αζωτούχων ενώσεων συναρτήσει υποστρώματος και ανεξαρτήτως χρόνου συλλογής.....	146
3.2.4.α	Ποικιλία I-pH 1.....	146
3.2.4.β	Ποικιλία I-pH 2.....	147
3.2.4.γ	Ποικιλία II-pH 1.....	146
3.2.4.δ	Ποικιλία II-pH 2.....	149
3.2.5	Επίπεδα αζωτούχων ενώσεων συναρτήσει υποστρώματος και ανεξαρτήτως χρόνου συλλογής και pH.....	150
3.2.5.α	Ποικιλία I.....	150
3.2.5.β	Ποικιλία II.....	152
3.2.6	Επίπεδα αζωτούχων ενώσεων συναρτήσει pH.....	154
3.2.6.α	Ποικιλία I.....	154
3.2.6.β	Ποικιλία II.....	155
3.2.7	Επίπεδα αζωτούχων ενώσεων συναρτήσει ποικιλίας.....	156
3.2.8	Επίπεδα αζωτούχων ενώσεων συναρτήσει ποικιλίας και pH.....	156
3.3	ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΝΙΚΟΤΙΝΗΣ ΚΑΙ ΒΑΡΕΩΝ ΜΕΤΑΛΛΩΝ.....	158
3.3.1	Συσχέτιση νικοτίνης και βαρέων μετάλλων στις διάφορες ομάδες υποστρωμάτων.....	158
3.3.1.α	Ποικιλία I.....	158
3.3.1.β	Ποικιλία II.....	158
3.3.2	Συσχέτιση νικοτίνης και βαρέων μετάλλων στους διάφορους χρόνους συλλογής.....	159
3.3.2.α	Ποικιλία I.....	159
3.3.2.β	Ποικιλία II.....	159
3.3.3	Συσχέτιση νικοτίνης και βαρέων μετάλλων στα διαφορετικά pH.....	160
3.3.3.α	Ποικιλία I.....	160
3.3.3.β	Ποικιλία II.....	160
3.4	ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΒΑΡΕΩΝ ΜΕΤΑΛΛΩΝ.....	162
3.4.1	Συσχέτιση μετάλλων στους διάφορους χρόνους συλλογής.....	162
3.4.2	Συσχέτιση μετάλλων στις διάφορες ομάδες υποστρωμάτων.....	162
3.4.3	Συσχέτιση μετάλλων στα διαφορετικά pH.....	163
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	165
5.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	199
6.	ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ.....	201
	α. Στα ελληνικά.....	201
	β. Στα αγγλικά.....	205
7.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	208-224
8.	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	i-xiii

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

A	αδενίνη
AGT	O ⁶ -αλκυλγουανιν-DNA-αλκυλτρανσφεράση
ALAD	αφυδρογονάση του δ-αμινολεβουλινικού οξέος
alpha-BTx	ειδικοί σύνδεσμοι θέσης άλφα-μπουγκαροτοξίνης
AM	κυψελιδικά μακροφάγα
AP-1	ενεργοποιός πρωτεΐνη -1
AP-sites	απουρινικές / απυριμιδινικές θέσεις
ARE	στοιχείο αντιοξειδωτικής απόκρισης
BOP	N- δινιτροζο (2-οξοπροπυλ) αμίνη
C	κυτοσίνη
CAT	καταλάση
CEC	κατιονανταλλακτική ικανότητα
DNA sygar moiety	DNA-δακτύλιος σακχάρου
dT	θυμιδίνη
EB	επαβατιδίνη
ER	υποδοχείς οιστρογόνων
ERK2	εξωκυτταρική σηματορρυθμιζόμενη κινάση 2
ETS	καπνός τσιγάρου στο περιβάλλον
Fpg	φορμαμιδοπυριμιδιν-DNA-γλυκοσυλάση
G	γουανίνη
GR	υποδοχείς των γλυκοκορτικοειδών
GSH	γλουταθειόνη
GST	γλουταθειον-S-τρανσφεράση
HF	δίαιτα υψηλών λιπαρών
HO	αιμοξυγενάση -1
HPB	4-υδροξυλ-1-(3-πυριδυλ)-1-βουτανόνη
HSP₅	πρωτεΐνη 5 θερμικού stress
IL	ιντερλευκίνη
iso-NNAC	4-(μεθυλνιτροζαμινο)-4-(3-πυριδυλ)-βουτυρικό οξύ
iso-NNAL	4-(μεθυλνιτροζαμινο)-4-(3-πυριδυλ)-1-βουτανόλη
MAP	μιτογονο-ενεργοποιούμενη πρωτεΐνη



1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΚΑΠΝΟΥ

1.1.1. ΓΕΝΙΚΑ

Ως αυτότροφοι οργανισμοί, τα φυτά χρειάζονται 16 χημικά στοιχεία από τα οποία τα: C, O, H, N, K, Ca, P, Mg και S συγκαταλέγονται στα Μακροστοιχεία, τα: Cl, Mn, Zn, Cu, B, και Mo συγκαταλέγονται στα Μικροστοιχεία ή Ιχνοστοιχεία και ο Fe βρίσκεται μεταξύ των δύο ομάδων.

Από τα στοιχεία αυτά ο C, το H και το O προσλαμβάνονται υπό την μορφή του CO₂, H₂O και O₂ για τον σχηματισμό της πλειονότητας των οργανικών ενώσεων του φυτού και τα υπόλοιπα προσλαμβάνονται μέσω του ριζικού συστήματος υπό μορφή διαλυμάτων από το έδαφος.

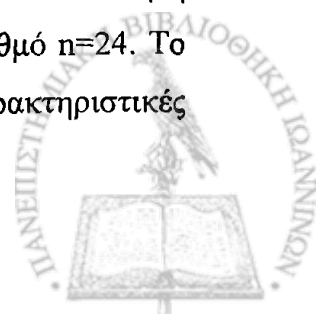
Κύριες λειτουργίες τους είναι η συμμετοχή στις δομικές μονάδες και τα οργανικά μόρια του μεταβολισμού του φυτού, η ενεργοποίηση των ενζύμων ή η ενζυμική κατάλυση και η διατήρηση της ωσμωτικής ισορροπίας υπό μορφή ιόντων (πίνακας 1.1), (Καρατάγλης Σ., 1992).

Οι παράγοντες που καθορίζουν τον βαθμό επέμβασης και εμπλουτισμού του εδάφους μέσω της λίπανσης με τα απαραίτητα μακρο- και ιχνο-στοιχεία είναι: το καλλιεργούμενο είδος, ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης, της μεθόδου και του χρόνου εφαρμογής τους, ο προσδιορισμός του ρυθμού πρόσληψής τους από το φυτό, η γνώση των αναγκών της κάθε καλλιέργειας, ο προσδιορισμός των στοιχείων που απομακρύνονται κατά την συγκομιδή (φυσικές απώλειες) και τα δεδομένα εδαφοανάλυσης και φυλλοανάλυσης (Τσαπικούνης Φ., 1997).

1.1.2. ΒΙΟΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ *NICOTIANA TABACUM* (ΚΑΠΝΟΣ)

Το φυτό του καπνού ανήκει στο γένος *Nicotiana* της οικογένειας σολανωδών (*Solanaceae*) ή στρυχνωδών και περιλαμβάνει περίπου 50 είδη με καταγωγή κυρίως από την Αμερική.

Στο μεγάλης πολυμορφίας γένος *Nicotiana* συγκαταλέγεται το είδος *Nicotiana tabacum* που αποτελεί βασικό καλλιεργούμενο είδος και περιλαμβάνει φυτά ποώδη ή υποξυλώδη, με φύλλα συνήθως άμισχα και με απλοειδή χρωμοσωμικό αριθμό n=24. Το είδος *N. tabacum* παρουσιάζει μεγάλη πολυμορφία τύπων με χαρακτηριστικές μορφολογικές διαφορές, ιδιαίτερα στα φύλλα και το στέλεχος.



Με ριζικό σύστημα σχετικά μικρό και θυσσανώδες, αποτελούμενο από 1 κύρια ρίζα, 6-8 πλάγιες ρίζες και πολυάριθμα ριζικά τριχίδια, ο καπνός έχει βλαστό παχύ, όρθιο και ύψος που κυμαίνεται από 50cm έως 2m.

Ο αριθμός των φύλλων είναι γενετικά εξαρτώμενος (20-30 φύλλα /φυτό), με μέγεθος που ποικίλει ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες και την ποικιλία και σχήμα λογχοειδές, ωοειδές, ελλειπτικό ή ενδιάμεσου τύπου.

Η ταξιανθία είναι φοβοειδής κόρυμβος, μικρή ή μεγάλη, πυκνή ή αραιή.

Ανάλογα με την ποικιλία καλλιεργούνται σε ευρύ φάσμα εδαφών, με κατάλληλο pH και υπέδαφος που επιτρέπει την διείσδυση του αέρα και του νερού. Ιδανικά για καλλιέργεια θεωρούνται τα ελαφρά, αμμοπηλώδη εδάφη σε περιοχή με υψηλή ηλιοφάνεια και κατάλληλο ιστορικό και γεωγραφική θέση. Ο καπνός ευδοκμεί σε εύρος γεωγραφικού πλάτους 60B-40N, και θερμοκρασιακό εύρος 15° C-30° C (άριστη θ°:26-27° C), είναι ξηροανθεκτικό είδος και απαιτεί μια καλά κατανεμημένη βροχόπτωση στην διάρκεια της ανάπτυξης και πριν την συλλογή των φύλλων (Μάνος Γ.,1990).

- α. Η κυριότερη διεθνώς ταξινόμηση των καπνών βασίζεται στη μέθοδο αποξήρανσής των φύλλων τους, όπου διακρίνονται οι τύποι:

Flue -curing (ξήρανση με θερμότητα π.χ. Βιρζίνια), **air curing** (ξήρανση στον αέρα π.χ Μπέρλεν), **sun-curing** (ξήρανση στον ήλιο π.χ ανατολικές ποικιλίες) και **fire - curing** (ξήρανση με φωτιά π.χ Βιρτζίνια)

- β. Στην χημική ταξινόμηση βάσει του pH νέφους, διακρίνονται η **όξινη** (pH~4,5-5), η **αλκαλική** (pH >7,0) και η **ουδέτερη** ομάδα (pH=7,0), όπου οι κατάλληλες για τσιγάρα ποικιλίες ανήκουν στην όξινη ομάδα.
- γ. Ανάλογα με την χρήση τους τα καπνά διακρίνονται σε καπνά τσιγάρων, πούρων, πίπας, πρέζας κ.λ.π., ενώ η βιομηχανική ταξινόμηση κατατάσσει τα καπνά σε **αρωματικά**, **ουδέτερα** και **βασικά** .



ΠΙΝΑΚΑΣ: 1.1: Κύριες μορφές πρόσληψης, συνθήκες συγκεντρώσεις (%Ξ.Β) και κύριες λειτουργίες των απαραίτητων θρεπτικών στοιχείων στα φυτά (Καρατάγλης Σ., 1992).

Στοιχεία	ΚΥΡΙΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΜΕ ΤΙΣ ΟΠΟΙΕΣ ΑΠΟΡΡΟΦΟΥΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΑ ΦΥΤΑ	ΣΥΝΗΘΕΙΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΣΤΑ ΦΥΤΑ (% Ξ . Β)	ΚΥΡΙΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΣΤΑ ΦΥΤΑ
<i>Μακροστοιχεία</i>			
C	CO ₂	44%	Συστατικό οργανικών ενώσεων
O	H ₂ O ή O ₂	44%	Συστατικό οργανικών ενώσεων
H	H ₂ O	6%	Συστατικό οργανικών ενώσεων
N	NO ₃ ⁻ ή NH ₄ ⁺	1 - 4%	Αμινοξέα, νουκλεϊκά οξέα, χλωροφύλλη και συνένζυμα
K	K ⁺	0,5 - 6%	Ενεργοποίηση ενζύμων, πρωτεϊνοσύνθεση, ρύθμιση απαργής καταφαρμακτικών κυττάρων, συμμετοχή στην αύξηση
Ca	Ca ²⁺	0,2 - 3,5%	Συμμετοχή σε αυξητικά φαινόμενα, συμμετοχή στον σχηματισμό της μέσης πλάκας των κυτταρικών τοιχωμάτων, διαπερατότητα του κυττάρου
P	H ₂ PO ₄ ⁻ ή HPO ₄ ²⁻	0,1 - 0,8%	Σχηματισμός ATP, νουκλεϊκών οξέων, φωσφολυτιδίων, βασικών ενζύμων και φωσφορυλίωση σακχάρων
S	SO ₄ ²⁻	0,05 - 1%	Συστατικό των αμινοξέων κυστεΐνη, κιστίνη και μεθειονίνη, του συνένζυμου A, σταθεροποίηση της δευτεροταγούς και τριτοταγούς δομής των πρωτεϊνών
Mg	Mg ²⁺	0,1 - 0,8%	Δομικό στοιχείο του μορίου της χλωροφύλλης, συμμετοχή στην σύνθεση πυρηνικού RNA και ATP, συστατικό των ριβοσωμάτων, ενεργοποιητής πολλών ενζύμων
Fe	Fe ²⁺ ή Fe ³⁺	25 - 300 ppm	Σύνθεση χλωροφύλλης, κυτοχρωμάτων, νιτρογενάσης και ενζύμων που παίζουν ρόλο στη μετατροπή ενέργειας μέσω φωτοσύνθεσης και αναπνοής
<i>Ιχνοστοιχεία</i>			
Cl	Cl ⁻	100 - 10.000 ppm	Ρύθμιση της ωσμωτικής ισορροπίας και πιθανώς βασικό στις φωτοσυνθετικές αντιδράσεις για την παραγωγή οξυγόνου
Mn	Mn ²⁺	15 - 800 ppm	Ενεργοποιητής ενζύμων της φωτόλυσης του νερού (υπεροξειδική δισμουτάση) και του κύκλου του Krebs
Zn	Zn ²⁺	15 - 100 ppm	Συστατικό ενζύμων, ενεργοποιητής ενζύμων που σχετίζονται με το μεταβολισμό των υδατανθράκων, των πρωτεϊνών, των αυξινών και του RNA
Mo	MoO ₄ ²⁻	0,1 - 50 ppm	Ρυθμιστής ενζυμικών συστημάτων που συμμετέχουν στην δέσμευση N (νιτρογενάση) και στην νιτρική αναγωγή (νιτρική ρεδουκτάση)
B	BO ₃ ⁻ ή B ₄ O ₇ ²⁻	5 - 75 ppm	Σύνθεση αζωτούχων ενώσεων (ουρακίλη) και επίδραση χρησιμοποίησης Ca ²⁺
Cu	Cu ²⁺	4 - 30 ppm	Ενεργοποιητής ενζύμων της φωτοσυνθετικής αντίδρασης (πλαστοκυανίνης), της ανενεργοποίησης των ελευθέρων ριζών του οξυγόνου O ₂ (υπεροξειδική δισμουτάση), της αίμης (κυτοχρωμική οξειδάση) και άλλων (φαινόλαση)

1.1.3. ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΑ ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Στον καπνό η θρέψη επηρεάζεται κυρίως από τις συγκεντρώσεις των N, P, K, Ca, Mg, Cl και B στο καλλιεργητικό έδαφος, η πρόσληψη των οποίων παρουσιάζει εύρος διακύμανσης και εξαρτάται από ποικίλους παράγοντες όπως: η καλλιεργούμενη ποικιλία, η συγκέντρωση των στοιχείων στο έδαφος, η μηχανική σύσταση, η αλατότητα, το ποσοστό οργανικής ουσίας, το pH, η κλίση και η άρδευση του εδάφους, το ποσοστό της ανόργανης λίπανσης, η θερμοκρασία αέρα και εδάφους, οι βροχοπτώσεις, η ηλιοφάνεια και το CO₂ της ατμόσφαιρας, το ιστορικό καλλιέργειας και λίπανσης, ο ανταγωνισμός μεταξύ των φυτών.

Στον καπνό τα θρεπτικά στοιχεία επηρεάζουν την ανάπτυξη, την χημική σύσταση και τις οργανοληπτικές ιδιότητες του φυτού (Μυλωνάς Β., 1994).

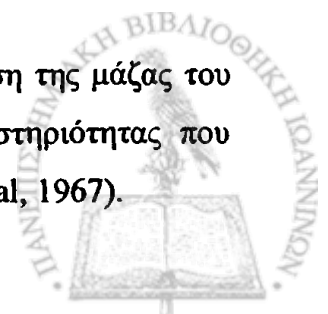
Από τα χημικά στοιχεία που συμβάλουν στο μεταβολισμό και την ανάπτυξη του φυτού του καπνού τα κυριότερα είναι :

- α. **Αζωτο:** Το N αποτελεί κύριο συστατικό του πρωτοπλάσματος, της νικοτίνης, της χλωροφύλλης και των άλλων αζωτούχων ενώσεων του καπνού. Η συγκέντρωση N αυξάνεται από την βάση στην κορυφή του καπνού, αλλά η αναλογία N/μονάδα επιφάνειας είναι σημαντικά υψηλότερη στα κορυφαία φύλλα (Akehurst BC., 1981).

Ο Elliot (1967) βρήκε ότι 47% απορροφάται στα φύλλα, 13% στις ρίζες και 17% στα στελέχη, ενώ το ποσοστό που υπολείπεται απομακρύνεται με το κορυφολόγημα.

Σε πειράματα που έγιναν τόσο σε ποικιλίες Βιρτζίνια (Raper Jr, CD. et al, 1966) όσο και σε ποικιλίες Μπασμά (Μυλωνάς Β., 1994), βρέθηκε ότι η μεγαλύτερη ποσότητα N (80%) προσλαμβάνεται από την 4^η έως την 9^η-10^η εβδομάδα μετά την μεταφύτευση. Η ποσότητα του διαθέσιμου και προσλαμβανόμενου από τον καπνό N, θα πρέπει να ελαττώνεται παράλληλα με την συμπλήρωση της αύξησης των φύλλων, ώστε σε 55-60 μέρες μετά τη μεταφύτευση το φυτό να έχει εξαντλήσει όλο το διαθέσιμο N. Σε αντίθετη περίπτωση το φυτό παράγει αυξημένο επίπεδο πρωτεϊνών και χαμηλή συγκέντρωση σακχάρων (Πιστόλης ΑΤ., 1994, Τσοτσόλης Ν., 1994, Ζαχοκώστας Κ., 1997).

Έλλειψη N προκαλεί ελάττωση της φυλλικής επιφάνειας, αύξηση της μάζας του κυτταρικού τοιχώματος και μείωση της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας που προκαλεί επιβράδυνση στην αύξηση του φυτού (McCants CB. et al, 1967).



Περίσσεια N προκαλεί αύξηση της φυλλικής επιφάνειας με ταυτόχρονη ελάττωση του βάρους της μονάδας επιφάνειας, αύξηση της αναλογίας στελέχους /φύλλων και της κεντρικής νέυρωσης/ελάσματος, αύξηση της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας ενώ ευνοεί την επιμήκυνση της βλαστικής φάσης σε βάρος της αναπαραγωγικής (Garner WW. et al, 1934). Ταυτόχρονα περίσσεια N προκαλεί αύξηση νικοτίνης και ολικών αλκαλοειδών (Crockford RH., 1977) και μείωση σακχάρων (Raper Jr, CD. et al, 1970).

Σε πειράματα που έγιναν σε ποικιλίες Μυρωδάτα και Τσεμπέλια βρέθηκε ότι η αύξηση του χορηγούμενου N από 2 σε 8Kg/στρεμ. προκάλεσε αύξηση της συγκέντρωσης N από 1,75% σε 2,36% και από 1,98% σε 2,75% αντίστοιχα, ενώ τα ολικά αλκαλοειδή αυξήθηκαν από 1,04% σε 1,49% και από 0,79% σε 1,15% (Μυλωνάς B., 1994).

- β. Φώσφορος:** Ο P αφομοιώνεται υπό μορφή πρωτεϊνών, υδατανθράκων, λεκιθίνης, ATP κ.λ.π. (Baldwin E., 1963). Το 34% του απορροφούμενου P βρίσκεται στις ρίζες, το 28% στα φύλλα και το 21% στον βλαστό (Elliot JM., 1967).

Η διαθεσιμότητα P εξαρτάται από ποικίλους εδαφικούς παράγοντες όπως το pH, η οργανική ουσία, τα οξείδια σιδήρου και αργιλίου, η συγκέντρωση K, το βάθος εδάφους κ.αλ. (Μυλωνάς B., 1990).

Έλλειψη P προκαλεί επιβράδυνση στην αύξηση των φύλλων ιδίως στα πρώτα στάδια ανάπτυξης (25-50 ημέρες μετά τη μεταφύτευση) (Wallace A. et al, 1965), καθυστέρηση στην ωρίμανση, δυσχρωμίες στα φύλλα, καχεξία και συμπτώματα βακτηριακής προσβολής (McCants CB. et al, 1967) ενώ ταυτόχρονα μειώνεται η πρόσληψη N και K (Tso TC. et al, 1960, Μυλωνάς B., 1994).

Σε περίσσεια P παρεμποδίζεται η πρόσληψη άλλων στοιχείων (π.χ Mg) (Μυλωνάς B., 1994). Σχέση μεταξύ εδαφικού P και ολικών αλκαλοειδών δεν έχει παρατηρηθεί (Akehurst BC., 1981, Μυλωνάς B., 1994).

- γ. Κάλιο:** Το K προσλαμβάνεται σε μεγαλύτερη αναλογία από τα υπόλοιπα στοιχεία σε όλα τα στάδια ανάπτυξης του καπνού (McCants CB. et al, 1967).

Περίσσεια K προκαλεί βελτίωση των οργανοληπτικών ιδιοτήτων του προϊόντος (καυσιμότητα, χρώμα, ελαστικότητα) (Halley DE. et al, 1943), ενώ σε ορισμένες ποικιλίες προκαλεί μείωση της συγκέντρωσης του καπνού σε Ca και Mg (Venkataraman KV. et al, 1961).

Έλλειψη K προκαλεί χλόρωση στην άκρη και περιφέρεια των φύλλων, μείωση της σπαργής, συμπτώματα νέκρωσης στα κατώτερα φύλλα, και μείωση της



ανθεκτικότητας σε μύκητες, έντομα και χαμηλές θερμοκρασίες, χαμηλό ειδικό βάρος και μείωση της συγκέντρωσης μηλικού και κιτρικού οξέος (McCants CB. et al, 1967). Σχέση μεταξύ K και νικοτίνης δεν έχει αναφερθεί (Akehurst BC., 1981), παρόλο που κάποιοι ερευνητές έχουν παρατηρήσει αύξηση στην συγκέντρωση ελεύθερων αμινοξέων σε συνθήκες έλλειψης K (Cole JS., 1966).

- δ. **Ασβέστιο:** Το Ca προσλαμβάνεται από τον καπνό στις μεγαλύτερες μετά το K συγκεντρώσεις, που ανιχνεύονται κυρίως στα κατώτερα - γηραιότερα φύλλα (Nason A. et al, 1963) λόγω της χαμηλής κινητικότητας του Ca μέσα στο φυτό του καπνού (Kasai Z. et al, 1960). Οι Woltz et al (1948) παρατήρησαν μια θετική επίδραση του Ca στην παραγωγή νικοτίνης και οι Moustakas et al (1993) παρατήρησαν αύξηση στην πρόσληψη N σε ποικιλίες flue - cured με την προσθήκη Ca σε όξινα εδάφη (Γιασόγλου Ν. και συν., 1994).

Έλλειψη Ca παρατηρείται σε εδάφη πολύ όξινα ($\text{pH} < 5,5$) (Μυλωνάς Β., 1994) και οφείλεται στην έκπλυση από το εδαφικό δ/μα των ανταλλάξιμων κατιόντων K, Ca και Mg και στην αντικατάστασή τους από ιόντα H^+ και Al. Το χαμηλό pH αυξάνει την ενεργότητα των κατιόντων Fe και Al που δεσμεύουν τα φωσφορικά ιόντα καθιστώντας τα σε σημαντικό ποσοστό μη διαθέσιμα για τα φυτά (Γιασόγλου Ν. και συν., 1994).

Η έλλειψη Ca σε προβληματικά όξινα εδάφη προκαλεί χαμηλή συγκέντρωση νικοτίνης (McCants CB. et al, 1967) P, Mg και Ca και υψηλή συγκέντρωση Mn και Al (φυτοτοξικότητα Mn, Al) στα φύλλα (Moustakas NK. et al, 1993).

Περίσσεια Ca στον καπνό προκαλεί αυξημένο ανταγωνισμό με τα Mg^{2+} και K^+ (Myers JA. et al, 1988).

- ε. **Μαγνήσιο:** Το Mg αποτελεί συστατικό της χλωροφύλλης των φυτών (2,7%) και παίζει σημαντικό ρόλο στη μεταφορά φωσφορικών ομάδων και στη λειτουργία των ενζυμικών συστημάτων του μεταβολισμού των υδατανθράκων (Nason A. et al, 1963).

Έλλειψη Mg προκαλεί χλώρωση και νέκρωση στο έλασμα και μεσονεύρια των φύλλων και συντελεί στην ελάττωση των σακχάρων και του αμύλου του καπνού (McCants CB. et al, 1967).

Οι Woltz et al (1948) δεν βρήκαν κάποια σχέση μεταξύ του Mg και της νικοτίνης παρόλο που μεταγενέστεροι ερευνητές (Tso TC. et al, 1960) παρατήρησαν ότι η έλλειψη Mg προκάλεσε χαμηλή παραγωγή νικοτίνης και αυξημένη συγκέντρωση ελεύθερων αμινοξέων.



στ. Χλώριο: Μικρές συγκεντρώσεις Cl^- (μέχρι 1%) επιδρούν θετικά στις οργανοληπτικές ιδιότητες και την παραγωγικότητα του καπνού (Sierra FA., 1966). Το Cl αποθηκεύεται κυρίως στα γηραιότερα φύλλα, ενώ 42% του απορροφούμενου Cl βρίσκεται στον βλαστό, 33% στα φύλλα και 10% στις ρίζες (Elliot JM., 1967). Περίσσεια Cl στο εδαφοδ/μα συντελεί στην ελάττωση πρόσληψης νιτρικού αζώτου, P και S στα φύλλα καπνού, και πιθανή ελάττωση των οργανικών οξέων και καλιούχων αλάτων με αποτέλεσμα τη μείωση καυσιμότητας (McCants CB. et al, 1967).

Η πρόσληψη του Cl αυξάνεται σε εδάφη με όξινο pH και με αυξημένες συγκεντρώσεις αμμωνιακού αζώτου, οπότε συνιστάται προσθήκη Ca και νιτρικού αζώτου (Ζαχοκώστας K., 1997, Ντζάνης ΗΔ., 1995).

ζ. Βόριο: Η συγκέντρωση 2 ppm B στο έδαφος καλύπτει οριακά τις ανάγκες του καπνού (Τσαπικούνης Φ., 1997), παρόλο που το B μετακινείται δύσκολα από τα γηραιότερα στα νεότερα φύλλα.. Η έλλειψη B προκαλεί παραμορφώσεις στα κορυφαία φύλλα και οφθαλμούς και νεκρώσεις στους πλάγιους μασχαλιαίους οφθαλμούς (Μυλωνάς Β., 1994).

Τοξικότητα B έχει αναφερθεί σε συγκεντρώσεις 300 ppm στα φύλλα (McIlrath WJ. et al, 1964) ενώ δεν έχει αναφερθεί σχέση μεταξύ B και νικοτίνης (Thomson R. et al, 1956).

η. Χαλκός : Ο Cu αποτελεί συστατικό μεγάλου αριθμού ενζύμων του καπνού και συντελεί στη καλή λειτουργία των ενζυμικών συστημάτων του, ενώ συμμετέχει άμεσα στην διαδικασία της φωτοσύνθεσης (Nason A. et al, 1963). Οι συγκεντρώσεις Cu αυξάνονται ελαφρά από τα κατώτερα στα ανώτερα φύλλα του καπνού (Rohrbach JF., 1979) και φαίνεται να μειώνονται με την αύξηση του εδαφικού pH (King LD. et al, 1990, Mengel K. et al, 1982)

Συμπτώματα έλλειψης Cu δεν έχουν παρατηρηθεί σε καλλιέργειες καπνού (Lucas GB., 1975), παρόλο που προσθήκη θεϊκού χαλκού σε εδάφη με χαμηλές συγκεντρώσεις χαλκού προκάλεσαν αύξηση του φυτού (Bacon CW. et al, 1950).

Τοξικότητα Cu έχει παρατηρηθεί κυρίως στην βλαστική φάση του καπνού σε συγκεντρώσεις 12,5 ppm. Σχέση Cu και νικοτίνης έχει αναφερθεί από τον Wen (1983) που παρατήρησε αύξηση των ολικών αλκαλοειδών και ολικού αζώτου με την αύξηση της συγκέντρωσης Cu στο έδαφος.

θ. Ψευδάργυρος: Συμμετέχει στα ενζυμικά συστήματα του φυτού και στην λειτουργία της αυξητικής ορμόνης, αυξίνη. Η συγκέντρωση Zn στον καπνό έχει



βρεθεί ότι μειώνεται σημαντικά από τα κατώτερα στα ανώτερα φύλλα (King LD. et al, 1990, Frank F. et al, 1977) και φαίνεται να μειώνεται με την αύξηση του εδαφικού pH από 5,8 σε 6,0 ενώ σε μεγαλύτερες τιμές pH δεν επηρεάζεται (King LD. et al, 1990). Έλλειψη ψευδαργύρου προκαλεί ελαφρά συμπτώματα χλώρωσης και κηλίδων που εξελίσσεται σε νέκρωση και εκδηλώνονται πρώτα στα γηραιότερα φύλλα του καπνού, λόγω της μετακίνησης του μετάλλου στους αυξανόμενους ιστούς (Akehurst BC., 1981).

Προσθήκη θειικού ψευδαργύρου σε εδάφη σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες των 2ppm προκάλεσε σημαντική αύξηση του καπνού (Bacon CW. et al, 1950), ενώ τροφοπενία ψευδαργύρου εκδηλώνεται σε αναλογίες P: Zn μεγαλύτερες του 250-300 (Πιστόλης ΛΤ., 1994). Τοξικότητα Zn στον καπνό έχει αναφερθεί σε συγκεντρώσεις 5ppm (Wen TC., 1983). Ο ίδιος ερευνητής έχει αναφέρει ότι ο Cu, ο Zn και το Cd δρουν ανταγωνιστικά και ότι η αύξηση της συγκέντρωσης του Zn στον καπνό προκαλεί αύξηση του ολικού N και των ολικών αλκαλοειδών.

1.1.4. ΑΦΟΜΟΙΩΣΗ ΑΖΩΤΟΥ ΣΤΑ ΑΝΩΤΕΡΑ ΦΥΤΑ

Η αφομοίωση του αζώτου στα ανώτερα φυτά γίνεται είτε μέσω της αφομοίωσης του νιτρικού οξέος, είτε μέσω της αναγωγής του αζώτου σε αμμωνία με την δράση αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων.

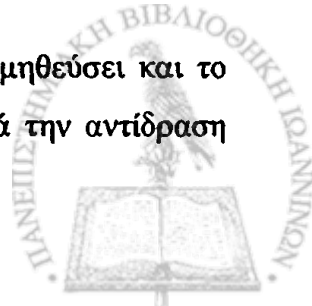
Στην πρώτη περίπτωση, πρώτα το νιτρικό ανάγεται σε νιτρώδες με το ένζυμο αναγωγή του νιτρικού, που είναι σύμπλεγμα της φλαβοπρωτεΐνης που περιέχει μολυβδαίνιο με δότη ηλεκτρονίων το NADH, το NADPH ή τις φερεδοξίνες.

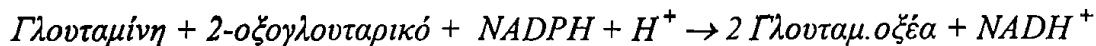
Στην συνέχεια το νιτρώδες ανάγεται σε αμμωνία ή NH_4^+ , αντίδραση που καταλύεται από ένα ενζυμικό σύμπλεγμα που περιέχει φερεδοξίνη, Cu^+ και μια φλαβοπρωτεΐνη την αναγωγή του νιτρώδους.

Στην δεύτερη περίπτωση, το άζωτο ανάγεται κατευθείαν σε αμμωνία, στα οξίδια των ριζών των ψυχανθών που περιέχουν συμβιωτικά βακτήρια και καταλύουν την αντίδραση μέσω νιτρογενάσης.

Η αναγωγή του N_2 ή του NO_3 σε NH_3 , έχει ως αποτέλεσμα τον γρήγορο σχηματισμό οργανικών ενώσεων, κυρίως με την σύνθεση γλουταμίνης.

Το άζωτο της αμιδικής ομάδας της γλουταμίνης, μπορεί να προμηθεύσει και το άζωτο της αμινοομάδας του γλουταμινικού οξέως που συντίθεται κατά την αντίδραση που καταλύεται από την συνθετάση του γλουταμινικού οξέως και είναι:





και χρησιμεύει για την σύνθεση όλων των άλλων αμινοξέων μέσω τρανσαμίνωσης.

Η τρανσαμίνωση καταλύεται από τις αμινοτρανσφεράσες που προσθετική ομάδα έχουν την φωσφορική πυριδοξάλη, παράγωγο της βιταμίνης B6. Από τρανσαμίνωση παράγεται η ορνιθίνη που είναι η μια πρόδρομος ένωση της νικοτίνης.

Η άλλη πρόδρομος ένωση της νικοτίνης, το νικοτινικό οξύ, προέρχεται από το ασπαραγινικό οξύ. Το ασπαραγινικό οξύ προέρχεται από τρανσαμίνωση του οξαλοξικού που με την σειρά του παράγεται:

1. από το πυροσταφυλικό οξύ με δράση πυροσταφυλικής καρβοξυλάσης
2. από μεταβολισμό άλλων αμινοξέων (Karlson P., 1984)

1.1.5. ΑΖΩΤΟΥΧΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ ΤΟΥ ΚΑΠΝΟΥ

Οι κυριότερες αζωτούχες ενώσεις του καπνού κατατάσσονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες:

1. Τις πρωτείνες (πρωτεϊνικό άζωτο)
2. Τις διαλυτές αζωτούχες ενώσεις (διαλυτό άζωτο)

Στις διαλυτές αζωτούχες ενώσεις συγκαταλέγονται κυρίως τα ελεύθερα αμινοξέα, τα αμίδια, οι αμμωνιακές και νιτρικές ενώσεις και τα αλκαλοειδή.

Ο προσδιορισμός της σχετικής αναλογίας ελευθέρων αμινοξέων και των δεσμευμένων αμινοξέων σε μορφή πρωτεΐνης είναι σύνθετος και επηρεάζεται από πολλές παραμέτρους (Tso TC., 1972), όπως τις κλιματολογικές συνθήκες και το στάδιο ανάπτυξης του φυτού του καπνού.

Οι επιμέρους συγκεντρώσεις των αζωτούχων κλασμάτων ποικίλουν ανάλογα με τον τύπο του καπνού και την προέλευση της ποικιλίας (Harlan WR. et al, 1955), αλλά είναι γενικά παραδεκτή η κατανομή που προτάθηκε το 1946 από τον Frankenburg και αφορά πρόσφατα συγκομισμένα φύλλα (πίνακας 1. 2):

ΠΙΝΑΚΑΣ 1.2 : Αζωτούχα κλάσματα του καπνού σε πρόσφατα συγκομισμένα φύλλα (Frankenburg WG., 1946)

ΑΖΩΤΟΥΧΑ ΚΛΑΣΜΑΤΑ	%	ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ % ΣΕ Ξ.Β
Ολικό Άζωτο	100	2,7
Πρωτεϊνικό Άζωτο	75	2,03
Διαλυτό Άζωτο :	25:	0,67:
Αμμωνία και αμίδια	1	0,027
Νιτρικά άλατα	7	0,189
Αλκαλοειδή	10	0,270
Αμινοξέα	2	0,054
Άλλα	5	0,135



Κατά τη διάρκεια της ξήρανσης, τα φύλλα του καπνού υφίστανται αλλαγές στην χημική τους σύσταση, και αλλαγές που αφορούν το ποσοστό της περιεχόμενης υγρασίας και της ξηράς ουσίας, ανάλογα με τον τύπο ξήρανσης (Akehurst BC., 1981). Οι αζωτούχες ενώσεις υφίστανται αλλαγές τόσο κατά την διάρκεια της ξήρανσης (Bacon CW. et al, 1952) όσο και κατά την διάρκεια της αποθήκευσης που για τα ανατολικού τύπου καπνά καλείται φυσική ζύμωση και οι μηχανισμοί που την διέπουν έχουν γίνει αντικείμενο μελέτης πολλών ερευνητών (Arsenjan E. et al, 1966, Arsenjan E. et al, 1970 & Arsenjan E., 1977).

1.1.6. ΑΛΚΑΛΟΕΙΔΗ ΤΟΥ ΚΑΠΝΟΥ

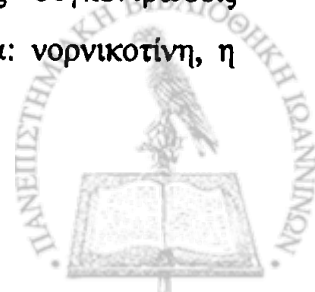
Τα αλκαλοειδή στον καπνό κατέχουν την πρώτη θέση συγκέντρωσης ανάμεσα στις διαλυτές αζωτούχες ενώσεις και την δεύτερη θέση συγκέντρωσης ανάμεσα σε όλες τις αζωτούχες ενώσεις του.

Στα φυτά αντιπροσωπεύουν την τρίτη μεγάλη ομάδα, μετά τα τερπένια και τις φαινόλες, των δευτερογενών προϊόντων και χαρακτηρίζονται από ένα ετεροκυκλικό δακτύλιο που περιέχει N και στον οποίον οφείλονται οι βασικές τους ιδιότητες.

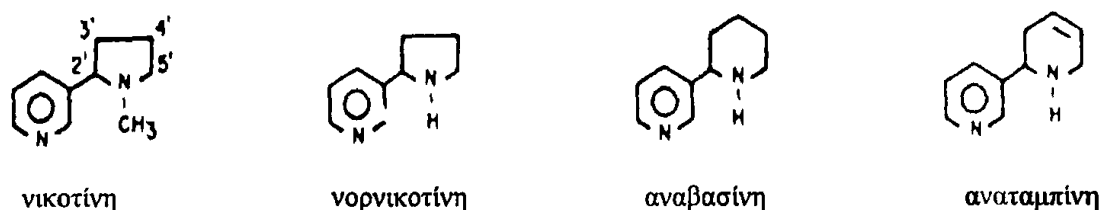
Σήμερα είναι γνωστά αρκετές χιλιάδες αλκαλοειδή που απαντούν σε 4000 ~ φυτικά είδη και ο βιολογικός τους ρόλος έχει γίνει αντικείμενο μελέτης πολλών ερευνητών, ορισμένοι από τους οποίους ισχυρίζονται ότι τα αλκαλοειδή συμμετέχουν ενεργά στο μεταβολισμό του φυτού (Tso TC. et al, 1962, Ilyin GS. et al, 1966) και άλλοι ότι σχετίζονται με την αποταμίευση του πλεονάζοντος αζώτου (Nowacki E. et al, 1976).

Στον καπνό έχουν ανιχνευτεί περίπου 40 διαφορετικά αλκαλοειδή, τα οποία κατατάσσονται στα 3-πυριδυλ-(pyridyl-) αλκαλοειδή (Hoffmann D. et al, 1991) και που ανάλογα με το είδος και το γένος *Nicotiana* όπως και ανάλογα με την θέση του φύλλου στο στέλεχος βρίσκονται σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 0.5% έως 5% του ξηρού βάρους του.

Το 85-95% της συγκέντρωσης των ολικών αλκαλοειδών των ειδών *N. tabacum* αποτελείται από νικοτίνη (1-2% του καπνού) και σε μικρότερες συγκεντρώσεις εντοπίζονται άλλα αλκαλοειδή, από τα οποία σημαντικότερα είναι τα: νορνικοτίνη, η αναβασίνη και η αναταμπίνη (Schmeltz I. et al, 1977).



Οι χημικοί τύποι των αλκαλοειδών που απαντώνται κυρίως στον καπνό είναι:



Εικ. 1.1: Αλκαλοειδή του καπνού (Hoffmann D. et al, 1985).

Η νικοτίνη και νορνικοτίνη αποτελούνται από ένα πυριδινικό δακτύλιο και ένα δακτύλιο πυρρολιδίνης, που στην περίπτωση της νικοτίνης φέρει μια μεθυλική ομάδα και στην περίπτωση της νορνικοτίνης μια υδρογονοομάδα.

Η συνεχιζόμενη χρήση του καπνού, παρόλες τις βλαπτικές του επιδράσεις στην υγεία, έγκειται στην εξάρτηση του καπνιστή από την νικοτίνη (Krasnegor NA., 1979) γεγονός που εξηγεί την θεωρία ορισμένων ερευνητών ότι ιστορικά η χρήση του καπνού περιορίστηκε μόνο στους τύπους εκείνους που περιείχαν νικοτίνη (Gerstel DU., 1961).

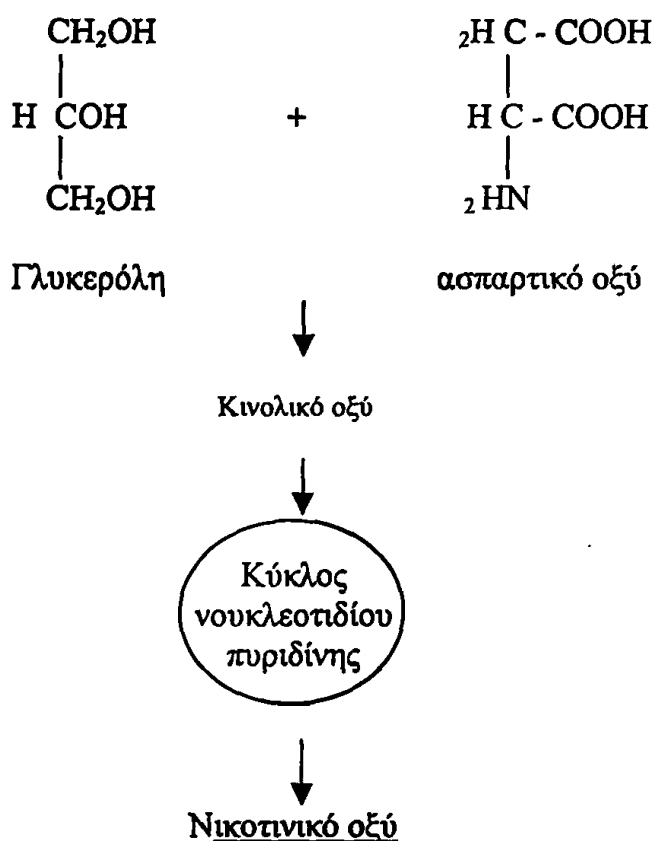
Η νικοτίνη παράγεται κυρίως στο αυξανόμενο άκρο της ρίζας και αποθηκεύεται στα φύλλα του καπνού ανάλογα με τις κλιματολογικές συνθήκες που επικρατούν (Dawson RF. et al, 1972), τις καλλιεργητικές πρακτικές που έχουν προηγηθεί (Busch LP. et al, 1977), τον ρυθμό αύξησης της ρίζας (Wolf FE. et al, 1964) και άλλες παραμέτρους. Η νικοτίνη σε καθαρή μορφή είναι ένα άχρωμο υγρό με χρόνο ημισείας ζωής στο είδος *N. tabaccum* 22 με 28 ώρες (Hall LW., 1975).

1.1. 7. ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΝΙΚΟΤΙΝΗΣ

Η νικοτίνη συντίθεται από το νικοτινικό οξύ και την ορνιθίνη με μια διαδικασία που είναι πλέον πλήρως κατανοητή (Leete E., 1977) αφού στο παρελθόν προηγήθηκαν σημαντικές εργασίες πάνω στο μηχανισμό βιοσύνθεσής της (Steinberg RA. et al, 1965).

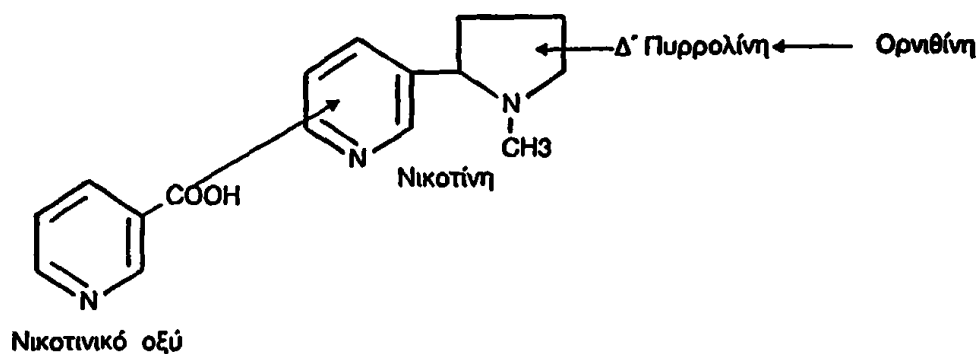


Ο πυριδινικός της δακτύλιος προέρχεται από το νικοτινικό οξύ που με την σειρά του στα φυτά συντίθεται από ένα παράγωγο της γλυκερόλης και ένα παράγωγο ασπαρτικού οξέος, με τη μεσολάβηση του κύκλου του νουκλεοτιδίου της πυριδίνης :



Εικ. 1.2 : Βιοσύνθεση νικοτινικού οξέως (Καλαϊτζάκης Ι., 1995).

Ο πυρρολιδινικός δακτύλιος της νικοτίνης βιοσυντίθεται από την ένωση του συντιθέμενου νικοτινικού οξέος με ένα μόριο ορνιθίνης σύμφωνα με την αντίδραση:



Εικ. 1.3 : Βιοσύνθεση νικοτίνης (Καλαϊτζάκης Ι., 1995).



Για τον σχηματισμό της νικοτίνης έχει προηγηθεί μεθυλίωση της ορνιθίνης, ενώ με απομάκρυνση της μεθυλικής της ομάδας στα φύλλα μετατρέπεται σε νορνικοτίνη. (Καλαϊτζάκης Ι., 1995)

Ο ακριβής μηχανισμός δράσης της νικοτίνης στην παθογένεση του καρκίνου του πνεύμονα παραμένει άγνωστος.

Οι Heusch et al, 1998, αναφέρουν ότι η νικοτίνη:

- 1) ενεργοποιεί την μιτογόνο-ενεργοποιούμενη πρωτεΐνη (MAP: mitogen-activated protein) στα καρκινικά κύτταρα, ειδικότερα της εξωκυτταρικής σηματορρυθμιζόμενης κινάσης 2 (ERK2: extracellular signal regulated kinase 2), με αποτέλεσμα την αυξημένη έκφραση της bcl-2 πρωτεΐνης και την αναστολή της απόπτωσης αυτών των κυττάρων.
- 2) μπλοκάρει την αναστολή της δράσης της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC: protein kinase C) και της ERK2 που προκαλούν οι αντικαρκινογόνοι παράγοντες όπως τα θεραπευτικά οπιοειδή που χρησιμοποιούνται στην θεραπεία του καρκίνου.

Η δράση αυτή της νικοτίνης παρατηρείται σε συγκεντρώσεις $<1\mu\text{M}$ που είναι γενικά ανιχνεύσιμες στο αίμα των καπνιστών και θα μπορούσε να οδηγήσει σε διακοπή της κρίσιμης ισορροπίας μεταξύ κυτταρικού θανάτου και κυτταροδιαίρεσης, με αποτέλεσμα την ακανόνιστη αύξηση των κυττάρων (Heusch WL. et al, 1998).



1.2. ΑΕΡΙΟ ΠΡΟΪΟΝ ΤΟΥ ΚΑΠΝΟΥ ΚΑΙ ΑΛΚΑΛΟΕΙΔΗ

1.2.1. ΓΕΝΙΚΑ

Το κάπνισμα ενοχοποιείται για μια σειρά ασθενειών όπως τις καρδιαγγειακές παθήσεις (νόσος στεφανιαίων αγγείων, υπέρταση, απόφραξη περιφερειακών αγγείων, οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, εγκεφαλική ισχαιμία, καρδιαγγειακή ανεπάρκεια) (Haustein ΚΟ., 1999) και τις χρόνιες πνευμονικές παθήσεις, τον καρκίνο των πνευμόνων και του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος, τον καρκίνο του παγκρέατος, του πυελοκαλυκτικού συστήματος και της ουροδόχου κύστεως. Επίσης φαίνεται να έχει σχέση με τον καρκίνο του ήπατος, με τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας και με τον καρκίνο της ρινικής κοιλότητας όπως και με την μυελογενή λευχαιμία (Hoffmann D. et al, 1997α). Ακόμα πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι ο καπνός του τσιγάρου οδηγεί στην καθυστέρηση της λειτουργικής ανάπτυξης των πνευμόνων στην προεφηβική ηλικία (Jedrychowski W. et al, 1999), εμποδίζει την σύνθεση προγεστερόνης (Gocze PM. et al, 1996), προκαλεί καταστολή του βασικού μεταβολισμού των μακροφάγων (Edwards K. et al, 1999) και σχετίζεται με την αυξημένη εμφάνιση νεοπλασιών του παχέος εντέρου (Potter JD., 1999)

1.2.2. ΑΕΡΙΟ ΠΡΟΪΟΝ ΚΑΠΝΟΥ

Το αέριο προϊόν του καπνού σχηματίζεται κατά την στιγμιαία καύση σε πολύ υψηλές θερμοκρασίες της στερεάς ουσίας και περνώντας από μια γρήγορη διαδικασία πτώσης της θερμοκρασίας του καταλήγει σε συμπυκνωμένη μορφή. Το αέριο προϊόν περιέχει 10^8 - 10^{10} σωματίδια ανά cm^3 με γραμμική ταχύτητα 35-50 m/sec (Morie GP. et al, 1977). Ο κύριος όγκος του αποτελείται από μόνιμα αέρια, αλλά έχουν αναγνωρισθεί περισσότερα από 2.300 συνθετικά μέσα σ' αυτά, τα κυριότερα από τα οποία είναι:

ΠΙΝΑΚΑΣ 1.3 : Συστατικά του αέριου προϊόντος του καπνού (Rodgman A., 1969).

Συστατικά καπνού	Βάρος %
Αέρια	76,0
CO+CO ₂	16,8
Νερό	2,1
Άλλα συστατικά :	5,1:
Ουδέτερα οξυγονωμένα	28,7
Υδρογονάνθρακες	30,7
Οξέα	11,8
Ετεροκυκλικές ενώσεις N	8,9
Χρωστικές	3,5
Φαινόλες	3,1
Νιτρίλια	2,4
Μη αναγνωρισμένα	14,5
Διάφορα	- 6,4



1.2.3. ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΑΕΡΙΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

Δύο κατηγορίες αέριου προϊόντος διακρίνονται:

- α. Το κύριο ρεύμα καπνού (MS:mainstream smoke) που παράγεται κατά την εισπνοή του τσιγάρου στο ακραίο σημείο του και που εισπνέεται κυρίως από τον καπνιστή παρουσιάζοντας όξινη αντίδραση.
- β. Το παράπλευρο ρεύμα καπνού (SS:sidestream smoke) που είναι το κλάσμα του αέριου προϊόντος που αφήνει το υποκαιγόμενο άκρο του τσιγάρου κατευθείαν στον αέρα, μεταξύ των εισπνοών, συνεισφέροντας ουσιαστικά στον περιβαλλοντικό καπνό (ETS:environmental tobacco smoke) και εδώ η αντίδραση είναι αλκαλική.

Ο καπνιστής έχει πρόσβαση μόνο στο κύριο ρεύμα καπνού (Edwards K. et al, 1999). Ο όγκος αυτός είναι λιγότερος από το 50% του συνολικού αέριου προϊόντος και προέρχεται εξολοκλήρου από το ακραίο 25% της ακτίνας του τσιγάρου. Το περιφερειακό αυτό τμήμα του τσιγάρου, είναι η περιοχή που υπόκειται την μεγαλύτερη καύση κάτω από τις υψηλότερες θερμοκρασίες, κατά την εισπνοή. Ο μεγαλύτερος όγκος του κυρίου ρεύματος καπνού φτάνει στο επιστόμιο του τσιγάρου σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Μόνο η μια ή δύο τελευταίες εισπνοές φτάνουν σε θερμοκρασία 90°C.

1.2.4. ΚΛΑΣΜΑΤΑ ΚΑΠΝΟΥ ΤΣΙΓΑΡΟΥ

Ο καπνός του τσιγάρου (κύριο και παράπλευρο ρεύμα) χωρίζεται σε δύο κλάσματα:

1. Την σωματιδιακή φάση (TPM: Total Particulate Matter)(ή εσφαλμένα “πίσσα”)
2. Την αέρια φάση

Η φάση TPM είναι το κλάσμα του συγκρατείται από ένα τυπικό φίλτρο Cambridge, ενώ η αέρια φάση περνά μέσα από το φίλτρο και καταλήγει στον καπνιστή.

Το πρώτο κλάσμα αποτελείται κυρίως από νερό και πολλές οργανικές ενώσεις με διάμετρο <0,1 μm-1 μm που συγκρατούνται κατά 99,9% από το φίλτρο (Morie GP., 1977).

Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις νικοτίνης έχουν διάμετρο 0.5-0.75 μm και δεν συγκρατούνται ικανοποιητικά από τα όξινα φίλτρα που είναι αποτελεσματικά κυρίως για τα μόρια μικρού και μεγάλου μεγέθους (Morie GP. et al, 1977).

Τόσο η TPM όσο και η αέρια φάση του κύριου ρεύματος καπνού πηγάζουν από την περιφέρεια του τσιγάρου.



Η TPM φάση του παράπλευρου ρεύματος καπνού πηγάζει κύρια από την περιφέρεια του τσιγάρου, ενώ η αέρια φάση του πηγάζει από τον πυρήνα του που καίγεται με μικρότερη ταχύτητα κυρίως μεταξύ των εισπνοών. Η TPM φάση αποτελεί το 5-10% του ολικού αέριου προϊόντος.

Τα νιτρογενή συστατικά του αέριου προϊόντος του καπνού έχουν γίνει αντικείμενο μελέτης πολλών ερευνητών (Stedman RL., 1968, Schmeltz I. et al, 1977). Οι Hecht et al (1977) αναφέρουν ότι η κύρια προέλευσή τους είναι είτε οι σύνθετες πυρολυτικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα κατά την καύση, είτε η άμεση μεταφορά τους από την στερεά στην αέρια φάση, είτε συνδυασμός των δύο αυτών τρόπων.

Στην πρώτη περίπτωση εντάσσονται οι πυριδίνες, οι ινδόλες τα νιτρίλια, οι αρωματικές αμίνες, οι πτητικές νιτροζαμίνες και οι νιτροενώσεις. Στην δεύτερη περίπτωση ανήκουν τα αλκαλοειδή, τα αμινοξέα και οι αλειφατικές αμίνες.

Οι πυρρόλες, οι πυραζίνες, οι μη -πτητικές νιτροζαμίνες και οι υδραζίνες μπορούν να προέλθουν είτε από αντιδράσεις είτε από άμεση μεταφορά.

Στον καπνό (αέριο προϊόν) υπάρχουν πολλά αλκαλοειδή και άλλες βάσεις από τα οποία η νικοτίνη είναι το πιο σημαντικό. Η νικοτίνη μεταφέρεται από το φύλλο στο αέριο προϊόν σε αναλογία - 15% και βρίσκεται είτε υπό μορφή ελεύθερης βάσης είτε υπό μορφή αλάτων, ανάλογα με την οξύτητα του φύλλου. Τα τσιγάρα είναι συνήθως όξινα ανεξάρτητα από την αναλογία όξινων ποικυλίων στο χαρμάνι.

Γενικά θεωρείται ότι 20% της μεταφερόμενης νικοτίνης βρίσκεται στην TPM φάση του κυρίου ρεύματος καπνού και πολύ μικρότερο ποσοστό στην αέρια φάση του. Μια μεγαλύτερη αναλογία νικοτίνης βρίσκεται στο παράπλευρο ρεύμα καπνού και μια πολύ μεγαλύτερη αναλογία (-50%) βρίσκεται στο αέριο κλάσμα του (Johnson WR., 1977).

Πολλοί ερευνητές έχουν μελετήσει την επίδραση της σύστασης του φύλλου στην σύσταση του αέριου προϊόντος (Green CR., 1977), όπως και την προέλευση των νιτρογενών συστατικών (Hecht SS et al, 1977) του καπνού του τσιγάρου. Σε άλλες έρευνες γίνεται σύγκριση στην σύσταση του αέριου προϊόντος που προέρχεται από διαφορετικούς τύπους καπνού (Griest WH. et al, 1977). Οι καλλιεργητικοί χειρισμοί μπορούν να αλλοιώσουν την αναμενόμενη σύσταση του αέριου προϊόντος (Tso TC., 1972), ενώ έχει γίνει επίσης συσχετισμός μεταξύ της σύστασης του αέριου προϊόντος και της σχετικής θέσης του φύλλου στο στέλεχος του φυτού. Για την νικοτίνη που περιέχεται στο αέριο προϊόν έχει βρεθεί ότι η συγκέντρωσή της αυξάνεται από την βάση στην κορυφή του φυτού (Tso TC. et al, 1973).



1.2.5. ΣΥΣΤΑΣΗ ΑΕΡΙΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ ΚΑΠΝΟΥ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΓΟΝΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Τα τελευταία 50 χρόνια περισσότεροι από 50 καρκινογόνοι παράγοντες εντοπίστηκαν και ταυτοποιήθηκαν στο αέριο προϊόν του καπνού. Σε αυτούς περιλαμβάνονται οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (PAH: polycyclic – aromatic hydrocarbons), οι αρωματικές αμίνες, οι N-νιτροζαμίνες του καπνού (TSNA: tobacco specific nitrosamines) και τα βαρέα μέταλλα (Hoffmann D. et al, 1997β). Σύμφωνα με βιβλιογραφική έρευνα του Διεθνούς Οργανισμού για την έρευνα του καρκίνου (IARC), εννέα (9) από τους σαράντα-τέσσερις (44) κύριους χημικούς παράγοντες της υπ' αριθ. I ομάδας καρκινογόνων παραγόντων (Group I) έχει αναφερθεί ότι περιέχονται στο κύριο ρεύμα (mainstream) του καπνού του τσιγάρου και είναι το βενζένιο, το κάδμιο (Cd), το αρσενικό (As), το νικέλιο (Ni), το χρώμιο (Cr), η 2-ναφθιλαμίνη, το βινυλοχλωρίδιο, το 4-αμινοδιφαινύλιο και το βυρήλλιο (Be). Οι συγκεντρώσεις τους στο αέριο προϊόν ποικίλουν ευρέως (βενζένιο: 0.05-104 mg/ τσιγάρο, Cd: 0-6,67 mg/ τσιγάρο, As: 0-1,4 mg/ τσιγάρο, Ni: 0-0.51 mg /τσιγάρο, Cr: 0,0002-0,5 mg/τσιγάρο, 2-ναφθιλαμίνη: 0,0002-0,022 mg/τσιγάρο, βινυλοχλωρίδιο: 0,0013-0,0158 mg/τσιγάρο, 4-αμινοδιφαινύλιο: 0,00019-0,005 mg/τσιγάρο, και Be: 0-0,0005 mg/τσιγάρο) και επηρεάζονται από τον τύπο του εξεταζόμενου τσιγάρου και τον χρόνο ανάλυσής του (Smith CJ. et al, 1997).

Παράλληλα, από το 1950 άλλαξε σταδιακά η παρασκευή των εμπορικών τσιγάρων και η σύσταση του αέριου προϊόντος, καθώς το κύριο μέλημα των εταιριών παραγωγής τσιγάρων ήταν η μείωση της νικοτίνης και της “πίσσας” ανά τσιγάρο και η χημική τροποποίηση του καπνού. Αυτά επιτεύχθηκαν με την εισαγωγή φίλτρου με ή χωρίς διάτρηση (perforation), με την προσεκτική επιλογή των καλλιεργούμενων ποικιλιών και τύπων καπνού, με την χρήση ιδιαίτερα πορώδους χαρτιού περιτυλίγματος και με την ενσωμάτωση διαφορετικών τμημάτων του φυτού στο χαρμάνι.

Στις περισσότερες χώρες όπου χρησιμοποιούνται ποικιλίες air-cured, αυξήθηκε το περιεχόμενο του τσιγάρου σε νιτρικά προκειμένου να βελτιωθεί η πλήρης καύση του καπνού και να μειωθούν οι καρκινογόνοι PAH. Ταυτόχρονα όμως, η αυξημένη παραγωγή οξειδίων του αζώτου είχε ως αποτέλεσμα την ενίσχυση του σχηματισμού των καρκινογόνων N-νιτροζαμινών, ειδικά των TSNA (tobacco specific nitrosamines) στο αέριο προϊόν (Hoffmann D., 1997α).



Η τροποποίηση της χημείας του αέριου προϊόντος φαίνεται ότι συνδέεται άμεσα με την αλλαγή στην συχνότητα εμφάνισης ορισμένων τύπων καρκίνου που σχετίζονται με τον ένα ή τον άλλο καρκινογόνο παράγοντα (Hoffmann D. et al, 1997β).

Μαζί με την αλλαγή στην σύσταση του προϊόντος, άλλαξαν και οι καπνιστικές συνήθειες των σύγχρονων καπνιστών, κυρίως εκείνων που κάνουν χρήση light και ultra-light τσιγάρων με φίλτρο και που σε πρόσφατες καπνιστικές δοκιμές βρέθηκε ότι αύξησαν τόσο την συχνότητα, όσο και τον όγκο εισπνοών ανά λεπτό, προκειμένου να ικανοποιήσουν τις ανάγκες τους σε νικοτίνη. Οι καπνιστές αυτών των τύπων τσιγάρων φαίνεται ότι ρύθμισαν τις καπνιστικές τους συνήθειες, εισπνέοντας βαθύτερα και συχνότερα, με αποτέλεσμα να παρατηρείται αύξηση των παραγόμενων καρκινογόνων TSNA, με συνεπακόλουθη αύξηση των σχετιζόμενων με τις TSNA τύπων καρκίνου (Hoffmann D. et al, 1997 a, Stellman SD. et al, 1997).

Σήμερα, για τη μείωση των περισσότερων καρκινογόνων παραγόντων της “Ομάδας Ι καρκινογόνων κατά IARC” στο αέριο προϊόν του καπνού και μετά από συσχετισμούς που έγιναν ανάμεσα σε αυτούς τους παράγοντες και τις αγρονομικές και περιβαλλοντικές συνθήκες ανάπτυξης του φυτού του καπνού, επικρατεί η άποψη ότι θα πρέπει να γίνει πλέον χρήση λιπασμάτων στην καλλιέργεια με χαμηλή συγκέντρωση νιτρικών και βαρέων μετάλλων (Smith CJ. et al, 1997).

1.2.6. ΧΗΜΕΙΑ - ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ ΤΩΝ TSNA

Οι N-νιτροζαμίνες του καπνού (TSNA) είναι ουσίες που προκύπτουν από το μεταβολισμό της νικοτίνης και των ελασσόνων αλκαλοειδών που περιέχει ο καπνός κατά την διάρκεια της επεξεργασίας και της αποθήκευσής του και με το κάπνισμα (Hecht SS et al, 1978). Τα περισσότερα αλκαλοειδή είναι δευτεροταγείς και τεταρτοταγείς αμίνες που υπόκεινται σε N-νιτροποίηση σε σχηματισμό N-νιτροζαμινών (TSNA).

Στις δευτεροταγείς αμίνες, η νιτροποίηση γίνεται σε μεγάλη ταχύτητα, με αντικατάσταση του υδρογόνου που είναι δεσμευμένο στο N από μια -NO ομάδα.

Η νιτροποίηση των δευτεροταγών νορνικοτίνη, αναβασίνη και αναταμπίνη δίνει τις N-νιτροζαμίνες N-νιτροζονορνικοτίνη (NNN:N-nitrosornicotine), N-νιτροζοαναμπασίνη (NAB:N-nitrosoanabasine) και N-νιτροζοαναταμπίνη (NAT:N-nitrosoanatabine), ενώ η νιτροποίηση της τεταρτοταγούς νικοτίνης δίνει NNN (N-nitrosornicotine) με διάνοιξη του N-CH₃ δεσμού και απώλεια της φορμαλδεύδης ή δίνει 4-(μεθυλνιτριζαμινο)-1-(3-πυριδυλ)-1-βουτανόνη (NNK :4-(methylnitrosamino)1-

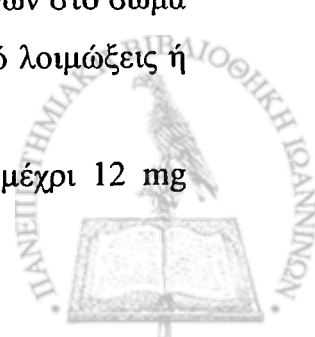
(3-pyridyl)-1-butanone) ή 4-(μεθυλνιτροζαμινο)-4-(3-πυριδυλ)-βουτανάλη (NNA:4-(methylnitrosamino)-4-(3-pyridyl)-butanal) με διάνοιξη είτε του 2'-N είτε του 5'-N δεσμού αντίστοιχα (εικ.1.1) (Hoffmann D., 1985).

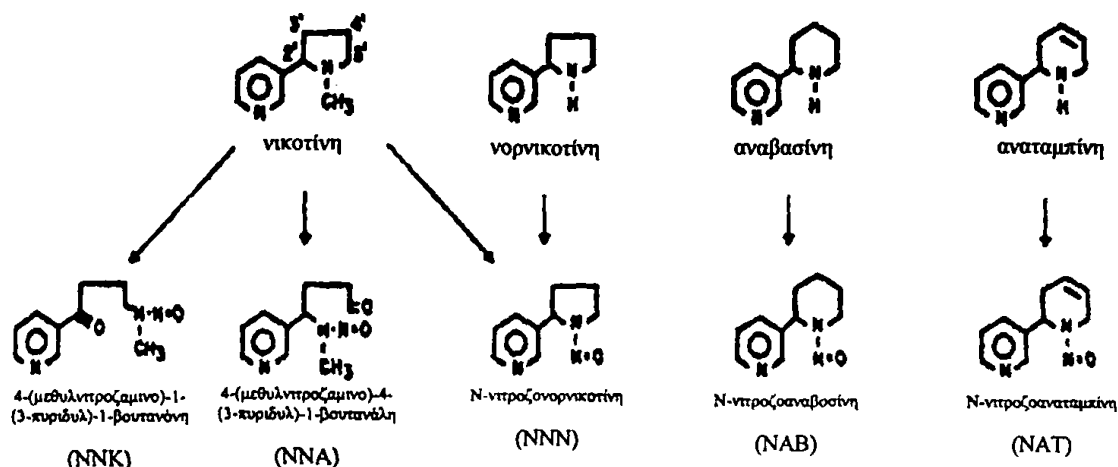
Από τα NNK παράγεται η 4-(μεθυλνιτροζαμινο)-1-(3-πυριδυλ)-1-βουτανόλη (NNAL:4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol), ενώ με αναγωγή και οξείδωση του NNA παράγονται αντίστοιχα η 4-(μεθυλνιτροζαμινο)-4-(3-πυριδυλ)-1-βουτανόλη (iso-NNAL:4-(methylnitrosamino)-4-(3-pyridyl)-1-butanol) και η 4-(μεθυλνιτροζαμινο)-4-(3-πυριδυλ)-βουτυρικό οξύ (iso-NNAC :4-(methylnitrosamino)-4-(3-pyridyl)-butyric acid).

Όλες οι TSNA εκτός της NNA έχουν ανιχνευτεί στα τσιγάρα και στο κύριο και παράπλευρο ρεύμα του αερίου προϊόντος τους (Hoffmann D et al,1994).Στο αέριο προϊόν, 25-45% των TSNA φθάνει με άμεση μεταφορά από τον καπνό, ενώ το υπόλοιπο πυροσυντίθεται πιθανόν με αντίδραση των αλκαλοειδών με τα οξείδια του αζώτου. Όσο μεγαλύτερα είναι τα επίπεδα νιτρικών στον καπνό, τόσο μεγαλύτερη είναι η παραγωγή TSNA στο αέριο προϊόν του, με αποτέλεσμα το κύριο ρεύμα καπνού προερχόμενου από ποικιλίες υψηλής συγκέντρωσης νιτρικών οξέων να είναι ιδιαίτερα επιβαρημένο σε TSNA (Burton H. et al, 1992).

Στα τσιγάρα τύπου light και ultra light, το κύριο ρεύμα καπνού έχει υψηλές τιμές TSNA, λόγω των καπνιστικών συνηθειών των καπνιστών αυτού του τύπου τσιγάρων. Στο περιφερειακό ρεύμα καπνού ανιχνεύεται κυρίως NNK που αναπτύσσεται από το υποκαιγόμενο άκρο του τσιγάρου, μεταξύ των εισπνοών, επιβαρύνοντας τον περιβάλλοντα χώρο και κατά συνέπεια τους μη καπνιστές οι οποίοι, σε εργασία αναφέρεται ότι όταν παρέμειναν για περισσότερες από 2 ώρες στον χώρο αυτό παρουσίασαν μετρήσιμες τιμές μεταβολιτών NNK στα ούρα.(Brunnemann KD. et al, 1996a).Ο άνθρωπος εκτίθεται στις N-νιτροζαμίνες μέσω της διατροφής, των καλλυντικών, των φαρμακευτικών προϊόντων, των αγροχημικών, των προϊόντων καπνού και με ενδογενή σχηματισμό από πρόσληψη αλκαλοειδών και οξειδίων του αζώτου ή νιτρικών, σε μεγαλύτερο βαθμό στους καπνιστές και σε μικρότερο στους μη καπνιστές (Tsuda M. et al, 1986). Ο ενδογενής σχηματισμός οφείλεται στην όξινη ή βακτηριακή κατάλυση της αναγωγής των νιτρικών σε νιτρώδη και νιτροποίηση των αμινών στο σώμα ή με τις αντιδράσεις των προϊόντων του νιτρικού οξέος προερχόμενων από λοιμώξεις ή φλεγμονές (Hecht SS, 1997).

Το κάπνισμα 20 τσιγάρων ημερησίως συμβάλλει στην πρόσληψη μέχρι 12 mg οξειδίων του αζώτου (NOx) και 30 mg νικοτίνης και άλλων αμινών.





Εικ. 1.4: Βιοσύνθεση των N-νιτροζαμινών του καπνού (TSNA: Tobacco Specific N-nitrosamines) από τα αλκαλοειδή του καπνού (Hoffmann D. et al, 1994).

Η νιτροποίηση στο αέριο προϊόν αποδείχτηκε με βάση το γεγονός ότι η απέκκριση μέσω των ούρων της N- νιτροζοπρολίνης στους καπνιστές είναι αυξημένη (5,9 mg/24l) σε σχέση με τους μη καπνιστές (3,6 mg / 24 l), κάτω από την ίδια δίαιτα.

Μελέτες με βιοιχνηθέντες έδειξαν υψηλά επίπεδα συμπλεγμάτων αιμοσφαιρίνης με μεταβολίτες των NNN και NNK στους καπνιστές, όπως και μεταβολίτες των NNK που απεκκρίνονται μέσω των ούρων, αποτελέσματα που είναι σύμφωνα με επιδημιολογικές μελέτες (Brunnemann KD. et al, 1996α).

Η ουσία που ελευθερώνεται από τα συμπλέγματα αιμοσφαιρίνης είναι η 4-υδροξυλ-1-(3-πυριδύλ)-1-βουτανόνη (HPB :4-hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanone) και είναι μόνος βιοιχνηθέντης που μπορεί να χρησιμοποιηθεί στον προσδιορισμό της έκθεσης και μεταβολικής ενεργοποίησης των TSNA (Hecht SS. et al, 1991α).

Οι μεταβολίτες των NNK που απεκκρίνονται μέσω των ούρων είναι οι 4-(μεθυλνιτροζαμινο)-1-(3-πυριδο)-1-βουτανόλη (4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol) και το γλυκουρονίδιο της, που στους καπνιστές κυμαίνονται από 0,23 έως 1,0 και από 0,57 έως 6,5 mg/24l, αντίστοιχα (Carmella S. et al, 1993).

Επίσης, μετρήσιμες τιμές (11,9-115 ng/g) της NNK ανιχνεύτηκαν στην τραχηλική βλέννα των καπνιστών (Prokopczyk B. et al, 1997), γεγονός που ισχυροποιεί την σχέση μεταξύ του καρκίνου του τραχήλου και του καπνίσματος.

Οι TSNA που περιέχονται στο αέριο προϊόν ανιχνεύτηκαν με διάφορες χρωματογραφικές μεθόδους (HPLC χρωματογραφία) και έγιναν συγκρίσεις ως προς την περιεκτικότητα TSNA στις διάφορες μάρκες και τύπους τσιγάρων (Fischer S. et al, 1990- Brunnemann KD. et al, 1996β).

Οι τιμές των TSNA (ολικά TSNA) στο κύριο ρεύμα καπνού των διαφόρων τύπων τσιγάρων κυμαίνονται από 98-1285 ng/τσιγ., όπου το NNN κυμαίνεται από 28-730 ng/τσιγ., το NNK από 16-369 ng/τσιγ., το NAT από 37-255 ng/τσιγ. και το NAB από 4,5-54 ng/τσιγ. Η υψηλότερη συγκέντρωση TSNA παρατηρήθηκε σε τσιγάρα άφιλτρα και με υψηλό περιεχόμενο πίσσας (22,3-28,1 mg/τσιγ.) και νικοτίνης (1,78-24,2 mg/τσιγ.), οπότε οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι υπάρχει σχέση μεταξύ TSNA και πίσσας και νικοτίνης στο κύριο ρεύμα καπνού (Brunnemann KD. et al, 1996β).

Συσχετισμοί έγιναν και μεταξύ της περιεκτικότητας του αέριου προϊόντος σε TSNA και άλλων παραμέτρων του καπνίσματος (διάρκεια, όγκος εισπνοών κλπ.) (Hoffmann D, 1994).

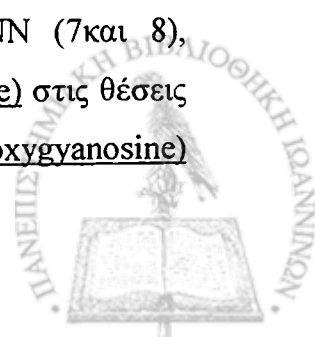
1.2.7. ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΩΝ TSNA

Οι νιτροζαμίνες μετατρέπονται ενζυμικά σε ασταθή ηλεκτροφιλικά ενδιάμεσα που μπορούν να αντιδράσουν με τα πυρηνόφιλα κέντρα ορισμένων κυτταρικών μακρομορίων, όπως το DNA (εικ.1.2).

Η ενζυματική υδροξυλίωση του α-άνθρακα της NNK οδηγεί στο ασταθές ενδιάμεσο προϊόν N-μεθυλ-N-υδροξυμεθυλνιτροζαμίνη (N-methyl-N-hydroxymethyl-nitrosamine) με χρόνο ημίσειας ζωής = 10sec, που αυθόρμητα αποσυντίθεται σε μεθυλδιαζουδροξείδιο (methyldiazohydroxide) (6), το οποίο αντιδρά με το μόριο του DNA δίνοντας μετά από υδρόλυση μεθυλιωμένες βάσεις συμπεριλαμβανομένων των 7-μεθυλγουανίνη και O^6 -μεθυλγουανίνη (O^6mG) (Hecht SS. et al, 1989).

Η O^6 μεθυλγουανίνη προκαλεί λάθη στην αντιγραφή της νουκλεοτιδικής αλυσίδας του DNA λόγω ενσωμάτωσης της θυμίνης (T). Τα επίπεδα της O^6mG που προκύπτουν από υδροξυλίωση του NNK βρέθηκαν υψηλότερα στους καπνιστές από ότι τους μη καπνιστές (Foiles PG. et al, 1991).

Στο NNN, η υδροξυλίωση του α-άνθρακα, παράγει διαζουδροξείδια (diazohydroxides) τόσο in vivo όσο και in vitro, ένα από τα οποία - παραγόμενο μέσω 2'-υδροξυλίωσης είναι το 4-(3-πυριδυλ)-οξοβουτυλδιαζουδροξείδιο (4-(3-pyridyl)-4-oxobutyl-diazohydroxide), ενώ το άλλο - παραγόμενο μέσω 5'-υδροξυλίωσης - είναι το 1-(3-πυριδυλ)-3-φορμυλ-προπυλδιαζουδροξείδιο (1-(3-pyridyl)-3-formyl-propyldiazohydroxide). Τα παραγόμενα διαζουδροξείδια (diazohydroxide) του NNN (7και 8), μπορούν να αντιδράσουν in vitro με την δεοξυγουανοσίνη (deoxyguanosine) στις θέσεις 1 και N^2 , παράγοντας κυκλικά προπανοδεοξυγουανοσίνη (propanodeoxyguanosine) πρόσθετα DNA.



Η Ο⁶mG ανιχνεύτηκε στο DNA του πνεύμονα, της ρινικής κοιλότητας και του ήπατος πειραματόζων (Hecht SS. et al, 1986 και Peterson L. et al, 1991). Στον πνεύμονα, η Ο⁶mG προκαλεί λάθη στην νουκλεοτιδική αλυσίδα πειραματόζων που μπορεί να προκαλέσουν αδένωμα και αδenoκαρκίνωμα, και τα οποία έχει βρεθεί ότι περιέχουν ενεργοποιημένα K-ras πρωτοογκογονίδια κυρίως με G-A μετάβαση, στο κωδικόνιο 12 (Oreffo V. et al, 1993, Kawano R. et al, 1996).

Σε ανθρώπινο πνεύμονα καπνιστών με αδenoκαρκίνωμα, εντοπίστηκαν ενεργοποιημένα K-ras ογκογονίδια με μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 12, σε ~ 24% των περιπτώσεων που εξετάστηκαν, με 80% αμφιμετατροπές τύπου G-T, και 20% μεταβάσεις (Rodenhuis S. et al, 1992). Οι G-T αμφιμετατροπές, εκτός από την πυριδυλοξοβουτυλίωση των NNN και NNK έχει βρεθεί ότι μπορεί να οφείλονται και σε άλλα δυσστατικά του αέριου προϊόντος, όπως οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (Singer B. et al, 1991, Ronai Z. et al, 1993).

Μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 12 του K-ras γονιδίου λόγω G-A μετάβασης προκλήθηκαν *in vitro* και σε κύτταρα του παγκρεατικού πόρου πειραματόζων μετά από επεξεργασία με NNK, τοξικότητα χρόνο-και δοσο-εξαρτώμενη (Baskaran K. et al, 1994).

Για το NNN, θεωρείται ότι το προϊόν της 2-υδροξυλίωσης του είναι υπεύθυνο για την παραγωγή πυριδυλοξοβουτυλιωμένου DNA στον οισοφάγο και την ρινική κοιλότητα ποντικών (Patten CJ. et al, 1997), ενώ για το NNAL, παρόλο που παράγει μεθυλιωμένα και πυριδυλοξοβουτυλιωμένα ενδιάμεσα (Hecht SS, 1999a), ορισμένοι ερευνητές πιστεύουν ότι δεν προκαλεί καρκινογένεση στους πνεύμονες, το ήπαρ και τα νεφρά, αλλά ενισχύει τον ρόλο της N-δινιτροζο (2-οξοπροπυλ) αμίνη (BOP : N-nitrosobis (2-oxopropyl) amin) στην καρκινογένεση του εξωκρινούς παγκρέατος (Furukawa F. et al, 1997).

Η μεταβολική ενεργοποίηση των TSNA οφείλεται στα ένζυμα του κυτοχρώματος P450. Από τα γνωστά κυτοχρώματα του ανθρώπινου ήπατος τα P4501A2, P4502A6 και P4502E1 μπορούν να ενεργοποιήσουν τις νιτροζαμίνες σε γονοτοξικά προϊόντα (Guengerich FP. et al, 1994) που μπορούν να προκαλέσουν τη μεθυλίωση και πυριδιξοβουτυλίωση του DNA με επακόλουθο την έναρξη της καρκινογένεσης.

Τα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για την ενεργοποίηση του NNK στον άνθρωπο δεν έχουν ταυτοποιηθεί. Σε έρευνες όπου μελετήθηκε ο μεταβολισμός της NNK στον ανθρώπινο πνεύμονα και μικροσώματα του ήπατος και σε 12 μορφές ανθρώπινων κυτοχρωμάτων P450 εκφρασμένων σε κύτταρα ηπατώματος, βρέθηκε ότι το P4501A2 έχει την μεγαλύτερη καταλυτική δράση και ότι ο πνεύμονας και το ήπαρ έχουν παρόμοιο

μεταβολικό μοντέλο παρόλο που τα μεταβολικά παράγωγα διαφέρουν στα δύο όργανα, πιθανόν λόγω διαφοράς ενζύμων.

Δεν είναι γνωστό αν αυτή η διαφορά παραγώγων και ενζύμων, επηρεάζει την ευαισθησία των δύο αυτών οργάνων στην τοξικότητα και την καρκινογένεση που προκαλεί το NNK (Smith TJ. et al, 1992).

Οι Patten et al (1997) αναφέρουν ότι τα ένζυμα του κυτοχρώματος P4502A6 και τα ένζυμα του κυτοχρώματος P4503A4 των μικροσωμάτων του ανθρώπινου ήπατος μεσολαβούν για την 5'- και 2'-υδροξυλίωση του NNN, όπως αποδείχτηκε πειραματικά με χρωματογραφία αναστροφής φάσης (reverse phase HPLC) (Patten CJ. et al, 1997).

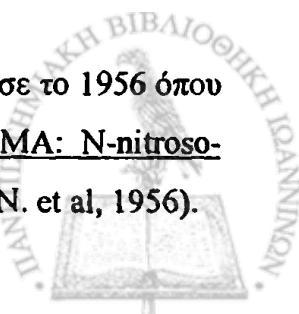
Μαζί με τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450, στη μεταβολική ενεργοποίηση της NNK, φαίνεται ότι συμμετέχουν και τα γονίδια CYP2D6 και CYP2E1, η έκφραση των οποίων αναφέρεται ότι σχετίζεται με τα αυξημένα πρόσθετα DNA και μπορεί πιθανόν να εξηγήσει την γενετική βάση της καρκινογένεσης στο αδеноκαρκίνωμα του πνεύμονα (Kato S. et al, 1995, Le Marchand L. et al, 1998) και το anal και vulvar (Chen H. et al, 1999), παρόλο που ορισμένοι ερευνητές ισχυρίζονται ότι ο πολυμορφισμός του γονιδίου CYP2D6 παίζει ελάχιστο ρόλο στην ανάπτυξη του καρκίνου του πνεύμονα (London SJ. et al, 1997).

Σε άλλη εργασία αναφέρεται ότι η ενεργοποίηση του NNK σχετίζεται με την υπερέκφραση του γονιδίου της κυκλοοξυγενάσης 2 [(COX)-2:cyclooxygenase 2] σε συνδυασμό με δίαιτα υψηλών λιπαρών (HF:high fat), όπως αποδείχθηκε ανοσοιστοχημικά σε δείγματα προχωρημένης νεοπλασίας στον πνεύμονα αρουραίων, όπου τα ποσοστά έκφρασης της COX-2 για τα NNK + HF δείγματα ήταν για το αδένωμα, το αδеноκαρκίνωμα και το αδеноεπιθηλιακό καρκίνωμα 30-60%, 60-90% και >90% αντίστοιχα (El-Bayoumy K. et al, 1999).

Επίσης έχει αναφερθεί ότι η νικοτίνη ενισχύει την δράση των TSNA στους βλεννογόνους ιστούς (Chen YP. et al, 1994) και ότι η αιθανόλη προωθεί την καρκινογόνο δράση των NNN και NNK λόγω αυξημένης υπεροξειδωσης των λιπιδίων στους ιστούς - στόχους (Nachiappan V. et al, 1994).

1.2.8. ΚΑΡΚΙΝΟΓΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ TSNA

Το ενδιαφέρον για την γονοτοξικότητα των N-νιτροζαμινών ξεκίνησε το 1956 όπου όταν παρατηρήθηκε ότι η νιτροζαμίνη N-νιτροζο-διμεθυλαμίνη (NDMA: N-nitroso-dimethylamine) προκαλούσε καρκίνο του ήπατος στα ποντίκια (Magee PN. et al, 1956).



Αργότερα εφαρμόστηκαν διάφορες βιοδοκιμές για τη μέτρηση της καρκινογένεσης που προκαλείται από κυκλικές και TSNA (tobacco specific) νιτροζαμίνες σε πειραματόζωα (Druckey H. et al, 1967, Boyland E. et al 1964).

Σε *in vitro* βιοδοκιμές αποδείχτηκε ότι από τις TSNA που ανιχνεύονται στο αέριο προϊόν του καπνού, οι NNK και NNAL προκαλούν ισχυρή, οι NNN και iso-NNAL μέτρια και η iso-NNAC μηδενική καρκινογένεση (Hoffmann D., 1994)

Η μαρτυρία για την σχέση TSNA και καρκίνου, προήλθε από την παρατήρηση ότι οι χρήστες πρέζας (snuff) προσβάλλονται σε μεγάλη συχνότητα από καρκίνο της στοματικής κοιλότητας, όπου οι TSNA είναι οι μόνοι καρκινογόνοι παράγοντες που περιέχονται σε αυτό το προϊόν του καπνού (snuff) και απορροφώνται σε μεγάλες συγκεντρώσεις από τους χρήστες.

Ο μεγάλος αριθμός καρκινογόνων ουσιών στο αέριο προϊόν του καπνού, καθιστά μάλλον απίθανο τον απόλυτο συσχετισμό ενός ειδικού τύπου καρκίνου που προσβάλλει έναν καπνιστή με μια ιδιαίτερη κατηγορία καρκινογόνων.

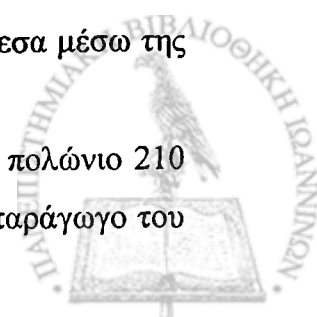
Οι βιοδοκιμές όμως απέδειξαν ότι το 90% των N-νιτροζαμινών που εντοπίζονται, προκαλούν καρκινογένεση σε συγκεκριμένα όργανα (organ-specific) των πειραματόζωων (Liginsky W., 1992), έχοντας ανάλογη δράση με τις αρωματικές αμίνες.

Το NNK ανεξάρτητα από τον τρόπο χορήγησής του, προκαλεί κυρίως πνευμονικά αδενώματα και αδеноκαρκινώματα σε πειραματόζωα, ενώ δευτερεύοντα σημεία ανάπτυξης όγκων είναι η ρινική κοιλότητα και το ήπαρ. Όταν το NNK χορηγείται σε πόσιμο νερό, μαζί με την προσβολή του πνεύμονα, αναπτύσσονται όγκοι και στο εξωκρινές πάγκρεας. (Hoffmann D., 1994)

Η οργανο-ειδική δράση του NNK εξηγείται με δύο τρόπους:

- 1) τα P450 ένζυμα για την α-υδροξυλίωση του NNK, βρίσκονται στον περιφερειακό πνεύμονα, στην ρινική κοιλότητα και το ήπαρ, όπου και προκαλείται καρκινογένεση.
- 2) όταν το NNK απορροφηθεί από τον οργανισμό μεταφέρεται μέσω του κυκλοφοριακού συστήματος στον περιφερειακό πνεύμονα και την ρινική κοιλότητα, περιοχές πλούσιες σε αγγειακό υπόστρωμα (Rivenson A. et al, 1991), και γι' αυτό μπορεί να χαρακτηριστεί και ως "καρκινογόνο του αίματος". Στους καπνιστές βέβαια το NNK απορροφάται και άμεσα μέσω της εισπνοής του αέριου προϊόντος.

Άλλα ισχυρά καρκινογόνα του καπνού, όπως το βενζοπυρένιο και το πολώνιο 210 δρουν σαν τοπικά καρκινογόνα στο βρογχικό βλεννογόνο. Το NNK και το παράγωγο του



NNAL προκαλεί επιπλέον αδένωμα και αδενοκαρκίνωμα των κεντροκυψελιδικών κυττάρων του εξωκρινούς παγκρέατος (Shopland ME. et al, 1991) και για τον λόγο αυτό συγκαταλέγονται στα ισχυρά καρκινογόνα του παγκρέατος.

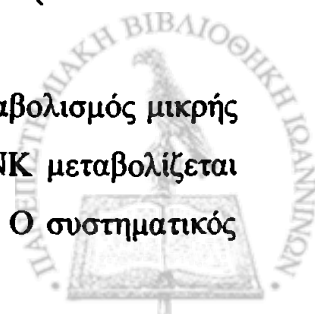
Προκειμένου να ανιχνευτεί η σημασία των πυριδυλοξοβουτυλιωμένων DNA προσθέτων στον καρκίνο του πνεύμονα, δόθηκαν διαφορετικές δόσεις NNK σε πειραματόζωα όπου βρέθηκε ότι τα πρόσθετα ήταν περισσότερα στα κύτταρα Clara, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα ένζυμα που ενέχονται στον μεταβολισμό του NNK, εντοπίζονται κυρίως στα κύτταρα αυτού του τύπου, ενώ μεγάλη συσχέτιση βρέθηκε και μεταξύ των πρόσθετων DNA και της δόσης NNK σε κύτταρα TYPE II (Staretz ME. et al, 1997).

Σε άλλη πειραματική μελέτη (Izzotti A. et al, 1999), εξετάστηκε η ιστική ειδικότητα σχηματισμού και διατήρησης των DNA πρόσθετων σε πειραματόζωα που εκτέθηκαν σε μείγμα κύριου και παράπλευρου ρεύματος καπνού. Με μετρήσεις σεσημασμένου ⁽³²⁾ P υπολογίστηκαν οι λόγοι καπνού / DNA πρόσθετων για διάφορους τύπους οργάνων, ιστών και κυττάρων. Ο λόγος καπνός / DNA πρόσθετα βρέθηκε σε σειρά κατάταξης: επιθήλιο του τραχήλου > κύτταρα BAL > καρδιά > πνεύμονα > ουροδόχο κύστη > όρχεις > ήπαρ. Στην ίδια εργασία βρέθηκε ότι η οξειδωτική δράση του καπνού ενισχύει την παραγωγή 8-υδροξυ-2'-δεοξυγουανωσίνης (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine) στο DNA του πνεύμονα, επάγει την δράση της αρυλυδροκαρβονικής υδροξυλάσης (arylhydrocarbon hydroxylase) των μικροσωμάτων του πνεύμονα, αυξάνει την γλουταθειόν-S-τρανσφεράση του κυτταροπλάσματος και προκαλεί μέτρια εξάλειψη της αναγώμενης γλουταθειόνης. Μετά την διακοπή της έκθεσης για μια εβδομάδα, τα DNA πρόσθετα μειώθηκαν σημαντικά στον πνεύμονα, το επιθήλιο του τραχήλου, την καρδιά και την κύστη.

Σε συγκριτική μελέτη του μεταβολισμού του πνεύμονα και του ήπατος πειραματόζωων, βρέθηκε επίσης ότι και στα δύο όργανα παρατηρείται υψηλός μεταβολισμός του NNK, παρόλο που το NNK εξαλείφεται πολύ γρηγορότερα από το ήπαρ απ' ότι από τον πνεύμονα.

Προϊόντα μεθυλδροξυλίωσης του NNK, ανιχνεύθηκαν στον πνεύμονα αλλά όχι στο ήπαρ, όπου εντοπίστηκαν τα προϊόντα κετοξυ- και NNK-N-οξειδίου (Schrader E. et al, 1998).

Σε άλλη πρόσφατη μελέτη, εξετάστηκε η απορρόφηση και ο μεταβολισμός μικρής συγκέντρωσης NNK στη τραχεία του σκύλου και βρέθηκε ότι η NNK μεταβολίζεται εκτενώς και απορροφάται γρήγορα από τον βλεννογόνο της τραχείας. Ο συστηματικός



μεταβολισμός του ήταν επίσης ταχύς, παρόλο που ο πρώτης διόδου μεταβολισμός και ενεργοποίησή του στο βλεννογόνο των αεροφόρων οδών ήταν επαρκώς γρήγορος ώστε να προκαλέσει επίπεδα DNA-πρόσθετων στο σημείο απορρόφησής του 20 φορές υψηλότερα από ότι σε απομακρυσμένους ιστούς.

Για τον λόγο αυτό θεωρείται ότι το NNK δρα σαν καρκινογόνο του σημείου εισόδου του και αυτό μπορεί να είναι σημαντικό στην εκτίμηση της συμβολής του στον καρκίνο του πνεύμονα (Gerde P. et al, 1998).

Για το NNN έχει αποδειχθεί σε βιοδοκιμές ότι είναι επίσης ισχυρό καρκινογόνο στα πειραματόζωα, παρόλο που δεν είναι τόσο ισχυρό όσο το NNK, προκαλεί όγκους στον πνεύμονα (αδενώματα), τον βλεννογόνο της ρινικής κοιλότητας, και στην τραχεία, ενώ χορηγούμενο με το νερό προκαλεί καρκίνο στον οισοφάγο και δευτερογενώς στον βλεννογόνο της ρινικής κοιλότητας και στην γλώσσα των πειραματόζωων.

Λόγω της χημικής ομοιότητας του NNK και του NNN με την νικοτίνη σε πρόσφατη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν κυτταρικές σειρές από μικροκυτταρικό καρκίνωμα (SCLC: small cell lung carcinoma) και περιφερειακό αδενοκαρκίνωμα (PAC: peripheral adenocarcinoma) με ειδικούς συνδέσμους θέσης άλφα-μπυγκαροτοξίνης (alpha - BTX: alpha-bungarotoxin site-selective ligands) και επιμπατιδίνης (EB: epibatidine), προκειμένου να εντοπιστεί αν οι NNN και NNK συνδέονται με τους νικοτιν-ακετυλοχολίν-υποδοχείς (nAChRs: nicotinic acetylcholine receptors). Στην εργασία βρέθηκε ότι τα PAC κύτταρα έκφρασαν τους νικοτινικούς υποδοχείς με μεγάλη συγγένεια στο EB και ότι το NNN δεσμεύεται με μεγάλη συγγένεια στους EB ευαίσθητους nAChRs των PAC κυττάρων, ενώ τα SCLC κύτταρα έκφρασαν τους νευρωνικούς νικοτινικούς (neuronal nicotinic) υποδοχείς με μεγάλη συγγένεια στην alpha - BTX και ότι το NNK δεσμεύεται με μεγάλη συγγένεια στους alpha -BTX- ευαίσθητους nAChRs των SCLC κυττάρων. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι το NNK μπορεί να συμβάλει στη γένεση του SCLC στους καπνιστές μέσω της χρόνιας ενεργοποίησης των alpha BTX - ευαίσθητων nAChRs υποτύπων που εκφράζονται σε αυτά τα κύτταρα (Schuller HM. et al, 1998).

Από τα υπόλοιπα TSNA που μελετήθηκαν, σε βιοδοκιμή το NAB βρέθηκε ότι είχε μέτρια δράση, το NAT δεν προκάλεσε καρκινογένεση σε δόσεις μέχρι 2,5mmol/ζώο και τα iso-NNAL και iso-NNAC δεν παρουσίασαν καρκινογόνο δράση, πιθανόν λόγω χημικής ομοιότητας με τον πυριδινικό δακτύλιο (Hoffmann D., 1994).



Συγκριτικές μελέτες που αφορούν την καρκινογένεση στον πνεύμονα πειραματόζωων από τα 6 είδη TSNA και δύο σχετικών τους ενώσεων, την NDMA και την NPYR, έδειξαν ότι σε σειρά επικινδυνότητας κατατάσσονται ως εξής:

NDMA>NNK>NNAL>NPYR>NNN>NAB, ενώ ο iso-NNAL και οι iso-NNAC βρέθηκαν ανενεργείς (Amin S. et al, 1996).

Το αέριο προϊόν του καπνού περιέχει τουλάχιστον 50 καρκινογόνες ουσίες (Hoffmann D. et al, 1990), στις οποίες συμπεριλαμβάνονται πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες, προωθητές όγκων, συγκαρκινογόνοι παράγοντες και όργανο-ειδικά καρκινογόνα.

Κατά συνέπεια είναι μάλλον απίθανο να γίνει απόλυτος συσχετισμός μεταξύ ενός ειδικού τύπου καρκίνου που προσβάλλει έναν καπνιστή με μια ιδιαίτερη κατηγορία καρκινογόνων του αέριου προϊόντος του. Η έρευνα εντοπίστηκε επομένως, στις μεγαλύτερες ομάδες μεταλλαξογόνων παραγόντων, κυρίως εκείνων που βρίσκονται αποκλειστικά στον καπνό και το αέριο προϊόν του, μεταξύ των οποίων οι TSNA κατέχουν κυρίαρχη θέση γιατί παράγονται από την εθιστική ουσία νικοτίνη, βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στον καπνό, και έχουν αποδειχθεί ισχυρά καρκινογόνα (Hoffmann D. et al, 1985).

Στα πειραματόζωα, τα DNA πρόσθετα (μεθυλίωσης και πυριδοξοβουτυλίωσης) από τα παράγωγα των TSNA σχετίζονται στενά, σε πολλές περιπτώσεις, με την καρκινογένεση, οπότε είναι πιθανό να υπάρχουν παρόμοιες σχέσεις και στον άνθρωπο (Hecht SS, 1999β).

Τα TSNA έρχονται σε άμεση επαφή με τους ιστούς του άνω γαστρεντερικού σωλήνα, την τραχεία και τον πνεύμονα, όπου από μελέτες αποδείχτηκε ότι μπορεί να γίνει η μεταβολική ενεργοποίησή τους. Οι παρατηρήσεις αυτές ενισχύουν την άποψη ότι τα TSNA συμβάλλουν στον αυξημένο κίνδυνο προσβολής των καπνιστών από καρκίνο στην στοματική κοιλότητα, τον λάρυγγα, τους πνεύμονες και τον οισοφάγο. Τα προϊόντα του μεταβολισμού τους μπορούν να μεταφερθούν μέσω της κυκλοφορίας στο ήπαρ, πάγκρεας, νεφρό και ουροδόχο κύστη, όργανα με αυξημένα ποσοστά καρκίνου στους καπνιστές. Η διαπίστωση αυτή είναι σημαντική καθώς μαζί με τις αρωματικές αμίνες, οι TSNA είναι τα μόνα όργανο-ειδικά καρκινογόνα στο αέριο προϊόν του καπνού (Hoffmann D. et al, 1985).

Παρόλο που οι επιδημιολογικές μελέτες και η μοριακή δοσομετρία ενοχοποίησαν τη 2-ναφθυλαμίνη, την 4-αμινοδιφαινυλαμίνη και άλλες αρωματικές αμίνες για την πρόκληση του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως (Bartch H. et al, 1993) και πειραματικά



δεδομένα έκαναν συσχετισμούς μεταξύ των NNK και NNAL με τον αυξημένο κίνδυνο προσβολής από καρκίνο του παγκρέατος στους καπνιστές (Hecht SS. et al, 1991β), οι συσχετισμοί αυτοί βασίζονται σε περιορισμένες πληροφορίες.

Το μοναδικό συστατικό του καπνού για το οποίο υπάρχουν ισχυρά επιχειρήματα ως προς την αιτιολογική σχέση του με κάποιο τύπο καρκίνου είναι η NNK, για την οποία υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι προκαλεί αδеноκαρκίνωμα στον πνεύμονα των καπνιστών.

Οι ενδείξεις αυτές είναι:

1. Το NNK προκαλεί αδеноκαρκίνωμα πνευμόνων του ίδιου τύπου που παρατηρείται στους καπνιστές σε όλα τα πειραματόζωα και με όλους τους διαφορετικούς τύπους και σημεία χορήγησής του.
2. Η δόση NNK σε mg/kg που παίρνει τόσο ένας βαρύς καπνιστής (1,4 mg/Kg) όσο και ένας χαμηλής εμβέλειας (low – yield) καπνιστής κατά την διάρκεια της ζωής του, υπερβαίνει κατά πολύ την ελάχιστη δόση που προκαλεί αδένωμα και αδеноκαρκίνωμα στα ποντίκια σε πειραματική διάταξη.
3. Η μέγιστη ποσότητα του εισπνεόμενου NNK μεταβολίζεται σε NNAL και απεκκρίνεται στα ούρα ως ελεύθερη αλκοόλη ή ως γλυκουρονισμένη. Τα μέσα επίπεδα αυτών των μεταβολιτών σε όγκο ούρων 24ωρου κυμαίνονται στα 11,4 mmol (Carmella S. et al, 1993). Η ολική απέκκριση μέσω ούρων υπολογίζεται, με βάση αυτά τα δεδομένα, ότι για έναν βαρύ καπνιστή είναι για διάρκεια 40 ετών, 1,0 mg NNK/kg, που συμφωνεί με τον υπολογισμό της συσσωρευτικής έκθεσης NNK μέσω εισπνοής για τον ίδιο καπνιστή (1,4 mg/kg).
4. Τα υδροξυλιωμένα παράγωγα των NNK και NNN αντιδρούν σε αυξημένα επίπεδα τόσο με το DNA, του πνεύμονα και της τραχείας των καπνιστών όσο και με την αιμοσφαιρίνη του αίματός τους, και αυτό ενισχύει την άποψη ότι το NNK ενεργοποιείται μεταβολικά σε ορισμένους καπνιστές και ότι τα ενεργοποιημένα παράγωγα αντιδρούν με το DNA του πνεύμονα.
5. Τα ενεργοποιημένα K-ras ογκογονίδια με μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 12 έχουν εντοπιστεί σε περίπου 24% των περιπτώσεων αδеноκαρκινώματος που εξετάστηκαν (Hoffmann D. et al, 1994).



1.3. ΒΑΡΕΑ ΜΕΤΑΛΛΑ ΚΑΙ ΦΥΤΑ

1.3.1. ΓΕΝΙΚΑ

Το μεγάλο εύρος ποικιλότητας ειδών του φυτικού βασιλείου δεν επιτρέπει τις γενικεύσεις όσον αφορά τις συγκεντρώσεις και τις δράσεις των βαρέων μετάλλων.

Η ενσωμάτωση των βαρέων μετάλλων στα φυτά επιτυγχάνεται κύρια μέσω της πρόσληψής τους από τις ρίζες, ενώ εναποθέσεις στοιχείων παρατηρούνται και στα φύλλα προερχόμενα, είτε από το έδαφος, είτε από τα εντομοκτόνα.

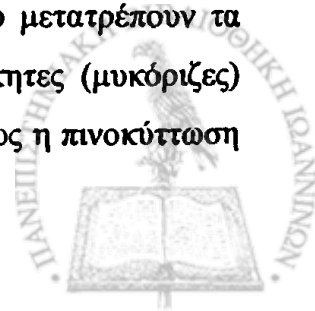
Η πρόσληψή τους από τα φυτά εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως το περιβάλλον ανάπτυξης (π.χ. θερμοκρασία, εδαφικό pH, αερισμός εδάφους, συνθήκες Eh και λίπανσης), τον ανταγωνισμό μεταξύ των φυτών, τον τύπο και το μέγεθος του φυτού, το ριζικό του σύστημα, την διαθεσιμότητα του εδάφους σε κάθε μέταλλο ή τις φυλλικές εναποθέσεις του, τον τύπο των φύλλων, την εδαφική υγρασία και την παροχή ενέργειας στις ρίζες και τα φύλλα (Fergusson JE., 1990).

Κατά την απορρόφηση των βαρέων μετάλλων μέσω του ριζικού συστήματος, τα στοιχεία του εδάφους μπορούν είτε να διαχυθούν στην ριζική επιφάνεια από το εδαφικό διάλυμα με την προϋπόθεση ότι υπάρχει διαφορά συγκέντρωσης, είτε να εμπλακούν σε ανταλλαγή ιόντων μεταξύ, π.χ. της αργίλου και της ρίζας.

Η μετακίνηση του μετάλλου στην ρίζα γίνεται είτε με παθητική διάχυση μέσω της κυτταρικής μεμβράνης που βασίζεται στην διαφορά συγκέντρωσης και το ηλεκτροχημικό δυναμικό, είτε με ενεργητική μεταφορά.

Συνήθως η συγκέντρωση ιόντων είναι μεγαλύτερη στο εσωτερικό απ' ότι στο εξωτερικό της ρίζας, οπότε το ριζικό σύστημα μπορούμε να πούμε ότι δρα ως εκλεκτικό ηλεκτρόδιο ιόντων και απαιτείται ενέργεια προκειμένου να διευκολυνθεί η μετακίνηση του στοιχείου διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης. Η ενέργεια που απαιτείται προέρχεται από τη μεταβολική διαδικασία της αναπνοής, όπου παράγονται τα αναγκαία για την ανταλλαγή πρωτόνια.

Σε άλλη περίπτωση το μέταλλο κινείται προς το ριζικό σύστημα βοηθούμενο από ένα φορέα (π.χ. οργανικό οξύ ή πρωτεΐνη) που το δεσμεύει και το μεταφέρει διασχίζοντας τη μεμβράνη. Οι ρίζες απελευθερώνουν ενώσεις όπως οργανικά οξέα και ιονοφόρα που είναι χηλοποιητικοί παράγοντες και διαλυτοποιητικοί παράγοντες που μετατρέπουν τα μέταλλα σε περισσότερο ευπρόσληπτες μορφές. Οι συμβιωτικοί μύκητες (μυκόριζες) μπορεί να εμπλέκονται στην όλη διαδικασία ενώ άλλοι μηχανισμοί όπως η πινοκύττωση έχουν αναφερθεί.



Μετά την απορρόφησή του, το μέταλλο μεταφέρεται μέσω του ξυλώματος και ανάλογα με το είδος του και την ένωση του σε άλλα τμήματα του φυτού. Βαρέα μέταλλα υπάρχουν και στο φλοιώμα – εξυπηρετώντας την κατανομή των υδατανθράκων στο φυτό, προερχόμενα είτε από πλευρική μεταφορά από το ξύλωμα, είτε από μεταφορά από τα φύλλα την εποχή της φυλλόπτωσης.

Σε κάθε περίπτωση ο **γονότυπος** δηλ., το είδος και η ποικιλία του φυτού προσδιορίζει την ικανότητά του να απορροφά και να συσσωρεύει βαρέα μέταλλα στους ιστούς του, ενώ η βιοσυσσώρευση του κάθε μετάλλου είναι διαφορετική και προσδιορίζεται από ένα προστατευτικό μηχανισμό "αποκλεισμού" που σε πολύ υψηλά εδαφικά επίπεδα υποσκελίζεται προκαλώντας συμπτώματα τοξικότητας.

Οι παράγοντες που επηρεάζουν το πραγματικό επίπεδο συγκέντρωσης των διαφόρων βαρέων μετάλλων στα φυτά είναι: ο γονοτύπος του φυτού, το είδος του φυτικού ιστού, το επίπεδο της συγκέντρωσης του μετάλλου στο έδαφος, η διαθεσιμότητα του μετάλλου από το έδαφος, η απόσταση του φυτού από την πηγή του μετάλλου, η εποχή, οι κλιματικές συνθήκες και η πρόσληψή ή μη μέσω φυλλώματος.

Για το λόγο αυτό, οι συγκεντρώσεις των βαρέων μετάλλων ποικίλουν ευρέως και δεν είναι δυνατό να δοθεί μια ικανοποιητική μέση τιμή. Παρόλα αυτά υπολογίζεται ότι τα μέσα επίπεδα συγκέντρωσης βαρέων μετάλλων σε φυτά που αναπτύσσονται σε μη μολυσμένα ή μη μεταλλοφόρα εδάφη, είναι γενικά $<1\mu\text{g/g}$ (Kabata-Pendias A. et al, 1984, Bowen HJM., 1975).

1.3.2. ΜΕΤΑΛΛΑ ΚΑΙ ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ

Οι γενετικοί παράγοντες σχετίζονται στενά με την πρόσληψη των βαρέων μετάλλων. Λόγω της δυσκολίας σύγκρισης δεδομένων από διαφορετικές μελέτες, προτιμότερο είναι να δίνονται ποιοτικές εκτιμήσεις στην πρόσληψη ενός βαρέως μετάλλου και να συγκρίνονται τα ίδια φυτικά τμήματα.

Τα φυτά κατατάσσονται ανάλογα με την συμπεριφορά τους ως προς τα βαρέα μέταλλα σε φυτά **συσσωρευτές**, φυτά **δείκτες** και φυτά **αποκλειστές**.

Τα φυτά συσσωρευτές έχουν την ιδιότητα να προσλαμβάνουν μεγάλες συγκεντρώσεις ορισμένων μετάλλων χωρίς τοξικές δράσεις, ενώ τα φυτά δείκτες τα προσλαμβάνουν ανάλογα με την συγκέντρωσή τους στο εδαφικό περιβάλλον, συμβάλλοντας στον βιοκαθαρισμό.



Για τα μη απαραίτητα μέταλλα, υπάρχει μια συγκέντρωση κάτω από την οποία δεν παρατηρείται σημαντική επίδραση στην ανάπτυξη του φυτού και μια συγκέντρωση πάνω από την οποία παρατηρούνται συμπτώματα τοξικότητας ορατά είτε στην εξωτερική του μορφολογία είτε σε κύριες βιοχημικές αντιδράσεις.

Έτσι, για το Cd και τον Pb τα επίπεδα τοξικότητας κυμαίνονται αντίστοιχα σε συγκεντρώσεις από 5 έως 30μg/g και από 30 έως 300μg/g στα φύλλα ή σε συγκεντρώσεις εδαφικού διαλύματος από 0,2 έως 9mg/l και από 3 έως 20mg/l (Kloke A. et al, 1984).

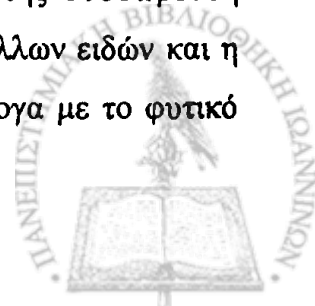
Το Cd θεωρείται πιο τοξικό από τον Pb, λαμβανομένου όμως υπόψη του γονοτύπου και των εδαφικών ιδιοτήτων.

Οι βιοχημικές διαδικασίες που επηρεάζονται τόσο από το Cd όσο και από το Pb συμπεριλαμβάνουν την αλλαγή στην διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης, την πρόσδεση του μετάλλου στις -SH ομάδες και την θειόλη, την συγγένεια με τις φωσφορικές ομάδες, την αναχαίτιση της λειτουργίας ορισμένων ενζύμων και την επίδραση στην αναπνοή, την φωτοσύνθεση και την διαπνοή (Koeppe DE., 1981, Jastow JD. et al ,1980, Peterson PJ. et al,1981).

Επίσης, στα φυτά το Cd ανταγωνίζεται τα Ca, P, K, Zn, Al, Se και Mn με αποτέλεσμα η συνδυαστική τους δράση να είναι μειωμένη σε σχέση με το άθροισμα των χωριστών δράσεών τους, και δρα συνεργιστικά με τα Pb, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn και Mg ενισχύοντας την ατομική τους δράση. Ο Pb ανταγωνίζεται τα Ca, P, S και Zn και δρα συνεργιστικά με το Cd.

Οι Baker et al αναφέρουν ότι παρατηρούνται μεγάλες διαφορές στην «ευαισθησία» του φυτού από είδος σε είδος, με κύριο συμπέρασμα ότι τα δικοτυλήδονα είδη είναι γενικά πιο ανθεκτικά στο Cd από τις μονοκοτυλήδονες πόες (Baker AJM. et al, 1990).

Στον καπνό, οι Clark et al αναφέρουν ότι η πρόσληψή και μεταφορά του Cd στα διάφορα φυτικά τμήματα ελέγχεται γενετικά, οπότε με δεδομένο ότι σε ορισμένες περιπτώσεις γίνεται υπερβολική λίπανση με υπερφωσφορικά που περιέχουν Cd ως ρυπαντή, θα πρέπει να γίνεται προσεκτική επιλογή γονοτύπου που ελαχιστοποιούν την συσσώρευση Cd στα φυτικά τμήματα που χρησιμοποιούνται από τον καπνιστή (Clarke BB. et al, 1983). Σε γενετικά τροποποιημένες ρίζες διαφόρων ειδών με *Agrobacterium rhizogenes* όπου εξετάστηκε η τοξική δράση του Cd και η κινητική της συσσώρευσης τους, βρέθηκε ότι οι ρίζες του καπνού είναι πιο ανθεκτικές από των άλλων ειδών και η συσσώρευση Cd προερχόμενου από αιωρήματα λάσπης ποικίλει ανάλογα με το φυτικό είδος και την πηγή της λάσπης.



Παρόλα αυτά σε σύγκριση με ρίζες που προέρχονται από φυσιολογικά φυτά, δεν βρέθηκε μεγάλη διαφορά στην πρόσληψή Cd σχετιζόμενη με την γενετική τροποποίηση (Metzger L.et al, 1992).

1.3.3. ΜΕΤΑΛΛΑ ΚΑΙ ΦΥΤΙΚΑ ΤΜΗΜΑΤΑ

Οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων παρατηρούνται συχνά στις ρίζες των φυτών, γεγονός λογικό δεδομένου ότι η είσοδος τους πραγματοποιείται από το ριζικό σύστημα. Για 23 φυτικά είδη αναφέρεται ότι η [Cd] ρίζες > [Cd] βλαστό και όταν η πηγή του μετάλλου είναι το έδαφος, ισχύει γενικά ότι τα επίπεδα συγκέντρωσης των βαρέων μετάλλων μειώνονται από τις ρίζες προς τα ανώτερα τμήματα του φυτού με την σειρά: ρίζες > βλαστοί > φύλλα > καρποί > σπόροι (Fergusson JE.,1990).

Για το Cd αναφέρεται ότι βρίσκεται υπό μορφή ιόντων Cd^{2+} χωρίς συσσώρευση ενώσεων του μετάλλου και ότι συγκρατείται στο κυτταρικό τοίχωμα πιθανόν λόγω αλληλεπιδράσεων Cd – S. Όσον αφορά τη μεταφορά του, υπάρχουν διαφορετικές θεωρίες.

Για το Pb αναφέρεται ότι η κίνηση του από τις ρίζες στα υπέργεια τμήματα του φυτού είναι πολύ περιορισμένη και υπάρχουν μαρτυρίες ότι συσσωρεύεται υπό μορφή ενώσεων στα κυτταρικά τοιχώματα.

Οι Elsokkary et al μελετώντας την αναστολή της λειτουργίας της νιτροαναγωγής από το Cd σε συνάρτηση με το pH και την συγκέντρωση P και N στο καλλιεργητικό υπόστρωμα σε δύο φυτικά είδη (σιτάρι και φασόλι), βρήκαν ότι η αναστολή της λειτουργικότητας του ενζύμου είναι μεγαλύτερη στην ρίζα και τον βλαστό ενώ η συγκέντρωση Cd είναι αυξημένη στα υπόλοιπα όργανα. Η αναστολή της νιτροαναγωγής είχε καλύτερη συσχέτιση με την συγκέντρωση Cd στο φυτό παρά με την συγκέντρωση Cd στο έδαφος και ήταν εντονότερη στο σιτάρι απ' ότι στο φασόλι.

Αύξηση του pH, του P και του N στο υπόστρωμα βρέθηκε ότι ενισχύει την λειτουργία του ενζύμου και για τα δύο είδη (Elsokkary IH.et al, 1991).

Στον καπνό η συγκέντρωση Cd ποικίλει στις διάφορες ποικιλίες, ενώ αναφέρεται ότι η συσσώρευση του διαφέρει από τα άλλα φυτά. Οι MacLean et al αναφέρουν ότι η συγκέντρωση στα φύλλα είναι 20-110% υψηλότερη από τις ρίζες (MacLean AJ.et al, 1976).

Σε παλιότερη μελέτη βρέθηκε ότι το φύλλωμα του καπνού έχει μια ασυνήθιστα υψηλή απορροφητική ικανότητα σε σχέση με άλλα είδη. Έτσι, το φύλλωμα του καπνού



απορροφά 7 φορές περισσότερο Cd και η ρίζα 1/2 Cd συγκριτικά με την τομάτα. Έχοντας απομονώσει μια μέταλλο (Cd)δεσμευτική πρωτεΐνη στην ρίζα της τομάτας, οι Clarke BB.et al συμπεραίνουν ότι ο καπνός δεν περιέχει πρωτεΐνη ίσης αποτελεσματικότητας για την σταθεροποίηση του Cd στην ρίζα του (Clarke BB.et al, 1981).

Οι Reese et al αναφέρουν ότι το Cd προκαλεί τον σχηματισμό διαλυτών πεπτιδίων που είναι ικανά να δεσμεύουν αυτό το μέταλλο και συντίθενται από Glu/Gln, Cys και Gly. Στο καπνό τα Cd-πεπτίδια βρέθηκε ότι περιέχουν γλουταμινικό οξύ/γλουταμίνη, κυστεΐνη και γλυκίνη ενώ τα αμινοξέα σερίνη, λυσίνη και αρωματικά απουσιάζουν. Οι ίδιοι αναφέρουν ότι δεν υπάρχει μαρτυρία για την επαγωγή *in vivo* ή δέσμευση *in vitro* Zn σε αυτό το Cd-δεσμευτικό πεπτίδιο στον καπνό, ενώ ο Cu επάγει ένα μεταλλοδεσμευτικό πεπτίδιο μη ταυτόσημο με το Cd-πεπτίδιο. Αυτό υποδηλώνει ότι τα φυτά έχουν μια εξειδίκευση στην ανθεκτικότητα στα βαρέα μέταλλα (Reese RN. et al, 1987).

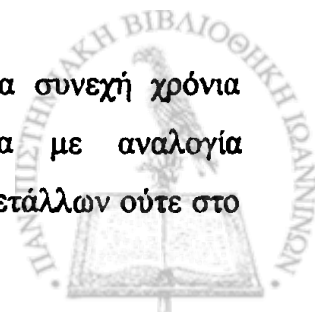
Η συγκέντρωση βαρέων μετάλλων αναφέρεται ότι σχετίζεται και με την ηλικία των φύλλων. Σε πειράματα που καλλιεργήθηκε καπνός σε εδάφη προερχόμενα από αγρό που δεχόταν λάσπη αερόβιας χώνευσης σε διάφορες συγκεντρώσεις για τρία χρόνια βρέθηκε ότι η συγκέντρωση του Cd, του Ni και του Zn μειώνεται ενώ η συγκέντρωση του Cu αυξάνεται από τα χαμηλότερα (γηραιότερα) στα υψηλότερα (νεώτερα) φύλλα (King LD. et al, 1990).

1.3.4 ΜΕΤΑΛΛΑ ΣΤΟ ΕΔΑΦΟΣ ΚΑΙ ΣΤΑ ΦΥΤΑ

Η επίδραση της συγκέντρωσης βαρέων μετάλλων του εδάφους στην συγκέντρωση τους στα φυτά είναι προφανής και, για όλα τα βαρέα μέταλλα αύξηση της συγκέντρωσης στο έδαφος προκαλεί ανάλογη αύξηση στα φυτά. Η σχέση αυτή έχει αναφερθεί για πολλά φυτικά είδη και διαφορετικά τμήματα φυτών, τόσο για το Cd όσο και για τον Pb.

Παρόλα αυτά, σε ορισμένες περιπτώσεις αύξηση της εδαφικής συγκέντρωσης ορισμένων βαρέων μετάλλων πάνω από ένα επίπεδο, οδηγεί σε σταθεροποίηση ή μείωση του προσλαμβανόμενου μετάλλου, πιθανόν γιατί υπάρχει όριο στο ποσό του μετάλλου που το φυτό μπορεί να απορροφήσει ή/και γιατί η τοξικότητα που προκαλεί μπορεί να οδηγήσει στην αλλοίωση του φυτού (Fergusson JE.,1990).

Σε πειράματα όπου χειμερινά σιτηρά καλλιεργήθηκαν για τρία συνεχή χρόνια χρησιμοποιώντας λάσπη «χαμηλής» συγκέντρωσης σε μέταλλα με αναλογία ~4,5t/ha/έτος, δεν παρατηρήθηκε αύξηση στην συγκέντρωση βαρέων μετάλλων ούτε στο



καλλιεργούμενο έδαφος ούτε στα φυτά. Στην ίδια μελέτη αναφέρεται ότι δεν επηρεάστηκαν πολύ ούτε παράμετροι όπως η παραγωγικότητα, οπότε οι ερευνητές προτείνουν την χρήση λάσπης «χαμηλής» συγκέντρωσης μετάλλων για γεωργικούς σκοπούς (Petruzzelli G. et al, 1991).

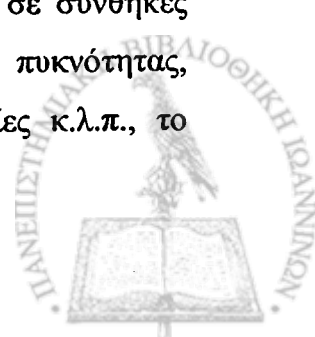
Παρόλα αυτά, οι Walter et al αναφέρουν ότι σε πειράματα σε φυτά σπανακιού, σιταριού και κτηνοτροφικού χόρτου που χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα έδαφος αναμειγμένο με λάσπη τεχνητά εμπλουτισμένη σε Cd και Ni, βρέθηκε ότι η συγκέντρωση των φυτών σε βαρέα μέταλλα εξαρτάται από την συγκέντρωση του εδάφους στα ίδια μέταλλα όπως επίσης και από τα χαρακτηριστικά του εδάφους και το είδος του φυτού (Walter I. et al, 1990).

Σε παλιότερες εργασίες αναφερόταν ότι η αύξηση της αναλογίας λάσπης στο χώμα είχε ως αποτέλεσμα την σχεδόν γραμμική αύξηση στην συγκέντρωση του Cd στους φυτικούς ιστούς. Παρόλα αυτά οι Logan et al αργότερα υποστήριξαν ότι η σχέση δεν είναι γραμμική όπως αρχικά είχε θεωρηθεί και ότι η συγκέντρωση του Cd τείνει να σταθεροποιηθεί σε «πλατό» με την αύξηση στην αναλογία λάσπης και άρα της εδαφικής συγκέντρωσης Cd (Logan TJ. et al, 1987).

Στον καπνό αναφέρεται ότι η αύξηση της αναλογίας λάσπης από 0 έως 27 Mg/ha/χρ. δεν επηρεάζει την συγκέντρωση του Pb και του Cr, ενώ η συσσωρευτική συγκέντρωση στα φύλλα μετά από χρήση λάσπης για τρία χρόνια στην ανώτατη αναλογία ήταν για τα Cd, Cu, Cr, Ni, Pb και Zn αντίστοιχα 1,8kg ha^{-1} , 39kg ha^{-1} , 48kg ha^{-1} , 9kg ha^{-1} , 30kg ha^{-1} και 84kg ha^{-1} (King LD. et al, 1990).

Στην ίδια εργασία αναφέρεται ότι το εδαφικό pH δεν επηρέασε την συγκέντρωση Pb και Cr στον καπνό, ενώ η συγκέντρωση των Cd, Ni και Zn μειώθηκε με την αύξηση του εδαφικού pH από 5,8 σε 6,0.

Σε άλλα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν τόσο στο πεδίο όσα και σε δοχεία βρέθηκε ότι η χρήση της λάσπης βιολογικού καθαρισμού που έχει υποστεί αναερόβια χώνευση, έχει ίση λιπασματική αξία με τα χημικά λιπάσματα και ότι τα αυξημένα επίπεδα βαρέων μετάλλων (Cd, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb και Zn) στην λάσπη δεν δημιούργησαν συμπτώματα φυτοτοξικότητας στα φυτά. Οι ίδιοι αναφέρουν ότι θετική συσχέτιση μεταξύ αναλογίας λάσπης και παραγωγής παρατηρείται μόνο σε συνθήκες πεδίου ενώ στα δοχεία όπου επικρατούν άλλες συνθήκες εδαφικής πυκνότητας, πλασμόλυσης, βιοσύνθεσης αμμωνίας, περιεκτικότητας σε τοξικές ουσίες κ.λ.π., το αποτέλεσμα αντιστρέφεται (Siriratpiriya O., 1990).



1.3.5. ΜΕΤΑΛΛΑ ΚΑΙ ΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΟΥΣ

Κρισιμότερος παράγοντας στην πρόσληψη βαρέων μετάλλων από τα φυτά είναι η διαθεσιμότητα του εδάφους, παράγοντας που προσδιορίζεται κυρίως από τις διάφορες εδαφικές ιδιότητες. Η διαθεσιμότητα του εδάφους ελέγχει την πραγματική συσσώρευση βαρέων μετάλλων στους φυτικούς ιστούς σε μεγαλύτερο βαθμό από τα συνολικά επίπεδα συγκέντρωσης τους στο έδαφος και επηρεάζεται κυρίως από το εδαφικό pH και Eh (οξειδωτική κατάσταση). Άλλες σημαντικές εδαφικές ιδιότητες που αναφέρονται, ότι επηρεάζουν την πρόσληψη βαρέων μετάλλων από τα φυτά είναι η περιεχόμενη άργιλος, η συγκέντρωση οξειδίων Fe/Mn και οργανικής ουσίας, η κατιοανταλλακτική ικανότητα (CEC : cation exchange capacity), η θερμοκρασία και η υδατική κατάσταση του εδάφους, η συγκέντρωση άλλων βαρέων μετάλλων και ο προστιθέμενος φωσφόρος (Παπαδόπουλος ΓΔ., 1996) (πίνακας 1.4).

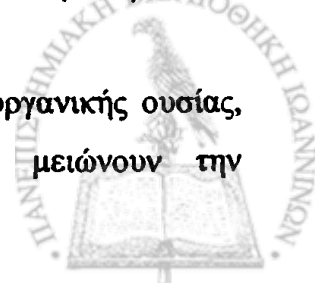
ΠΙΝΑΚΑΣ 1.4: Επίδραση της μεταβολής των εδαφικών παραγόντων στην διαθεσιμότητα των στοιχείων (Fergusson JE., 1990).

ΕΔΑΦΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ	ΜΕΤΑΒΟΛΗ	ΔΡΑΣΗ ΣΤΗΝ ΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑ ΣΤΟΙΧΕΙΟΥ
pH	↑	↓
Eh	↑	↑
Περιεχόμενη άργιλος	↑	↓
Οξείδια Fe/Mn	↑	↓
Οργανική ουσία	↑	↓
Κατιοανταλλακτική ικανότητα (CEC)	↑	↓
Θερμοκρασία	↑	↑
Υδατικό stress	↑	↓
Άλλα μέταλλα	↑	↓
Προστιθέμενος P	↑	↓

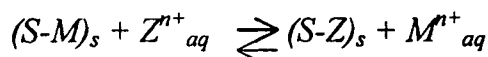
Οι σχέσεις αυτές ισχύουν για τα περισσότερα βαρέα μέταλλα με την εξαίρεση του Pb του οποίου η πρόσληψη μειώνεται με την αύξηση των οξειδωτικών χαρακτηριστικών του περιβάλλοντος, σε συνθήκες π.χ. ξηρασίας, πιθανόν εξαιτίας της μειωμένης διαλυτότητας των αλάτων Pb^{2+} (π.χ. $PbSO_4$).

Αντίθετα, η πρόσληψη του Cd μειώνεται σημαντικά σε υγρές αναγωγικές συνθήκες και αυξάνεται σε ξηρές οξειδωτικές συνθήκες. Η διαφορά συμπεριφοράς των δύο μετάλλων οφείλεται πιθανόν στην χαμηλότερη διαλυτότητα των αλάτων μολύβδου σε σύγκριση με τα άλατα Cd (Fergusson JE., 1990).

Η αύξηση της συγκέντρωσης της περιεχόμενης αργίλλου, της οργανικής ουσίας, των οξειδίων Fe/Mn και της κατιοανταλλακτικής ικανότητας μειώνουν την



διαθεσιμότητα των βαρέων μετάλλων λόγω της αύξησης των θέσεων σύνδεσής τους στο έδαφος, ενώ η αυξημένη παρουσία άλλων μετάλλων που ανταγωνίζονται τις ίδιες δεσμευτικές θέσεις προκαλεί ελευθέρωση των βαρέων μετάλλων και αύξηση της πρόσληψής τους από το φυτό, ανάλογα με το χημικό ισοζύγιο της παρακάτω αντίδρασης:



όπου S: δεσμευτικές θέσεις εδαφικού υποστρώματος

M: βαρύ μέταλλο

Z: ανταγωνιζόμενο μέταλλο, με σταθερά ισορροπίας, K :

$$K: \frac{[M^{n+}_{aq}]}{[Z^{n+}_{aq}]}$$

Οι Mulchi και συνεργάτες αναφέρουν ότι τα επίπεδα των διαθέσιμων στα φυτά μετάλλων του εδάφους καθορίζονται από την διαλυτότητα τους. Η διαλυτότητα καθορίζεται από πολλούς παράγοντες από τους οποίους η εδαφική οξύτητα είναι ίσως η σημαντικότερη.

Τα κατιόντα δεσμεύονται ασθενέστερα σε χαμηλό pH απ' ότι σε υψηλό pH με αποτέλεσμα, με την εξαίρεση του Pb και του Cu, η διαλυτότητα τους στο έδαφος και άρα η διαθεσιμότητα τους στο φυτό να αυξάνεται (Mulchi CL. et al,1991).

1.3.6. ΜΕΤΑΛΛΑ ΚΑΙ ΙΛΥΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΥ

α. ΑΡΧΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΤΩΝ ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΕΩΝ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΑΣΤΙΚΩΝ ΛΥΜΑΤΩΝ (Ε.Ε.Α.Λ)

Με τον όρο ιλύ ονομάζουμε «το στερεό προϊόν που προέρχεται από σταθμούς βιολογικού καθαρισμού οικιακών, αστικών ή παρόμοιας σύνθεσης λυμάτων, από σηπτικούς βόθρους και από οποιουδήποτε σταθμούς καθαρισμού» (ΚΥΑ 80568/4225).

Τα λύματα που εισέρχονται στις Ε.Ε.Α.Λ, αρχικά υφίστανται εσχαρισμό και πρωτοβάθμια καθίζηση. Η ιλύς της πρωτοβάθμιας καθίζησης μπορεί να υποστεί αναερόβια χώνευση οπότε παράγεται βιοαέριο ή να οδηγηθεί κατευθείαν σε ανοιχτές δεξαμενές συνεχούς αερισμού για αερόβια διάσπαση οργανικού φορτίου (δεξαμενές αερισμού).

Ακολουθεί δευτεροβάθμια καθίζηση όπου τα μεν υγρά λύματα επιστρέφουν στους αποδέκτες ενώ η παραγόμενη ιλύς αφυδατώνεται και είτε απορρίπτεται είτε χρησιμοποιείται σε γεωργικές ή άλλες εφαρμογές.



Όταν ακολουθεί απομάκρυνση N και P (βιολογική ή χημική) η επεξεργασία ονομάζεται τριτοβάθμια (Τσατήρης Β. και συν., 1994).

“Η ύλος που έχει υποστεί βιολογική, χημική ή θερμική επεξεργασία με μακροχρόνια αποθήκευση ή με οποιαδήποτε άλλη κατάλληλη επεξεργασία ώστε να μειωθεί σημαντικά η ικανότητα προς ζύμωση και να μειωθεί ο κίνδυνος που προκαλεί για την υγεία η διασπορά της επί του εδάφους ή η χρησιμοποίησή της πάνω και μέσα στο έδαφος, ονομάζεται επεξεργασμένη ύλος” (ΚΥΑ 80568/4225).

Στις χώρες της Ε.Ε (Ευρωπαϊκή Ένωση) παράγονται ετησίως 6.000.000 ton ξηράς ουσίας ύλος και τα επόμενα χρόνια αναμένεται αύξηση της τάξης του 70%.

Η μελέτη των περιβαλλοντικών επιπτώσεων αποτελεί αντικείμενο έρευνας γιατί αφ’ ενός η χρήση της ύλος στην γεωργία είναι μια εύκολη και φθηνή λύση στο πρόβλημα διάθεσής της, αφ’ ετέρου η λιπασματική της αξία φαίνεται σημαντική.

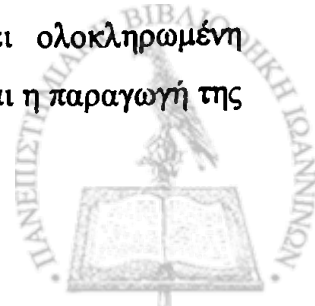
Όμως η συχνή και παρατεταμένη χρήση της ύλος στο ίδιο έδαφος μπορεί να δημιουργήσει σημαντικά περιβαλλοντικά προβλήματα, κυρίως με τις εναποθέσεις βαρέων μετάλλων (Davis RD., 1984) που μπορεί να έχουν σοβαρές επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπου (Fergusson JE., 1990).

Οι επιτρεπόμενες οριακές τιμές συγκεντρώσεων βαρέων μετάλλων καθορίζονται με την οδηγία 278/86 της Ε.Ε και είναι (πίνακας 1.5):

ΠΙΝΑΚΑΣ 1.5: Επιτρεπόμενες οριακές τιμές συγκέντρωσης βαρέων μετάλλων στην γεωργία (Τσατήρης Β. και συν., 1994).

<i>Οριακές τιμές συγκέντρωσης βαρέων μετάλλων στο έδαφος (mg/g ξηράς ουσίας εδάφους με pH 6-7)</i>		<i>Οριακές τιμές συγκέντρωσης βαρέων μετάλλων στην ύλ για γεωρ. σκοπούς</i>	<i>Οριακές τιμές συγκέντρωσης βαρέων μετάλλων που μπορούν να εισάγονται κατά έτος στα καλ. εδάφη για 10 έτη</i>
Cd	1-3	20-40	0,15
Cu	50-140	1000-1750	12
Pb	50-300	750-1200	15
Zn	150-300	2500-4000	30
Cr	-	-	-

Στα Ιωάννινα η Ε.Ε.Α.Λ λειτουργεί από το 1992 και δέχεται 5.000 m³/ημέρα λύματα και βοθρολύματα σε αναλογία 2,5:1 αντίστοιχα. Διαθέτει ολοκληρωμένη πρωτοβάθμια επεξεργασία, αναερόβια χώνευση, δεξαμενές αερισμού και η παραγωγή της ύλος γίνεται με μηχανική αφυδάτωση.



Σε μετρήσεις λιπασματικών και περιβαλλοντικών παραμέτρων σε δείγματα ιλύος της Ε.Ε.Α.Λ Ιωαννίνων (Τσατήρης Β. και συν., 1994) από 26/07/1993 έως 04/02/1994 βρέθηκαν τα εξής αποτελέσματα (πίνακας 1.6):

ΠΙΝΑΚΑΣ 1.6: Συγκεντρώσεις στοιχείων σε δείγματα ιλύος της Ε.Ε.Α.Λ Ιωαννίνων (Τσατήρης Β. και συν., 1994).

<i>N%</i>	<i>P%</i>	<i>K%</i>	<i>Na%</i>	<i>Cd(ppm)</i>	<i>Cu(ppm)</i>	<i>Zn (ppm)</i>
3,1± 0,3	2 ± 0,5	0,1 ± 0,03	0,05 ± 0,03	3,8 ± 0,6	283± 40,87	2122±261,6

Η λιπασματική αξία της ιλύος κρίθηκε ικανοποιητική.

Οι περιεκτικότητες σε βαρέα μέταλλα βρέθηκε ότι δεν ξεπερνούν τα αποδεκτά όρια, παρόλο που η συγκέντρωση Cd φαίνεται να είναι υψηλή σε σχέση με δείγματα που προέρχονται από άλλες Ε.Ε.Α.Λ της χώρας.

Ταυτόχρονα έγινε επιλεκτική δειγματοληψία (0-20cm) και μετρήσεις σε αγρό με καλλιέργεια καλαμποκιού ακριβώς έξω από την Ε.Ε.Α.Λ Ιωαννίνων που ποτίζεται συνεχώς με το νερό της εξόδου της εγκατάστασης (pH±7,7) για άγνωστο χρονικό διάστημα, και υπήρχαν υπόνοιες ρύπανσης.

Τα αποτελέσματα αναλύσεων του εδάφους ήταν:

Άμμος (%)	:	17,9
Ιλύς (%)	:	31,9
Αργίλλος (%)	:	50,3
Μηχανική Σύσταση	:	C
pH	:	8,0
Ηλεκτρ.Αγωγιμότητα (μS/cm)	:	1924
Ελεύθερο CaCO ₃ (%)	:	20,2
Οργανική Ουσία (%)	:	3,60
Ολικό N(%)	:	0,32
P (mg/kg εδάφους)	:	69,6
Ανταλ.Κ (meq/100gr)	:	0,71
Ανταλ.Να (meq/100gr)	:	0,85
Χαλκός (ppm)	:	61
Ψευδάργυρος (ppm)	:	71
Σίδηρος (ppm)	:	310
Κάδμιο (ppm)	:	1,4

Τα αποτελέσματα αναλύσεων του εδάφους αυτού έδειξαν ότι η συγκέντρωση Cu βρίσκεται ελαφρά άνω του ορίου, η συγκέντρωση Zn κυμαίνεται σε φυσιολογικά επίπεδα, ενώ η συγκέντρωση του Cd εμφανίζεται να υπερβαίνει τα όρια κατά 1,4 ppm.

Παρόλο που η έκταση που εξετάστηκε ήταν μικρή και η δειγματοληψία σποραδική, κρίθηκε ότι ο κίνδυνος ρύπανσης με βαρέα μέταλλα με την χρήση ιλύος είναι επαρκής.

Για το λόγο αυτό απαιτείται περαιτέρω έρευνα των περιβαλλοντικών επιπτώσεων της γεωργικής χρήσης της παραπάνω ύλης .

β. ΠΡΟΣΛΗΨΗ ΜΕΤΑΛΛΩΝ

Ανάλογα με τα χαρακτηριστικά της λάσπης, το pH του εδάφους όπου έχουν προηγηθεί εναποθέσεις λάσπης, μπορεί να αυξάνεται, να μειώνεται ή να παραμένει σταθερό. Για παράδειγμα χωρίς πρόσθεση ασβέστου, κατά την διάσπαση της οργανικής ουσίας ελευθερώνονται ιόντα υδρογόνου που, μαζί με το μεταβολισμό του αμμωνίου μπορεί να προκαλέσουν μείωση στο εδαφικό pH.

Η μακροχρόνια χρήση λάσπης βρέθηκε ότι προκαλεί αύξηση της ολικής και προσλήψιμης εδαφικής συγκέντρωσης των Zn, Cu, Pb και Cd, ενώ ανάλογα με την πηγή της λάσπης και το τελικό εδαφικό pH κάθε επέμβασης, οι συγκεντρώσεις των μετάλλων στα φύλλα καπνού που καλλιεργήθηκαν στα εδάφη αυτά βρέθηκαν αυξημένες, μειωμένες ή σταθερές (Mulchi CL. et al, 1991).

Οι Wallace et al παλιότερα ανέφεραν ότι το Ca παίζει έναν πολύ σημαντικό ρόλο στην θρέψη των φυτών ρυθμίζοντας την πρόσληψή και δράση των βαρέων μετάλλων ενώ η ανάγκη για Ca σε κάποιο βαθμό, μετριάζεται από την παρουσία χηλοποιητικών παραγόντων στο υπόστρωμα της ρίζας. Για τον καπνό αναφέρει ότι αποδείχθηκε ότι μειώνει τις συγκεντρώσεις των περισσότερων μικροστοιχείων (Wallace A. et al., 1971).

Ο Mulchi et al αναφέρουν επίσης ότι αύξηση της αναλογίας λάσπης προκαλεί σημαντική αύξηση στην συγκέντρωση Cu στο φυτό, ενώ οι συγκεντρώσεις των Pb και Fe είναι γενικά σταθερές (Mulchi CL. et al, 1991).

Σε άλλη εργασία αναφέρεται ότι μία δεκαετία μετά την χρήση λάσπης συνεχίζεται η ελευθέρωση N που υποδηλώνει ότι το ισοζύγιο λάσπης – εδάφους δεν έχει επιτευχθεί (Bell PF. et al, 1988).

Η εφαρμογή λάσπης βιολογικού καθαρισμού μεγάλων συγκεντρώσεων σε βαρέα μέταλλα, μπορεί να οδηγήσει στη μόλυνση των βαθύτερων εδαφικών στρωμάτων, με κύρια την συσσώρευση Cd.

Διάφορες τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τον διαχωρισμό και απόσπαση (extraction) διαφόρων βαρέων μετάλλων από δείγματα εδάφους/λάσπης, μπορούν να προβλέψουν τον τρόπο που τα μέταλλα αυτά είναι δεσμευμένα στο έδαφος και κατά συνέπεια την κινητικότητα τους. Στα πειράματα των Legret και συνεργατών βρέθηκε ότι η αποσπασιμότητα (extractability) των μετάλλων ήταν:



$Cd > Ni > Pb > Cr$ (Legret M. et al, 1987)

Οι Petruzzeli και συνεργάτες αναφέρουν ότι σχεδόν ίσες ποσότητες βαρέων μετάλλων ανιχνεύθηκαν ως κινούμενα στοιχεία σε χώμα που λιπάνθηκε τόσο με λάσπη βιολογικού καθαρισμού, όσο και με κοπριά ή με ανόργανα λιπάσματα ενώ παρατηρήθηκαν εποχιακές διακυμάνσεις στην κινητικότητα των βαρέων μετάλλων μέσα στο χρόνο.

Έτσι, κατά τις θερινές και ξηρές περιόδους του χρόνου παρατηρήθηκε αύξηση στην συγκέντρωση κυρίως των Cu και Zn στο ανώτερο επιφανειακό στρώμα και μείωση στο βαθύτερο επίπεδο του εδάφους (Petruzzelli G. et al, 1991).

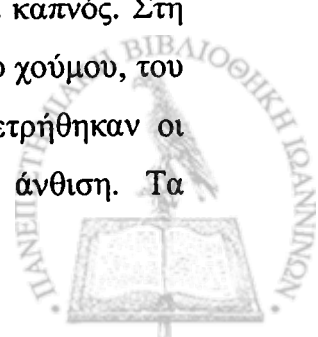
Σε πειράματα όπου μελετήθηκε η επίδραση της ετήσιας λίπανσης με λάσπη βιολογικού καθαρισμού για μεγάλο χρονικό διάστημα (17 διαδοχικά έτη) στην συγκέντρωση βαρέων μετάλλων (Cu, Cd, Pb, Ni και Cr) σε σπόρους και άγωνα φυτικά υπολείμματα φυτών καλαμποκιού που καλλιεργήθηκαν στο έδαφος αυτό, δεν παρατηρήθηκε αυξημένη συσσώρευση.

Αντιθέτως, παρατηρήθηκε αύξηση στην συγκέντρωση Zn (έως 60 mg/kg) για τα πρώτα 6-10 χρόνια, ενώ μετά τον δέκατο χρόνο, η συγκέντρωση Zn παρέμεινε σταθερή (Dowdy RH. et al, 1991).

Σε παλιότερη εργασία αναφέρεται ότι η οργανική ουσία μειώνει τις συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων όπως το Cd σε φυτά που καλλιεργούνται σε εδάφη όπως τα παραπάνω και ότι η προσθήκη P σε όξινα εδάφη όπου δεν έχει προηγηθεί ασβέστωση, παρεμποδίζει την πρόσληψη μετάλλων όπως το Cd, πιθανόν γιατί σχηματίζει μη διαλυτά άλατα Cd στα εδάφη (Takiyuma Y. et al, 1973).

Επίσης αναφέρεται ότι προσθήκη Cd στο έδαφος αυξάνει την συγκέντρωση Zn στα φυτά, ενώ δεν ισχύει το αντίστροφο. Η ασβέστωση (liming) και η προσθήκη P μειώνει την συγκέντρωση Zn και ο οργανικός C την αυξάνει. Για την εξήγηση της δράσης του Cd στην αυξημένη πρόσληψη Zn από τα φυτά, αναφέρεται ότι μπορεί να οφείλεται σε πιθανή βλάβη του ριζικού συστήματος παρουσία Cd (MacLean AJ. et al, 1976).

Σε άλλη εργασία αξιολογήθηκε η σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης Cd, Cu και Zn με τις εδαφικές της ιδιότητες περιοχών όπου είχε προηγηθεί μακροχρόνια εφαρμογή λάσπης βιολογικού καθαρισμού, και καλλιεργήθηκαν διαδοχικά τεύτλα και καπνός. Στη μελέτη έγιναν μετρήσεις του προσλήψιμου Cd, Cu και Zn, της αργίλλου, του χούμου, του οργανικού C και του pH σε μίγμα εδάφους με βάθος 20cm. Επίσης μετρήθηκαν οι συγκεντρώσεις των Cd, Cu και Zn στον καπνό αμέσως μετά την άνθιση. Τα



αποτελέσματα έδειξαν μικρή γραμμική συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης μετάλλου στο φυτό και του εξαγωγίμου εδαφικού μετάλλου (Miner GS. et al, 1997).

Οι Bruwaene και συνεργάτες αναφέρουν ότι μόνο το κινητό μέρος του Cd είναι διαθέσιμο στα φυτά και ότι τα διαλυτά ανόργανα άλατα είναι πολύ γρηγορότερα διαθέσιμα στις ρίζες απ' ότι το Cd που προέρχεται από οργανική ουσία (π.χ. λάσπη), ενώ υπόψιν πρέπει να ληφθεί και η παρουσία άγριας μικροχλωρίδας στο φυσικό περιβάλλον. Η οργανική ουσία δεσμεύει το Cd στα εδάφη μέσω μηχανισμών χηλοποίησης και απορρόφησης. Η ικανότητα της οργανικής ουσίας να ακινητοποιεί το Cd οφείλεται κυρίως στην κατιοανταλλακτική ικανότητα (CEC) του εδάφους. Οι ίδιοι αναφέρουν ότι αυξημένη συγκέντρωση Zn στο έδαφος μπορεί να μειώσει την πρόσληψη Cd από τα φυτά, παρόλο που σε υψηλότερες συγκεντρώσεις Cd, ο Zn είτε δεν επηρεάζει είτε προκαλεί αύξηση στην πρόσληψη Cd. Επίσης αναφέρουν ότι ο Cu στο έδαφος μειώνει τις συγκεντρώσεις Cd (Bruwaene RV. et al, 1984).

Σε άλλα πειράματα μελετήθηκε η αλληλεπίδραση μεταξύ της λάσπης και της ανόργανης λίπανσης στην πρόσληψη βαρέων μετάλλων από τα φυτά. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι συνδυασμοί έδαφος + λάσπη + NPK λίπανση, έδαφος + λάσπη + NK λίπανση και έδαφος + λάσπη + NP λίπανση προκάλεσαν αυξημένη πρόσληψη πολλών βαρέων μετάλλων σε σχέση με το μάρτυρα (έδαφος + λάσπη), εκτός του Fe και του Mn. Οι συγκεντρώσεις των Cd, Co και Ni δεν ήταν ανιχνεύσιμες (Salem N. et al, 1990).

Οι Gigliotti και συνεργάτες πραγματοποίησαν εργασία προκειμένου να πιστοποιήσουν την αλλαγή ορισμένων λιπασματικών παραμέτρων σε εδάφη που εφαρμόστηκε λάσπη βιολογικού καθαρισμού και την τύχη των βαρέων μετάλλων σε φυτά καπνού που καλλιεργήθηκαν σε αυτά τα εδάφη. Η εφαρμογή της λάσπης, σε σχέση με το οξεικό αμμώνιο (ammonium acetate) + EDTA με διαλυτά βαρέα μέταλλα, βρέθηκε ότι προκαλεί σημαντική αύξηση στα Zn και Mn των εδαφών ενώ τα Cd, Cr, Ni, Pb και Cu δεν παρουσίασαν μεταβολή.

Στα φυτά καπνού που καλλιεργήθηκαν σε εδάφη με εφαρμογή λάσπης, παρουσιάστηκε αύξηση των Cr, Cu και Zn στα φύλλα σε σχέση με τα φυτά που καλλιεργήθηκαν στα υπόλοιπα εδάφη (Gigliotti G. et al, 1993).

Όσον αφορά την σχέση των βαρέων μετάλλων με τα απαραίτητα ιχνοστοιχεία, οι Wen et al αναφέρουν ότι στον καπνό δεν παρατηρείται συνεργιστική δράση μεταξύ των Cu, Zn και Cd ως προς την απορρόφηση και το ισοζύγιο. Στην εργασία τους αναφέρουν ότι εντόπισαν μια εμφανώς ανταγωνιστική δράση μεταξύ των Cu, Zn και Cd που παρεμπόδιζε την απορρόφηση των στοιχείων από τα φυτά (Wen TC., 1983).

1.4. ΑΕΡΙΟ ΠΡΟΪΟΝ ΚΑΠΝΟΥ ΚΑΙ ΒΑΡΕΑ ΜΕΤΑΛΛΑ

1.4.1. ΓΕΝΙΚΑ

Η παρουσία βαρέων μετάλλων, τοξικών και απαραίτητων, στο αέριο προϊόν του καπνού έχει πιθανώς επιπτώσεις στις διάφορες βιοχημικές διαδικασίες που πραγματοποιούνται στον ανθρώπινο οργανισμό, κυρίως γιατί με το κάπνισμα τα εισπνεόμενα μέταλλα, λόγω του μεγάλου χρόνου ημισείας ζωής τους, παραμένουν στον οργανισμό προκαλώντας χρόνιες παθήσεις και πιθανόν καρκινογένεση.

Στα τσιγάρα, η συγκέντρωση των διαφόρων μετάλλων ποικίλει από μάρκα σε μάρκα ενώ πηγή τόσο των επιβλαβών, όσο και των απαραίτητων στοιχείων εκτός από τον εισπνεόμενο καπνό, είναι τόσο το φίλτρο όσο και το χαρτί περιτυλίγματος (Chiba M. et al, 1992).

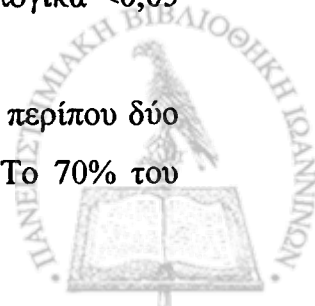
Οι Müller και συνεργάτες ανέλυσαν 15 εμπορικές μάρκες τσιγάρων για διαφορετικά βαρέα μέταλλα και βρήκαν ότι οι μέσες συγκεντρώσεις των Cd, Zn, Pb, Cu, Cr, Fe και Mn ήταν 1,46μg/g, 45μg/g, 3,3μg/g, 21,7μg/g, 4,9μg/g, 428μg/g και 133μg/g αντίστοιχα. Οι ίδιοι βρήκαν ότι παρατηρούνται θετικές συσχετίσεις μεγάλης σημαντικότητας μεταξύ των Fe και Cr, Zn και Cd και πιθανόν Mn και Cr (Müller VG., 1975).

Τα στοιχεία περνούν από τον καπνό στο αέριο προϊόν του και στην πίσσα. Τα φίλτρα των τσιγάρων καταφέρνουν να συγκρατήσουν μόνο μέρος της ολικής συγκέντρωσης των στοιχείων. Το παράπλευρο ρεύμα καπνού περιλαμβάνει μεγάλες συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων και καθώς το μέγεθος των σωματιδίων είναι μικρότερο στο παράπλευρο απ' ότι στο κύριο ρεύμα καπνού, η απόθεση τους στον πνευμονικό ιστό των παθητικών καπνιστών φθάνει σε βαθύτερα στρώματα των κυψελιδικών χώρων (Chiba M. et al, 1992).

1.4.2. ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΒΑΡΕΩΝ ΜΕΤΑΛΛΩΝ ΣΤΟΥΣ ΚΑΠΝΙΣΤΕΣ

Οι συγκεντρώσεις Cd στα τσιγάρα κυμαίνονται από 0,5 έως 3,5 μg/g, δηλαδή σε πολύ υψηλά επίπεδα σε σχέση με το Cd που περιέχουν οι τροφές, φυσιολογικά <0,05 μg/g (Mussalo-Rauhamaa H. et al, Schenker D., 1984).

Καπνίζοντας 40 τσιγάρα ημερησίως ο καπνιστής, επιβαρύνεται σε Cd περίπου δύο φορές περισσότερο απ' ότι το Cd που προσλαμβάνει μέσω των τροφών. Το 70% του



περιεχόμενου Cd των τσιγάρων περνά στον καπνό, από το οποίο το μεγαλύτερο ποσοστό καταλήγει στο παράπλευρο ρεύμα καπνού (Nandi M.et al, 1969).

Τα επίπεδα Cd στο αίμα, τα ούρα και τα όργανα των καπνιστών είναι αυξημένα παρόλο που δεν απορροφάται όλο το εισπνεόμενο Cd. Οι Reddy et al υπολόγισαν από ανάλυση δείγματος κοπράνων 24ώρου ότι η ημερήσια πρόσληψη Cd αυξάνει κατά 1μg στους καπνιστές απ' ότι στους μη καπνιστές (Reddy CS. et al, 1985).

Στο αίμα, η συγκέντρωση Cd αυξάνεται με το κάπνισμα οπότε πιθανές συσχετίσεις μεταξύ του καπνίσματος, του Cd των ιστών και της υπέρτασης και των καρδιαγγειακών παθήσεων, έχουν γίνει. Τα επίπεδα απέκκρισης Cd στα ούρα δεν φαίνεται να αυξάνονται με το κάπνισμα (2,47ng/g σε καπνιστές και μη καπνιστές) (Angerer P.et al, 1988), ενώ στο λιπώδη ιστό, οι μέσες συγκεντρώσεις Cd βρέθηκαν τέσσερις φορές υψηλότερες στους καπνιστές (10ng/g) από ότι στους μη καπνιστές (2,5ng/g) (Nadkarni RA. et al, 1970).

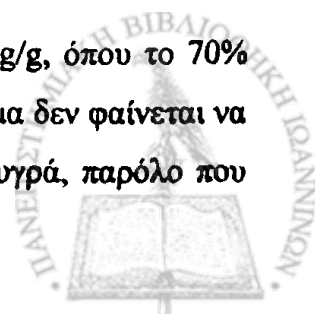
Σημαντικές διαφορές στα επίπεδα Cd μεταξύ μη καπνιστών και καπνιστών εντοπίζονται στο νεφρικό φλοιό, στη μυελώδη μοίρα των νεφρών, στον πνεύμονα, στον προστάτη και στους μύες (Scott R.et al, 1987).

Οι μέσες συγκεντρώσεις Pb σε τσιγάρα με φίλτρο είναι 2,4μg/g, από τις οποίες το 6% περνά στο κύριο ρεύμα καπνού. Οι μέσες συγκεντρώσεις του στο αίμα των καπνιστών και πρώην καπνιστών είναι αρκετά υψηλότερες απ' ότι στους μη καπνιστές, σε συνάρτηση όμως με το επάγγελμα (Quinn M.J. et al, 1987).

Οι συγκεντρώσεις Cr στα τσιγάρα κυμαίνονται από <0,1-3,45μg/g, (Iskander F.Y. et al, 1986), ενώ οι συγκεντρώσεις του στον πνεύμονα των καπνιστών και πρώην καπνιστών είναι σχεδόν τριπλάσια από τις συγκεντρώσεις των μη-καπνιστών. Οι συγκεντρώσεις του Cr στα ούρα επηρεάζονται από τις καπνιστικές συνήθειες (Paakko P.et al, 1989).

Για τον Cu, οι συγκεντρώσεις του στα φύλλα του καπνού κυμαίνονται στο 15,6μg/g και το κάπνισμα αυξάνει τα επίπεδα Cu στο πλάσμα από 1,14mg/l στους μη καπνιστές σε 1,31mg/l στους >10 τσιγάρων/μέρα καπνιστές. Στο νεφρικό φλοιό δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές συγκέντρωσης Cu μεταξύ των καπνιστών και των μη καπνιστών (Blanusa M.et al, 1985).

Οι συγκεντρώσεις Zn κυμαίνονται στα τσιγάρα από 16,8~30,5μg/g, όπου το 70% του περιέχεται στο αέριο προϊόν του (Ahmad S.et al, 1979). Το κάπνισμα δεν φαίνεται να επηρεάζει τα επίπεδα Zn στους περισσότερους ιστούς και βιολογικά υγρά, παρόλο που



στο νεφρικό φλοιό παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσης Zn από 234μg/g στους μη καπνιστές σε 328μg/g στους καπνιστές (Chiba M. et al, 1992).

Σε παλιότερα πειράματα αναπτύχθηκαν φυτά καπνού ποικιλίας τύπου flue-cured (Virginia) σε εδάφη όπου εφαρμόστηκε λάσπη βιολογικού καθαρισμού και μετρήθηκαν οι συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων. Οι μετρήσεις έδειξαν ότι οι συγκεντρώσεις των βαρέων μετάλλων στα φύλλα ήταν 67,4 ppm Cd, 3,88 ppm Pb και 452 ppm Zn ενώ οι συγκεντρώσεις Cd στην σωματιδιακή φάση του κυρίου ρεύματος καπνού βρέθηκαν 6,67μg/τσιγάρο και στην αέρια φάση του κυρίου ρεύματος καπνού 0,04μg/τσιγάρο. Στον υπολογισμό του εισπνεόμενου Cd από έναν βαρύ, χρόνιο καπνιστή οι συγγραφείς του άρθρου αναφέρουν ότι στην περίπτωση που τα καπνά αναπτυχθούν σε λάσπη βιολογικού καθαρισμού, θα πρέπει να συμπεριληφθούν πολλοί παράγοντες όπως: ο αριθμός εφαρμογών λάσπης και η αναλογία λάσπης, η συγκέντρωση του Cd στην λάσπη, ο εδαφικός τύπος και pH, η έκταση της καλλιεργούμενης γης, η ποικιλία του καπνού και ο τύπος των τσιγάρων που θα παρασκευαστούν, ο αριθμός των τσιγάρων που καπνίζει την ημέρα και τα συνολικά χρόνια που καπνίζει ο κάθε καπνιστής όπως και οι καπνιστικές του συνήθειες (Gutenmann WH. et al, 1982).

Σε μεταγενέστερη εργασία αναφέρεται ότι οι συγκεντρώσεις Cd και Ni στην κύρια σωματιδιακή φάση του αέριου προϊόντος καπνού που αναπτύχθηκε σε λάσπη βιολογικού καθαρισμού είναι σημαντικά υψηλότερες από τις αντίστοιχες του μάρτυρα (μόνο έδαφος) αν και κυμαινόταν μέσα στα επίπεδα των εμπορικών τσιγάρων (Bache CA. et al, 1985).

1.4.3. ΜΕΤΑΛΛΑ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ

Ο ακριβής μηχανισμός της καρκινογένεσης που προκαλείται από τα βαρέα μέταλλα παραμένει ασαφής. Η νεοπλαστική μετατροπή των κυττάρων αποδίδεται σε κληρονομήσιμες αλλαγές του γενετικού τους κώδικα. οπότε, κατά αυτή την έννοια, κάθε μόριο που μπορεί να συνδεθεί με συστατικά του κυτταρικού πυρήνα, είναι δυνατόν να επηρεάσει τον γενετικό κώδικα.

Το DNA διαθέτοντας πληθώρα φωσφορικών ανιόντων και ομάδες αζώτου και οξυγόνου, είναι ένα μόριο με υψηλή δεσμευτική ικανότητα για τα μέταλλα (Kasprzak KS., 1995). Κάθε μέταλλο και οι ενώσεις του παρουσιάζουν μεγάλες διαφορές τόσο στις χημικές ιδιότητες όσο και στις βιολογικές τους δράσεις, οπότε είναι αναμενόμενο η πρόκληση καρκίνου να διέπεται σε κάθε περίπτωση από διαφορετικούς μηχανισμούς.



Η βλάβη σε επίπεδο DNA αποτελεί έναν παράγοντα μεταλλαξογένεσης και πιθανόν καρκινογένεσης και έχει ως αποτέλεσμα μεταβολές της οργάνωσης του νουκλεϊνικού μορίου που είτε οφείλεται σε αλλαγή της αλληλουχίας των αζωτούχων βάσεων του, είτε σε μετακίνηση ή διεύρυνση τμημάτων του. Οι μεταβολές αυτές μπορεί να αφορούν τόσο τον γενετικό κώδικα ενός γονιδίου όσο και τις ρυθμιστικές αλληλουχίες της γονιδιακής έκφρασης.

Οι πυρηνικές πρωτεΐνες δεσμεύουν επίσης μέταλλα γιατί η δομή και λειτουργία πολλών από αυτές εξαρτάται από την παρουσία απαραίτητων μετάλλων (π.χ. "zinc fingers, DNA πολυμεράσες καθώς και επιδιορθωτικά ένζυμα του DNA) (Berg JM., 1986, O' Connor TR. et al, 1992).

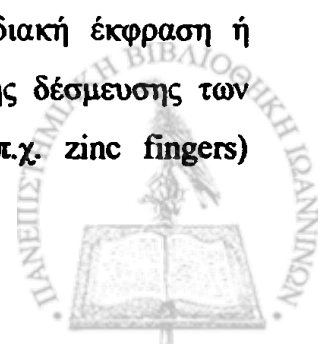
Παρ' όλα αυτά, το αν ένα μεταλλικό κατιόν είναι ή όχι ικανό να αλλάξει τον γενετικό κώδικα με απλή δέσμευση στο DNA και άρα να τροποποιήσει την διαμόρφωση του μορίου, παραμένει μάλλον αδιευκρίνιστο (Sunderman FWJr., 1989).

Η αλλαγή στην διαμόρφωση του μορίου του DNA μπορεί να παρεμποδίσει την αντιγραφή του. Σε πειράματα *in vitro* έχει βρεθεί ότι αρκετά καρκινογόνα μέταλλα μειώνουν την πιστότητα αντιγραφής του DNA (Kasprzak KS., 1995). Κάτι ανάλογο ωστόσο θα ήταν δύσκολο να παρατηρηθεί *in vivo* καθότι οι σχετικά ψηλές συγκεντρώσεις που απαιτούνται για την παραγωγή σημαντικού αριθμού γενετικών σφαλμάτων θα ήταν δύσκολο να επιτευχθούν *in vivo* χωρίς να σκοτώσουν το κύτταρο.

Η δέσμευση των μεταλλικών κατιόντων στο DNA μέσω ιοντικών δεσμών και δεσμών συντονισμού έχει βρεθεί ότι ευθύνεται για πολλές βλάβες στην χρωματίνη του πυρήνα όπως σχάσεις της αλυσίδας, απομάκρυνση βάσεων, σταυροσυνδέσεις και τροποποιήσεις βάσεων, ως αποτέλεσμα ρήξης των υπαρχόντων δεσμών ή σχηματισμού νέων δεσμών στο DNA και τις πρωτεΐνες (Hamilton – Koch W. et al, 1986, Oleinick NL. et al, 1987).

Αυτές οι δράσεις των βαρέων μετάλλων μπορούν να οδηγήσουν σε μεταλλάξεις λόγω της ανώμαλης αντιγραφής ή / και επιδιόρθωσης της κατεστραμμένης μήτρας του DNA, ενώ τα ένζυμα που ελέγχουν αυτές τις διαδικασίες μπορούν επίσης να υποστούν αλλαγές συμβάλλοντας στην αυξημένη συχνότητα γενετικού σφάλματος.

Για τους ίδιους λόγους, μπορεί να προκληθεί ανώμαλη γονιδιακή έκφραση ή ανώμαλη μεταγραφική ή / και μεταφραστική διαδικασία, λόγω της δέσμευσης των μετάλλων στο πυρηνικό RNA και στις ρυθμιστικές πρωτεΐνες (π.χ. zinc fingers) (Sunderman FWJr., 1984, Costa M., 1991).



Τα καρκινογόνα μέταλλα μετάπτωσης έχουν την ικανότητα πρόσδεσης *in vivo* με τον κυτταρικό πυρήνα και πρόκλησης προμεταλλακτικών βλαβών στο DNA στις οποίες συμπεριλαμβάνονται οι τροποποιήσεις βάσεων, δια - και ενδο - μοριακές σταυροσυνδέσεις (cross - linking) του DNA και των πρωτεϊνών, σχάσεις DNA, ανακατατάξεις και αποπουρίνωση, η χημεία των οποίων έχει χαρακτήρα οξειδωτικής προσβολής.

Η θεωρία της οξειδωτικής βλάβης που ασκούν τα μέταλλα έχει αφετηρία το ερώτημα κατά πόσο τα προστιθέμενα μέταλλα είναι ικανά να προκαλέσουν αυτές τις μεταλλάξεις. Σύμφωνα με *in vivo* & *in vitro* δεδομένα τα καρκινογόνα μέταλλα δεσμεύονται και παραμένουν στον κυτταρικό πυρήνα. Παρόλα αυτά, αν και τα διάφορα βαρέα μέταλλα ανταγωνίζονται την σύνδεση μιας πληθώρας κυτταρικών συστατικών στον πυρήνα και κυρίως τα απαραίτητα κατιόντα -π.χ. το $Mg(II)$ -, οι συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων που εντοπίζονται στον πυρήνα είναι πολύ μικρές για να προκαλέσουν *in vivo* τις παραπάνω βλάβες (Sunderman FWJr., 1989).

Επίσης, αν και οι αλλαγές στην διαμόρφωση του DNA και των νουκλεοπρωτεϊνών, όπως και η απομάκρυνση βάσεων από το DNA μπορούν να συσχετισθούν με τον σχηματισμό μεταλλικών "προσθέτων", άλλοι μηχανισμοί όπως η καταστροφή αζωτούχων βάσεων μπορούν να συσχετισθούν μόνο με οξειδωτικά προϊόντα.

Έτσι, η επικρατούσα άποψη είναι ότι η δράση των μετάλλων στο γονιδίωμα είναι κύρια έμμεση (καταλυτική), θεωρία που συμφωνεί με την χημεία των μετάλλων και τα αποτελέσματα πολλών πειραμάτων *in vivo* και *in vitro*.

Σε δημοσιευμένα δεδομένα, ο οξειδωτικός χαρακτήρας των επαγόμενων από τα μέταλλα προμεταλλακτικών τροποποιήσεων του DNA είναι τεκμηριωμένος κυρίως για δύο μόνο ισχυρά καρκινογόνα, το χρώμιο και το νικέλιο.

Παρόλα αυτά, χωρίς να αποκλείεται και η συμβολή άλλων παραγόντων, η θεωρία της οξειδωτικής βλάβης τείνει να πάρει ηγετικό ρόλο στην εξήγηση των μηχανισμών καρκινογένεσης και οξείας τοξικότητας που προκαλούν και πολλά άλλα μέταλλα (Kasprzak KS., 1995).

Η επαγωγή της οξειδωτικής βλάβης του DNA, αποτελεί άμεσο μηχανισμό καρκινογένεσης και έχει αποδειχθεί κυρίως για τις ενώσεις του Cr.

Πρόσφατες έρευνες προτείνουν ότι για άλλα μέταλλα όπως το Cd ή ο Pb, οι μηχανισμοί καρκινογένεσης είναι έμμεσοι και σχετίζονται κυρίως με την αλληλεπίδρασή τους με τις διαδικασίες επιδιόρθωσης του DNA που οδηγεί στην ενίσχυση της γονοτοξικότητας άλλων μεταλλαξογόνων παραγόντων και την αύξηση της συχνότητας

εμφάνισης όγκων. Οι μηχανισμοί διαφέρουν από μέταλλο σε μέταλλο και αφορούν διαφορετικά βήματα της επιδιόρθωσης σε κάθε περίπτωση μετάλλου. Στην περίπτωση του Cd και του Pb, οι διαδικασίες επιδιόρθωσης του DNA διακόπτονται ακόμα και σε χαμηλές μη-τοξικές συγκεντρώσεις.

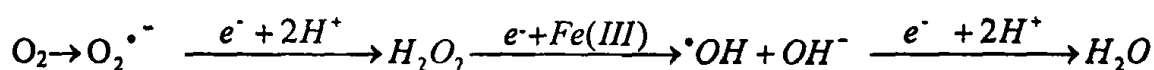
Παρόλα αυτά, ο κοινός μηχανισμός που διακρίνεται είναι ο ανταγωνισμός των μετάλλων αυτών με απαραίτητα μεταλλικά ιόντα όπως ο Zn ή το Mg και η αντικατάστασή τους σε επιδιορθωτικά συστήματα (Hartwig A., 1995, Hartwig A., 1998).

Άλλες παθογόνες δράσεις των μετάλλων που συμμετέχουν έμμεσα στην οξειδωτική βλάβη, είναι η ενίσχυση της υπεροξειδωσης των λιπιδίων, η διέγερση της φλεγμονώδους αντίδρασης και η αναστολή των κυτταρικών αντιοξειδωτικών αμυντικών μηχανισμών (Kasprzak K.S., 1995).

1.4.4. ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ

Το οξυγόνο, ως πηγή ενέργειας των κυττάρων έχει διπλή δράση αφού παράγει αλλά και καταστρέφει τη ζωή. Σήμερα είναι γενικά αποδεκτό ότι οι τοξικές επιδράσεις της υπεροξίας είναι αποτέλεσμα των υψηλών συγκεντρώσεων των ελεύθερων ριζών οξυγόνου που απαιτούν ως υπόστρωμα το μοριακό O₂.

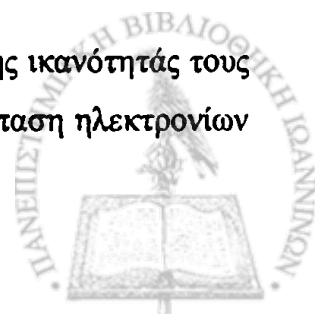
Ελεύθερη ρίζα ονομάζεται κάθε χημική ένωση ή στοιχείο που περιέχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Ελεύθερες ρίζες οξυγόνου είναι τα ενδιάμεσα προϊόντα σταδιακής αναγωγής του μοριακού οξυγόνου προς νερό, με την πρόσληψη ενός ηλεκτρονίου σε κάθε στάδιο.



όπου O₂^{•-}: ρίζα του υπεροξειδίου και •OH: ρίζα του υδροξυλίου.

Οι ρίζες οξυγόνου (O₂^{•-}), (•OH) καθώς και τα παράγωγά τους αλκυλυπεροξειδία ή λιποϋπεροξειδία (R-OO)[•] και αλκοξύλια (R-O)[•] είναι οι πιο συνηθισμένες μορφές ριζών που συμμετέχουν στις αλυσιδωτές αντιδράσεις των βιολογικών συστημάτων, προκαλώντας βλάβες σε βιομόρια, μικρο- ή μακρο-μόρια, όπως οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα.

Η δραστηριότητα των ριζών O₂ είναι το αποτέλεσμα της αυξημένης ικανότητάς τους να προσλαμβάνουν ηλεκτρόνια, συγγένεια που προκαλεί ταχέως απόσπαση ηλεκτρονίων από το πλησιέστερο διαθέσιμο μόριο (Κωσταντή Α., 1999).



Τα πολυριβο- και πολυδεοξυριβο-νουκλεοτίδια και κυρίως οι πουρινικές και πυριμιδινικές βάσεις, δείχνουν ευαισθησία στις ρίζες και στις δραστικές μορφές οξυγόνου.

Οι αντιδράσεις αυτές προκαλούν μετατροπές των ετεροκυκλικών δακτυλίων αλλά και σχάσεις απλού ή διπλού κλώνου.

Οι τροποποιήσεις των βάσεων περιλαμβάνουν:

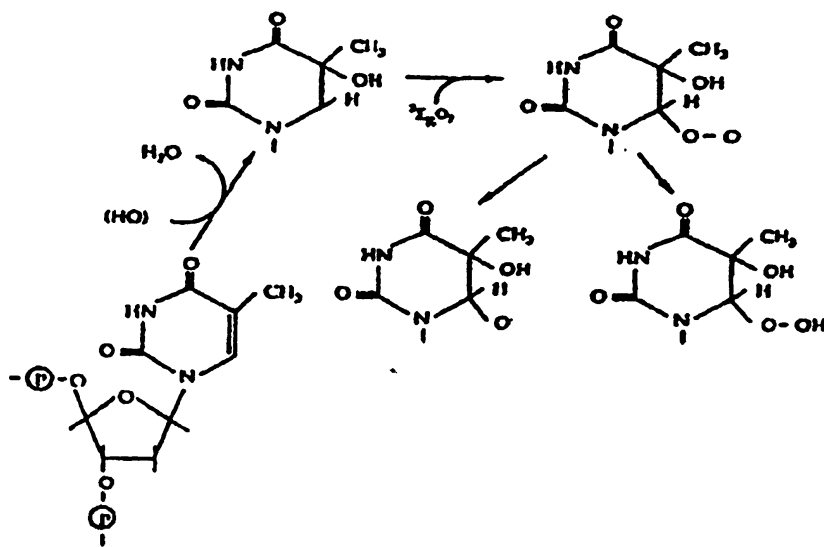
- προσθήκη χημικών ομάδων (π.χ. $\cdot\text{OH}$)
- διάνοιξη δακτυλίων
- μεταβολές μεμονωμένων βάσεων (κυρίως των γουανίνη / κυτοσίνη προς αδενίνη / θυμίνη) ή
- απομάκρυνση βάσεων από το DNA,

δράσεις που θεωρούνται μεταλλαξογόνες.

Επίσης, η οξειδωτική αποδόμηση της ανθρακικής αλυσίδας λόγω αντίδρασης στην (δεοξυ)ριβοζυλομάδα, συνοδεύεται από διάσπαση του σκελετού της φωσφοριβόζης (σχάσεις κλώνων DNA) που μπορεί να προκαλέσει δομικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες ή κυτταρικό θάνατο.

Οι σημαντικότερες πηγές ριζών ή/και δραστικών μορφών οξυγόνου που προκαλούν βλάβες στα νουκλεϊνικά οξέα (μεταλλαξογένεση) και πιθανώς καρκινογένεση είναι οι ιοντίζουσες ακτινοβολίες και η φωτο-οξείδωση.

Αντίδραση με το DNA δίνει η $\cdot\text{OH}$, ενώ τα $\text{O}_2^{\cdot-}$ ή το H_2O_2 δεν αντιδρούν (Λέκκα Μ.,1999).Ο μηχανισμός της αντίδρασης της $\cdot\text{OH}$ σε πυριμιδινική βάση του DNA φαίνεται στο ακόλουθο σχήμα (εικ.1.7):



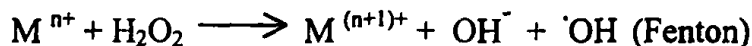
Εικ.1.7: Σχηματική αναπαράσταση δράσης $\cdot\text{OH}$ σε πυριμιδινική βάση του DNA και αποδόμηση αυτής παρουσία μοριακού οξυγόνου (Λέκκα Μ.,1999).



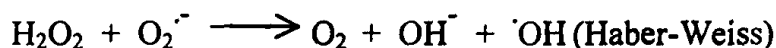
1.4.5. ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΒΛΑΒΗ DNA ΚΑΙ ΒΑΡΕΑ ΜΕΤΑΛΛΑ

Οι πιο σημαντικοί μηχανισμοί της ενεργοποίησης του O_2 από τα μέταλλα συμπεριλαμβάνουν τις Fenton / Haber - Weiss αντιδράσεις και την αυτοοξειδωση.

Ο πρώτος ευθύνεται για την μετατροπή του H_2O_2 και του $O_2^{\cdot-}$ που δεν αντιδρούν με το DNA σε ρίζες $\cdot OH$ που είναι ισχυροί βλαπτικοί παράγοντες του DNA, σύμφωνα με τις αντιδράσεις:

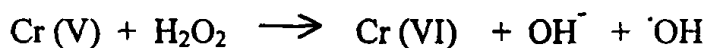


που συνολικά είναι:



Στα μέταλλα αυτά συγκαταλέγονται κυρίως ο Fe και ο Cu που εισπνεόμενα κατά την διάρκεια του καπνίσματος, εκτός από τον σχηματισμό $\cdot OH$ από το H_2O_2 , σχετίζονται και με την διέγερση της υπεροξειδωσης των λιπιδίων και την επιτάχυνση της αυτοοξειδωσης των φαινολών.

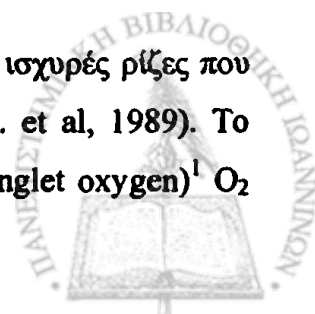
Εξάλλου, άλλα μεταλλικά ιόντα μετάπτωσης όπως τα $Cr(V)$ και Cr^{+2} αντιδρούν με το H_2O_2 και σχηματίζουν $\cdot OH$ (και πιθανόν οξειδωτικά οξο-μεταλλικά συμπλέγματα), σύμφωνα με τις αντιδράσεις:



Τα ιόντα $Cr(V)$ παράγονται με την αναγωγή του $Cr(VI)$ από κυτταρικά αναγωγικά όπως το ασκορβικό οξύ, η γλουταθειόνη κ.λπ. (Shi XG. et al, 1990).

Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, το $Cr(VI)$ δεν αντιδρά με το DNA. Παρόλα αυτά, ανάγεται ενδοκυτταρικά από το H_2O_2 , την γλουταθειόνη-αναγωγή, υδρογονάνθρακες, ασκορβικό οξύ, γλουταθειόνη και άλλα μόρια σε πιο ισχυρά προϊόντα όπως το $Cr(V)$, το $Cr(IV)$ και το $Cr(III)$.

Παράπλευρα προϊόντα της αναγωγής του $Cr(VI)$ είναι διάφορες ισχυρές ρίζες που μπορούν να βλάψουν το DNA, προκαλώντας καρκινογένεση (Shi X. et al, 1989). Το παραγόμενο $\cdot OH$ και τα άλλα οξειδωτικά όπως μονήρες οξυγόνο (singlet oxygen)¹ O_2



και μεταλλικά οξυ- και περοξυ- είδη, όλα ικανά να καταστρέψουν το DNA και τις πρωτεΐνες με ένα θέσι-ειδικό τρόπο (Kawanishi S. et al,1989, Wink DA. et al,1994, Yamamoto K. et al, 1993).

Για την $\cdot\text{OH}$ έχει βρεθεί ότι αντιδρά με όλα τα συστατικά της πυρηνικής χρωματίνης, αλλάζοντας τις βάσεις του DNA και την δεοξυριβόζη και παράγοντας σταυροσυνδέσεις DNA-πρωτεΐνης. Μπορεί επίσης να προκαλέσει απομάκρυνση πουρινών από το DNA και σχάσεις αλυσιδών (Dizdaroglu M. 1992), ενώ τα οξειδωτικά προϊόντα του DNA φαίνεται ότι είναι ικανά να προκαλέσουν οξείδωση γειτονικών βάσεων (Patel U. et al,1992). Έτσι ενώσεις Ni(II) ενισχύουν την *in vitro* οξείδωση γουανίνης (G) και την *in vivo* οξείδωση πολλών βάσεων του DNA (Misra M. et al, 1993). Ανάλογες δράσεις έχουν βρεθεί και για τα Fe(III) , Cr(II) και Cu(III) (Datta AK. et al, 1994).

Επίσης τα μέταλλα μπορούν να καταλύσουν την αποσύνθεση οργανικών υπεροξειδίων (π.χ. υπεροξείδια των λιπιδίων και υδροπεροξείδια νουκλεοσιδίων) μέσω αλυσιδωτών αντιδράσεων και τον σχηματισμό ριζών όπως η $\cdot\text{OH}$.

1.4.6. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΠΡΟΜΕΤΑΛΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΛΑΒΩΝ DNA ΚΑΙ ΒΑΡΕΑ ΜΕΤΑΛΛΑ

Οι πιο κοινοί μηχανισμοί επαγωγής προμεταλλακτικών βλαβών σε επίπεδο DNA από τα βαρέα μέταλλα, χαρακτηριστικοί της οξειδωτικής προσβολής του πυρήνα είναι:

α) Καταστροφή βάσεων DNA

Βιβλιογραφικά δεδομένα αναφέρουν τις κυριότερες τροποποιήσεις βάσεων του DNA που προκαλούνται τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* από τα βαρέα μέταλλα. Η παραγωγή 7,8-διυδρο-8-οξο-2'-δεοξυγουανοσίνης (8-oxo-dG: 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine) σχετίζεται με ενώσεις των Cr(VI) , Ni(II) , Fe(III) κ.αλ., η αύξηση στα επίπεδα της 5-υδροξυμεθυλ-2'-δεοξουριδίνης (5-(OHMe-dU):5-hydroxymethyl-2'-deoxyuridine) σχετίζεται με ενώσεις των Ni και Cd , η καταστροφή βάσεων όπως οι γουανίνη (G) και θυμίνη (T) σχετίζεται με ενώσεις του Fe(II) , Fe(III) , Cu(II) και τα αυξημένα επίπεδα προϊόντων των νουκλεϊνικών βάσεων σχετίζονται με ενώσεις των Ni(II) , Cu(II) , Fe(II) , κ.ά. Η διαμεσολάβηση των βαρέων μετάλλων στις παραπάνω τροποποιήσεις του μορίου του DNA έχει αποδειχθεί με πειραματικές διατάξεις *in vitro* καθώς και *in vivo* (Kasprzak KS., 1995).



β) Σταυροσύνδεση

Η πιο συνηθισμένη μη θανατηφόρος δράση των μετάλλων στην χρωματίνη που έχει παρατηρηθεί *in vivo* & *in vitro* είναι η σταυροσύνδεση DNA – πρωτεΐνης (Wedrychowski A. et al, 1986).

Μορφολογικές δομικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες είναι αποτέλεσμα αυτής της βλάβης.

Οι περισσότερες σταυροσυνδέσεις σχηματίζονται με τα μεταλλικά ιόντα να γεφυρώνουν το DNA και τις πρωτεΐνες με ασθενείς δεσμούς. Σε μια κατηγορία μεταλλοεπαγόμενων σταυροσυνδέσεων όπου DNA και πρωτεΐνες συνδέονται με ισχυρούς ομοιοπολικούς δεσμούς δεν συμπεριλαμβάνονται μεταλλικές γέφυρες, οπότε είναι πιθανή η συμμετοχή OH^- ή άλλων ριζών (Lesko SA. et al, 1982).

Επίσης είναι δυνατός και ο σχηματισμός ενδοαλυσιδικών σταυροσυνδέσεων μεταξύ δύο παρακείμενων βάσεων του DNA που πιστεύεται ότι έχουν ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό διαδοχικών διπλών μεταλλάξεων (Tkeshelashvili LK. et al, 1993).

Οι σταυροσυνδέσεις πρέπει να εμποδίζουν λειτουργίες που σχετίζονται με τον διπλασιασμό ή την μεταγραφή δημιουργώντας γενετικές και επιγενετικές αλλαγές στο κύτταρο.

γ) Σχάσεις

Μέταλλα όπως το Ni διευκολύνουν την σχάση του DNA από το H_2O_2 μέσω ενός ενεργού συμπλέγματος Ni-οξυγόνου με ένα θεσι-ειδικό τρόπο. Τα πιο ευαίσθητα σημεία φαίνεται ότι είναι οι κυτοσίνη (C), θυμίνη (T) και γουανίνη (G) και σπάνια η αδενίνη (A) (Mack DP. et al, 1992).

δ) Απουρίνωση

Συνηθισμένη και δυνητικά μεταλλακτική δράση των καρκινογόνων μετάλλων είναι η απομάκρυνση βάσεων του DNA. Κυρίως, το Cr(VI) ελευθερώνει G, ο Cu(II) ελευθερώνει A και το Ni(II) πιθανόν ελευθερώνει A από το μόριο του DNA (Schaaper RM. et al, 1987). Η απομάκρυνση των βάσεων πραγματοποιείται παράλληλα με σχάση αλυσίδων όπου και τα δύο φαινόμενα πραγματοποιούνται μέσω "επίθεσης" του OH^- στον δακτύλιο σακχάρου του DNA.



1.4.7. ΜΕΤΑΛΛΑΞΟΓΕΝΕΣΗ / ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΒΑΡΕΑ ΜΕΤΑΛΛΑ

Η περιγραφή των παραπάνω μηχανισμών προμεταλλακτικών βλαβών που φαίνεται ότι προκαλούν τα μέταλλα, έγινε με το σκεπτικό ότι υπάρχουν ισχυρές μαρτυρίες ότι σχετίζονται άμεσα με μεταλλάξεις που μπορεί να οδηγήσουν σε καρκινογένεση. Οι πιο συνηθισμένες -επαγόμενες από τα βαρέα μέταλλα μεταλλάξεις- είναι κυρίως οι απλές υποκαταστάσεις βάσεων, χωρίς όμως να αποκλείονται και άλλες περιπτώσεις

Έτσι, ο Fe(II) προκαλεί μεταλλάξεις αμφιμετατροπής (ή μεταστροφές) $G \rightarrow C$ που ακολουθούνται από μεταλλάξεις μετάπτωσης (ή μεταβάσεις) $C \rightarrow T$ και αμφιμετατροπές $G \rightarrow T$, ενώ ο Cu(I & II) προκαλεί κυρίως μεταβάσεις $C \rightarrow T$ ακολουθούμενες από αμφιμετατροπές $G \rightarrow T$ (McBride TJ. et al, 1991, Tkeshelashvili LK. et al, 1991).

Επίσης αναφέρονται διαδοχικές διπλές μεταλλάξεις τύπου $CC \rightarrow TT$ παρουσία Fe(II), Cu(I) & Cu(II) με O_2 ή / και H_2O_2 .

Η σχέση βλάβης / μετάλλαξης έχει τεκμηριωθεί μόνο για τις μεταλλάξεις που παράγει η πιο συχνή οξειδωση βάσης, η 8-οxo-dG, η οποία ωστόσο έχει βρεθεί ότι εκτός από C κωδικοποιεί επίσης και A. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την πρόκληση μετάλλαξης τύπου αμφιμετατροπής $G \rightarrow T$, που αναφέρεται ότι έχει βρεθεί αποκλειστικά σε K-ras ογκογονίδια απομονωμένα από όγκους νεφρών πειραματόζων ύστερα από εφαρμογή Ni_3S_2 (Higinbotham KG. et al, 1992).

Από τις άλλες βλάβες, η σχάση αλυσίδων έχει βρεθεί ότι προκαλεί απαλοιφές και / ή παρεμβολές. Έτσι το χλωρίδιο Ni(II) προκαλεί μεταλλάξεις που αποτελούνται από διπλασιασμό αλυσίδας μήκους 70 βάσεων και που είναι ένδειξη σπασίματος αλυσίδας ακολουθούμενη από εσφαλμένη επιδιόρθωση ή αντιγραφή (Chiocca SM. et al, 1991).

Επίσης, η απουρίνωση της γουανινικής θέσης πρέπει να ευθύνεται για αμφιμετατροπές τύπου $G \rightarrow T$ (McBride TJ. et al, 1991).

Το μοντέλο τροποποιήσεων βάσεων που προκαλείται μέσω οξειδωτικής βλάβης από τα Cu^{++} ή Fe^{++} αναφέρεται ότι αφορά τις βάσεις γουανίνης, ενώ για το Cr(VI) αναφέρεται ότι προκαλεί σε ανθρώπινα γονίδια (P53 & PGK1), in vivo & in vitro, τροποποιήσεις στις θέσεις θυμίνης (Rodriguez H. et al, 1998).

Οι Bose et al αναφέρουν ότι τα ιόντα Cr(V) μεσολαβούν στην οξειδωτική βλάβη των βάσεων γουανίνης, η οξείδωση της οποίας θα πρέπει να σχετίζεται με την μεταφορά ενός ατόμου οξυγόνου από το οξο-Cr(V) κέντρο στον διπλό δεσμό μεταξύ του C_8 και του N_7 του πυρηνικού δακτυλίου (Bose RN. et al, 1999).



Άλλοι ερευνητές αναφέρουν ότι οι μεταλλάξεις υποκατάστασης βάσεως στα ζεύγη GC που επάγονται από το Cr(V) είναι δοσοεξαρτώμενες και προσομοιάζουν με τις μεταλλάξεις που επάγει το H₂O₂, γεγονός που ενισχύει την υπόθεση ότι οι μηχανισμοί καρκινογένεσης του χρωμίου σχετίζονται με την παραγωγή οξειδωτικής βλάβης στο DNA (Liu S. et al, 1999).

Επίσης οι Casadevall et al αναφέρουν ότι οι μηχανισμοί οξειδωτικής βλάβης του DNA από το Cr σχετίζονται με σχάσεις απλών αλυσίδων και με την δημιουργία απουρινικών /απυριμιδινικών θέσεων (AP - sites). Οι ίδιοι ερευνητές αναφέρουν ότι οι δύο μηχανισμοί θα πρέπει να πηγάζουν από μία κοινή πρόδρομη βλάβη, ενώ για την δημιουργία σχάσεων κατά την αναγωγή του Cr(VI) προτείνουν ότι θα πρέπει να προέρχεται κυρίως από την απόσπαση υδρογόνου από το C4' του δακτυλίου σακχάρου του DNA (DNA sugar moiety) (Casadevall M. et al, 1999).

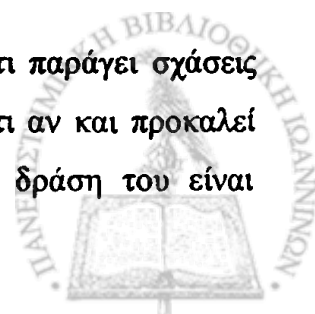
Εξάλλου σε μία *in vivo* μελέτη αναφέρεται ότι στις οξειδωτικές μεταβολές που προκαλούν τα ιόντα Cr(VI) συμπεριλαμβάνονται σταυροσυνδέσεις DNA-πρωτεΐνης, θρυμματισμοί και τροποποιήσεις στην νουκλεοτιδική αλυσίδα και σχηματισμοί 8-υδροξυ-2'-δεοξυγουανωσίνης, ενώ οι μεταβολές αυτές εντοπίζονται επιλεκτικά στους πνεύμονες και όχι στο ήπαρ (Izzotti A. et al, 1998).

Σε υψηλές συγκεντρώσεις και άλλα μέταλλα όπως τα Pb, Co, Hg, Ni, Cd, Mo, V κ.αλ. έχει βρεθεί ότι ευθύνονται για την αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών, χωρίς ν' αποδεικνύεται πειστικά ότι το οξειδωτικό stress παίζει πρωταρχικό ρόλο στους μηχανισμούς τοξικότητας και καρκινογένεσης.

Έτσι, τόσο για τον Pb όσο και το Cd υπάρχουν προτάσεις χωρίς ισχυρά δεδομένα ότι μπορεί να καταλύσει αντιδράσεις παραγωγής ελευθέρων ριζών, αν και πιο πιθανή φαίνεται ότι είναι η ανάμειξη τους σε έμμεσους μηχανισμούς τοξικότητας, π.χ. ενίσχυση υπεροξειδώσης λιπιδίων, διέγερση φλεγμονώδους αντίδρασης, εξάλειψη μηχανισμών άμυνας.

Προκειμένου να υποστηριχθεί η καρκινογόνος δράση τους, υπάρχουν μαρτυρίες σε διάφορες μελέτες ότι προκαλούν αύξηση ανταλλαγών μεταξύ των αδερφών χρωματίδων ή ότι επάγουν χρωματιδιακές και δομικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες (Dönmez H. et al, 1998, Kazantzis G., 1988).

Για το Pb(II) βρέθηκε ότι είναι ασθενές μεταλλαξογόνο και ότι παράγει σχάσεις κλώνων σε υψηλές τοξικές δόσεις, ενώ για το Cd(II) αναφέρεται ότι αν και προκαλεί σχάσεις και δομικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες, η μεταλλαξογόνος δράση του είναι ασθενής (Hartwig A., 1994).



Παρόλα αυτά, οι Yang et al (1996) υποστηρίζουν ότι το Cd προκαλεί μεταλλάξεις στις οποίες συμπεριλαμβάνονται υποκαταστάσεις βάσεων, συγκολλήσεις και απαλοιφές, ενώ η μοριακή φύση των μεταλλάξεων αυτών υποδηλώνει ότι καθορίζονται από τα πρόσθετα DNA που παράγονται μέσω της αλληλεπίδρασης Cd-DNA και ελευθέρων ριζών (Yang JL. et al, 1996).

Επίσης έχει αναφερθεί ότι το Cd σε χαμηλές συγκεντρώσεις (5-35μM) επάγει τον σχηματισμό 8-υδροξυ-2'- δεοξυγουανωσίνης (8-OH dG) και προκαλεί σχάσεις στο DNA, βλάβες που σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σταθεροποιούνται πιθανόν λόγω αντιστάθμισης από την παραγωγή αντιοξειδωτικών ευζύμων (Mikhailova MV. et al, 1997)

Σε άλλη εργασία, η τοξικότητα του Cd(II) όπως και του Cu(II) έχει συσχετιστεί με την παραγωγή προμεταλλακτικής βλάβης 8-οξο-7,8-διυδρογουανίνης (8-oxoguanine) η οποία και ενσωματώνεται στο DNA. Ο ρόλος των μετάλλων σ' αυτή την ενσωμάτωση είναι η παρεμπόδιση της δράσης ειδικών κυτταρικών 8-oxo-dGTPασών που εξουδετερώνουν την 8-oxo-7,8-dihydroguanosine-5'-triphosphate (8-oxo-dGTP) από τη νουκλεοτιδική δεξαμενή (Porter DW. et al, 1997).

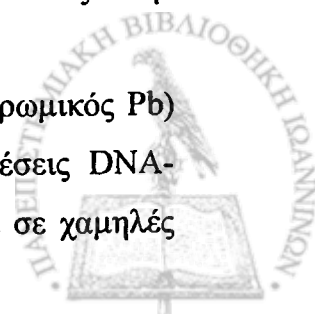
Εξάλλου, το Cd όπως και ο Cu υποκαθιστώντας τον Zn στις μεταγραφικές πρωτεΐνες τύπου zinc-finger και με την προϋπόθεση ότι ενισχύουν και παράγουν ελεύθερες ρίζες, είναι πιθανό να προκαλούν καρκινογένεση διότι η παραγωγή ελευθέρων ριζών σε στενή εγγύτητα με το DNA θεωρείται κλειδί από ορισμένους ερευνητές στο μηχανισμό καρκινογένεσης από τα μέταλλα αυτά (Sarkar B., 1995)

Παρόλαυτά, οι Loyd et al, 1997 υποστηρίζουν ότι το Cd, όπως και τα Cr(III) και Zn δεν προκαλούν τις οξειδωτικές βλάβες που παράγουν τα Cu και Cr(VI) και για τις οποίες μεσολαβούν οι ελεύθερες ρίζες (Loyd DR. et al, 1997).

Για τον Pb τα δεδομένα που υπάρχουν είναι πολύ αμφιλεγόμενα: παρόλο που συναντάται με δύο θετικά σθένη (Pb^{2+} και Pb^{5+}), δεν έχει βρεθεί ότι μπορεί να καταλύσει αντιδράσεις παραγωγής ελευθέρων ριζών.

Οι Hartwig et al (1990) αναφέρουν ότι ο οξικός Pb δεν επάγει σχάσεις, μεταλλάξεις ή ανταλλαγές από μόνος του και ότι μόνο σε συνδυασμό με ένα ισχυρό καρκινογόνο παράγοντα (π.χ. UV), ενισχύει τον αριθμό των μεταλλάξεων παρεμβαίνοντας στην επιδιορθωτική διαδικασία.

Από την άλλη μεριά, άλλοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι ενώσεις Pb (χρωμικός Pb) προκαλούν δοσοεξαρτώμενες σχάσεις απλού κλώνου DNA, σταυροσυνδέσεις DNA-πρωτεΐνης και δομικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες (Xu J. et al, 1992) ή ότι σε χαμηλές



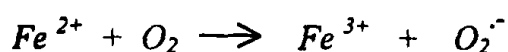
συγκεντρώσεις ο Pb προκαλεί σημειακές μεταλλάξεις και, σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, μεταλλάξεις απαλοιφής (Ariza ME. et al, 1999).

Σε εργασία των Roy et al (1992), όπου μετρήθηκε η μεταλλαξογόνος δράση ενώσεων του Pb σε κυτταρικές καλλιέργειες, βρέθηκε ότι μεταλλακτικότητα παρατηρείται για ορισμένες μόνο ενώσεις Pb και σε υψηλές μόνο δόσεις ενώ σε χαμηλές συγκεντρώσεις ο ρόλος του Pb είναι ενισχυτικός μόνο άλλων μεταλλακτικών παραγόντων (π.χ. UV), πιθανόν γιατί ο Pb δρα ως συμμεταλλαξογόνος και πιθανόν συγκαρκινογόνος παράγοντας.

Οι ίδιοι ερευνητές αναφέρουν παρόλ'αυτά, ότι οι προκαλούμενες ρωγμές (nicks) από ενώσεις ή ιόντα του Pb σε χρωμοσωμικό ή πλασμιδιακό DNA υποδηλώνουν ότι ο Pb συμμετέχει στην παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου (Roy NK. et al, 1992).

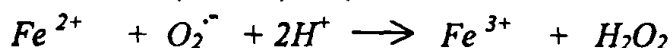
1.4.8. ΑΥΤΟΟΞΕΙΔΩΣΗ ΚΑΙ ΒΑΡΕΑ ΜΕΤΑΛΛΑ

Η απόδοση των μεταβολικών μηχανισμών παραγωγής ελεύθερων ριζών πολλαπλασιάζεται από τις αλυσιδωτές αυτοξειδωτικές αντιδράσεις γιατί τα υποστρώματα των παραπάνω αντιδράσεων, H_2O_2 και $O_2^{\cdot-}$, μπορεί να πηγάζουν από τον κυτταρικό μεταβολισμό και από αυτοξείδωση κάποιων μεταλλικών ιόντων. Στις αυτοξειδωτικές αντιδράσεις το τελικό προϊόν εξαρτάται από τις συνθήκες (π.χ. οξύτητα) και μπορεί να είναι το $O_2^{\cdot-}$ ή το H_2O_2 . Έτσι , π.χ, από την αντίδραση:



προκύπτει $O_2^{\cdot-}$,

και από την αντίδραση:



προκύπτει H_2O_2 .

Τα κύρια υποστρώματα της ενεργοποίησης του οξυγόνου σε $^{\cdot}OH$ και άλλα σχετικά οξειδωτικά, δηλ. το $O_2^{\cdot-}$ και τα H_2O_2 , παράγονται μεταβολικά μέσα στο κύτταρο των θηλαστικών, ενώ η δεξαμενή των υποστρωμάτων εμπλουτίζεται περισσότερο από το H_2O_2 και τα υπεροξείδια των λιπιδίων που παράγονται κατά την έκθεση των κυττάρων σε μέταλλα. Στην εξήγηση των αυτοξειδωτικών αντιδράσεων που συμβαίνουν συχνά σε πολλά βιομόρια και έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 και $^{\cdot}OH$, θα πρέπει να εμπλέκεται και ένας εναλλακτικός μηχανισμός, όπου η δράση των μετάλλων είναι

καταλυτική της αυτοξειδωσης, αποτέλεσμα της πρόσδεσης των μετάλλων σ' αυτά τα βιομόρια (Miller DM. et al, 1990).

Έτσι, οι αντιδράσεις της ενεργοποίησης του οξυγόνου προχωρούν *in vivo* γύρω και μέσα στον κυτταρικό πυρήνα (Kasprzak KS., 1995).

1.4.9. ΒΑΡΕΑ ΜΕΤΑΛΛΑ ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ

Εκτός από τις αλλαγές που προκαλούν τα μέταλλα στο γενετικό κώδικα ενός γονιδίου, τροποποιήσεις παρατηρούνται και σε αλληλουχίες βάσεων που ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση. Ο λόγος που γίνεται αυτή η διάκριση είναι το γεγονός ότι ορισμένα μέταλλα αντιδρούν με τις προσδεμένες στο DNA πρωτεΐνες, με αποτέλεσμα να παρατηρούνται γενετικές αλλαγές που αφορούν τις ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων και να επηρεάζεται η μεταγραφή των πυρηνικών οξέων (γονιδιακή έκφραση).

Η υποκατάσταση του Zn στα σημεία σύνδεσης DNA και ρυθμιστικών πρωτεϊνών των γονιδίων από μέταλλα, όπως το Cd, έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση της μεταγραφής, με συνέπεια την πιθανή πρόκληση μετάλλαξης και καρκινογένεσης (Kazantzis G., 1988) (Γιαννάκης Δ. και συν., 1996).

Ως μεταγραφικοί παράγοντες δρουν οι πρωτεΐνες τύπου zinc-finger, οι οποίες ανήκουν στις προσδεμένες στο DNA πρωτεΐνες και έχουν την ιδιότητα να προσδένονται εξειδικευμένα σε βραχείες αλληλουχίες DNA, ελέγχοντας τη μεταγραφή πολλών γονιδίων. Μέταλλα όπως το Cd, και ο Cu υποκαθιστούν τον ψευδάργυρο στις zinc-finger δομές (Sarkar B., 1995)

Τα zinc-finger συγκαταλέγονται μαζί με τα zinc twists και zinc-clusters στις ρυθμιστικές πρωτεΐνες των γονιδίων. Οι πρωτεΐνες αυτές εμπλέκονται στη μεταγραφή και περιέχουν λειτουργικά απαραίτητα άτομα ψευδαργύρου. Το 1983, οι Hanas και συνεργάτες βρήκαν ότι ο μεταγραφικός παράγοντας IIIA (TF III A) που ενεργοποιεί τη μεταγραφή του 55RNA γονιδίου περιέχει 2-3 mol Zn/mol πρωτεΐνης στο *Xenopus* (Hanas JS. et al, 1983).

Η οριστική κατανόηση του τρόπου που οι επικράτειες των zinc-finger εξυπηρετούν στην θεσι-ειδική αναγνώριση συγκεκριμένων δεσμευμένων στο DNA πρωτεϊνών, προήλθε από την ανάλυση τριών zinc-finger της Zif-268 πρωτεΐνης ποντικού (Pavletich NP. et al, 1991).



Κάθε επικράτεια αποτελείται από ένα αντιπαράλληλο β-φύλλο που περιέχει 2 μόρια Cys και μια α-έλικα που περιέχει 2 μόρια His, οι οποίες συγκρατούνται με συντονισμό των 2 ριζών σε ένα κεντρικό άτομο Zn μαζί με μια ομάδα υδρόφοβων ριζών.

Κάθε ένα από τα τρία Zn fingers χρησιμοποιεί Arg, Asp και His από το N-τελικό άκρο της α-έλικας του, προκειμένου να έρθει σε επαφή με τα ζεύγη γουανίνης στη μέγιστη κοιλότητα (major groove) του DNA. Τα αμινοξέα αυτά προέρχονται από την κεντρική πεπτιδική θηλειά (loop) μεταξύ της 2^{ης} Cys και 1^{ης} His κάθε finger.

Η τετραεδρική γεωμετρία γύρω από τα άτομα Zn προσανατολίζει το finger σε θεσι-ειδική αλληλεπίδραση, ενώ ο Zn προωθεί επίσης την αλληλεπίδραση της πρώτης His με το κυρίως σώμα του DNA.

Πέντε Zinc finger εντοπίστηκαν και στο ανθρώπινο GLI ογκογονίδιο με μεγάλη συγγένεια στις δεσμευτικές περιοχές του DNA, όπου η αναγνώριση του DNA προέρχεται επίσης από τη κεντρική πεπτιδική loop, χωρίς όμως την συμμετοχή όλων των fingers. (Pavletich NP. et al, 1993)

Οι υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών (GR) και οιστρογόνων (ER) ανήκουν σε ομάδα πρωτεϊνών του τύπου των πυρηνικών υποδοχέων. Μετά την δέσμευση της ορμόνης, ο υποδοχέας μεταναστεύει από το κυτόπλασμα στον πυρήνα όπου συνδέεται σε μια ειδική αλληλουχία του DNA (GRE ή ERE) και ρυθμίζει τη μεταγραφή.

Σε αυτούς τους υποδοχείς έχουν βρεθεί 2 άτομα Zn που συντονίζονται με 4 κυστεϊνικές ρίζες.

Η αναγνώριση της δεσμευτικής περιοχής του DNA προέρχεται από την α-έλικα που είναι μέρος της συνδετικής πεπτιδικής περιοχής μεταξύ των θέσεων των 2 Zn και που ονομάζεται zinc twist (Valley BL. et al, 1991)

Μια δεύτερη α-έλικα που είναι αγκυροβολημένη στο C-τελικό άκρο των συντονιστικών κυστεϊνών της δεύτερης περιοχής Zn διασχίζει κατακόρυφα την πρώτη έλικα και την σταθεροποιεί με υδρόφοβη αντίδραση μεταξύ των δύο ελίκων. Η σφαιρική πεπτιδική επικράτεια των zinc twist έχει μια περιοχή αναγνώρισης του DNA μεταξύ των 2 ατόμων ψευδαργύρου. Τα 2 άτομα ψευδαργύρου συντονίζονται τετραεδρικά με οκτώ μόρια κυστεϊνης και με την κεντρική α-έλικα του zinc twist να σχηματίζει ένα σύμπλεγμα με την μέγιστη κοιλότητα (major groove) του DNA.

Η λειτουργία του ψευδαργύρου σε αυτή την οικογένεια πυρηνικών υποδοχέων είναι διπλή: 1) σταθεροποιεί την έλικα που εμπλέκεται στην αναγνώριση του DNA και 2) βοηθά στον προσανατολισμό της αναδίπλωσης του πεπτιδίου της δεύτερης περιοχής του ψευδαργύρου, κρίσιμου στην διαδικασία διμερισμού (Valley BL. et al, 1995)

Ο GAL4 μεταγραφικός παράγοντας του *Saccharomyce cerevisiae* αποτελείται από 881 αμινοξέα και ρυθμίζει παρουσία γαλακτόζης την γονιδιακή έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν την δεσμευτική επικράτεια του DNA. Στο GALL βρέθηκαν 2 moles ψευδαργύρου ανά mole πρωτεΐνης (Valley BL. et al, 1992) που συντονίζονται στις έξη ρίζες κυστεΐνης σχηματίζοντας ένα διπολικό θειολικό zinc cluster. Η αναγνωριστική περιοχή των zinc clusters έχει προταθεί ότι βρίσκεται μεταξύ των ριζών 12 και 13.

Πρόσφατα ανακαλύφθηκε η κρυσταλλική δομή ενός κλάσματος του μεταγραφικού παράγοντα της ζύμης, του GAL4 (1-65) που δεσμεύεται στο DNA ως ένα συμμετρικό διμερές (Marmorstein R. et al, 1992).

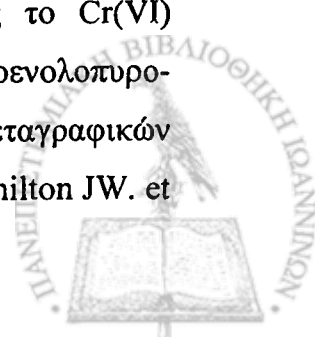
Κάθε υπομονάδα αναδιπλώνεται σε 3 διαφορετικά μόρια: το zinc cluster (8-40), μια εκτεταμένη συνδετική περιοχή (41-45) και ένα στοιχείο διμερισμένης α-έλικας (50-64).

Η zinc cluster περιέχει δύο βραχείες α-έλικες, τις ρίζες 10-22 και 27-35, όπου η πρώτη και η τέταρτη είναι οι ρίζες Cys όπου δεσμεύεται ο ψευδάργυρος. Η zinc cluster αναγνωρίζει την τριπλέτα CCG στο τέλος κάθε πλευράς μέσω άμεσης επαφής με τη μέγιστη κοιλότητα του DNA, και ο ψευδάργυρος σταθεροποιεί την αλληλεπίδραση μεταξύ πρωτεΐνης και DNA.

Σε εργασία των Merlan et al (1999), αναφέρεται ότι η p53 ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που συνδέεται με το μόριο του DNA μέσω μιας πρωτεϊνικής επικράτειας (protein domain) που σταθεροποιείται μέσω της συμμετοχής Zn, εντός ενός τετραεδρικού συμπλέγματος το οποίο αποτελείται από 3 μόρια κυστεΐνων και ένα μόριο ιστιδίνης. Το Cd, μέταλλο που συνδέεται με μεγάλη συγγένεια στις θειόλες και που υποκαθιστά τον Zn στα κυστεινυλ- συμπλέγματα πολλών πρωτεϊνών, εμποδίζει την λειτουργία της p53, προκαλώντας αλλαγές στην διαμόρφωση της, γεγονός που μπορεί να παίζει ρόλο στην καρκινογενετική του δράση (Merlan C. et al, 1999).

Σε παλιότερες εργασίες έχει αποδειχθεί άλλωστε ότι in vitro τα Zn, Mg, Ca ανταγωνίζονται το Cd στις θέσεις σύνδεσης του με το DNA και ότι η ικανότητα ανταγωνισμού ακολουθεί την σειρά αναγραφής Zn>Mg>Ca και είναι παράλληλη με την in vivo ικανότητα αναστολής της Cd-επαγόμενης καρκινογένεσης (Waalkes MP. et al, 1984).

Σε πρόσφατες μελέτες αναφέρεται ότι χημικά καρκινογόνα όπως το Cr(VI) μεταβάλλουν επιλεκτικά την έκφραση επαγωγικών γονιδίων (π.χ. της φωσφοενολοπυροσταφυλικής καρβοξυκινάσης) επιδρώντας τόσο στην πρόσδεση των μεταγραφικών παραγόντων όπως επίσης και στην λειτουργία των προαγωγών γονιδίων (Hamilton JW. et al, 1998).



1.4.10. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΒΑΡΕΩΝ ΜΕΤΑΛΛΩΝ ΚΑΙ ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΤΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ

Εκτός από την επαγωγή οξειδωτικής βλάβης στο DNA και την σχέση τους με τη μεταγραφική διαδικασία, τα βαρέα μέταλλα επιδρούν στις διαδικασίες επιδιόρθωσής του, οι οποίες ενεργοποιούνται προκειμένου να απομακρύνουν τις ενδογενείς βλάβες που προκύπτουν από περιβαλλοντικούς και άλλους παράγοντες (Hartwig A., 1998).

Μεταλλάξεις προκαλούνται λόγω της μειωμένης πιστότητας αντιγραφής του DNA. Μέταλλα με τέτοιου τύπου δράση είναι το Cd, το Cr, ο Cu, και ο Pb που παρεμβαίνοντας στην DNA πολυμεράση προκαλούν λάθη στην αντιγραφή (Zakour RA. et al, 1981), ανταγωνιζόμενα μέταλλα όπως το Mg^{2+} ή το Mn^{2+} τα οποία ενεργοποιούν την πολυμεράση αυξάνοντας την συγγένεια της με το μόριο του DNA (Zahradka P. et al, 1982).

Η DNA πολυμεράση I π.χ. περιέχει τρεις πλευρές ενεργότητας, κάθε μια από τις οποίες απαιτεί ένα δισθενές ιόν όπως το Mg^{2+} ή το Mn^{2+} για την ενεργοποίησή της (Mullen GP. et al, 1990)

Τα δισθενή μέταλλα όπως το Cd^{2+} , ο Cu^{2+} , ο Pb^{2+} και ο Zn^{2+} πιθανόν παρεμβάλλονται στην διαδικασία αναγνώρισης της βλάβης του DNA και στην διαδικασία τομής/ αντικατάστασης του μηχανισμού νουκλεοτιδικής επιδιόρθωσης δια αποκοπής (NER: nucleotide excision repair process) (Calsou P. et al, 1996)

Ένζυμα όπως η ενδονουκλεάση, η πόλυ-ADP-ριβοζο πολυμεράση και η DNA λιγάση επηρεάζονται δομικά ή λειτουργικά από τη παρουσία βαρέων μετάλλων και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της επιδιόρθωσης του DNA (Hartwig A., 1990, Hartwig A., 1994), πιθανόν λόγω ανταγωνισμού των μετάλλων αυτών με απαραίτητα ιχνοστοιχεία όπως το Mg, ο Ca και ο Zn (Beyersmann D., 1994)

Η ενδονουκλεάση IV π.χ., είναι ένας αρχέτυπος μιας απουρινικής/απυριμιδικής οικογένειας ενδονουκλεασών που προετοιμάζει την επιδιόρθωση του DNA, σχίζοντας τον βασικό κορμό της DNA 5' αλυσίδας στις AP θέσεις. Το ένζυμο περικυκλώνει τις intercalate πλευρικές αλυσίδες στις αβασικές θέσεις, συμπιέζει και διπλώνει το DNA κατά περίπου 90' και προκαλεί εκτίναξη των διπλών νουκλεοτιδίων, ώστε οι AP θέσεις να εγκλωβιστούν σε μια ενζυμική "τσέπη" που αποκλείει τα μη κατεστραμμένα νουκλεοτίδια. Αυτή η δομή απαιτεί την άμεση συμμετοχή τριών ιόντων Zn^{2+} για την απόσχιση των φωσφοδιεστερικών δεσμών (Hosfield DJ. et al, 1999).



Επίσης, υπάρχουν ενδείξεις ότι τα ενδογενή μέταλλα παίζουν κρίσιμο ρόλο στην δομή των ενδονουκλεασών IV και ενός ομολόγου της, της *Apr1*, και ότι το *Mn* είναι πιθανόν να επηρεάζει την λειτουργία της ενδονουκλεάσης IV (Levin JD. et al, 1991).

Εξάλλου η πόλυ- (ADP-ριβοζο) πολυμεράση είναι ένα ένζυμο της χρωματίνης του πυρήνα που επηρεάζει με αντιδράσεις πολυμερισμού διάφορες λειτουργίες της, κυρίως αυτές όπου συμβαίνει τομή και επανένωση του DNA. Έχει αποδειχθεί ότι η επικράτεια σύνδεσης (DNA-binding domain) της πρωτεΐνης στο DNA που περιέχει δύο υποτιθέμενες zinc-fingers (δακτυλιώσεις ψευδαργύρου), προσδένεται στο DNA μ' ένα τρόπο ψευδαργυροεξαρτώμενο, και ότι στο σημείο σύνδεσης υπάρχουν πλευρές πρόσδεσης του μετάλλου (Menissier- de Murcia J. et al, 1989).

Για την DNA λιγάση I, οι Yang et al (1996) αναφέρουν ότι είναι στόχος για τα ιόντα *Zn* και *Cd* που προκαλούν αναστολή της λειτουργίας της επηρεάζοντας διαφορετικές περιοχές του ενζύμου και αναστέλλουν και τα τρία βήματα της αντίδρασης, δηλ. τον σχηματισμό της σύνδεσης λιγάσης-AMP, τη μεταφορά του AMP στο DNA και την κατάλυση της αντίδρασης σύνδεσης (ligation reaction) που επιτυγχάνει τον σχηματισμό συμπλέγματος AMP-DNA (Yang SW. et al, 1996).

Εξάλλου, η ενεργότητα ενός DNA-μεταλλοένζυμου με ιδιότητες DNA-λιγάσης που καταλύει τον σχηματισμό νέου φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ δύο ολιγονουκλεοτιδίων, βρέθηκε ότι εξαρτάται από την παρουσία των ιόντων Zn^{2+}/Cu^{2+} (Cuenoud B. et al, 1995).

Μια μη ειδική ενδονουκλεάση, η *Eg* DNAαση, φαίνεται ότι απαιτεί την παρουσία ιόντων Mg^{2+} για την δράση της και ότι η πρόσδεση μετάλλων μετάπτωσης προκαλεί λεπτές αλλαγές τόσο στην δευτεροταγή όσο και στην τεταρτοταγή πρωτεϊνική της δομή (Pommer AJ. et al, 1999).

Επίσης το ένζυμο *O*⁶-αλκυλγουανιν-DNA-αλκυλτρανσφεράση (AGT) που αντιστρέφει την αλκυλιωτική δράση μεταλλαξογόνων παραγόντων στο DNA απενεργοποιείται παρουσία μετάλλων όπως το *Cd*, ο *Cu* και ο *Zn*, πιθανόν λόγω της αλληλεπίδρασης των μετάλλων αυτών με την ρίζα κυστεΐνης του υποδοχέα της πρωτεΐνης. Ανάλογη δράση δεν βρέθηκε από τα *Pb* και *Cr* (Scicchitano DA. et al, 1987).

Η κυτταρική προστασία από την μεταλλακτικότητα του 8-οxo-dG περιλαμβάνει ένζυμα ικανά να απομακρύνουν την 8-οxo-dG-triphosphate (8-οxo-dGTP) από την δεοξυνουκλεοτιδική δεξαμενή και την 8-οxo-dG από το μόριο του DNA. Τουλάχιστον δύο από αυτά τα ένζυμα εξαρτώνται από απαραίτητα μέταλλα:



- 1) η ειδική τριφωσφατάση (MutT πρωτεΐνη) που διασπά την 8-oxo-dGTP και εξαρτάται από την παρουσία Mg(II) (Mo JY. et al, 1992) και
- 2) η φορμαμιδοπυριμιδιν- DNA γλυκοσυλάση (formamidopyrimidine DNA glycosylase: Fpg πρωτεΐνη) που αφαιρεί 8-oxo-dG και κάποια άλλα προϊόντα πουρινικών βάσεων από το DNA και εξαρτάται από τον Zn(II) (είναι zinc finger πρωτεΐνη) (O'Connor TR. et al, 1993). Επομένως, και τα δύο ένζυμα θα πρέπει να υπόκεινται σε αναστολή από άλλα δισθενή κατιόντα.

Αποτελέσματα έδειξαν ότι ο Zn(II) στην Fpg πρωτεΐνη μπορεί να αντικατασταθεί από Cu(II), Cd(II) και Hg(II) και το Mg(II) στην MutT πρωτεΐνη μπορεί να αντικατασταθεί από άλλα δισθενή ιόντα, π.χ. Ni(II), χωρίς να είναι γνωστός ο ρόλος τους στην λειτουργικότητα των παραπάνω ενζύμων.

Επίσης, τα βασικά μέταλλα μπορούν να παρεμποδίσουν την επιδιόρθωση του DNA (π.χ. σχάσεις αλυσίδων από UV ή X ακτινοβολία) με το να αναστέλλουν τα στάδια πολυμερισμού και/ή σύνδεσης.

Έτσι το Ni(II) επιδρά στα επιδιορθωτικά ένζυμα (DNA πολυμέραση και λιγάσες) υποκαθιστώντας το Mg(II). Επίσης το Co(II) έχει βρεθεί ότι σταματά την επιδιόρθωση διμερών πυριμιδίνης που προκαλεί η UV, μπλοκάροντας την διαδικασία αποκοπής. (Hartwig A. et al, 1991) Ανάλογα αποτελέσματα δεν έχουν βρεθεί για τα Pb(II), Cr(VI), Fe(III) και Sn(II), ενώ η επιδιόρθωση των βλαβών που προκαλεί η UV στο DNA έχει βρεθεί ότι παρεμποδίζονται από τα Cr(VI), Cd(II) και As(I) (Snyder RD. et al, 1989, Hartwig A. et al, 1989, Lee-Chen SF. et al, 1991).

1.4.11. ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΜΕΤΑΛΛΩΝ ΣΤΟ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ STRESS

Στις παθογόνες δράσεις που μεσολαβούνται από μέταλλα, συμπεριλαμβάνονται η ενίσχυση της υπεροξειδωσής των λιπιδίων, η αναστολή των αντιοξειδωτικών μηχανισμών άμυνας και η διέγερση της φλεγμονής, δράσεις που, μαζί με την αναστολή των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA, συμβάλλουν στην επαγωγή της καρκινογένεσης (Karprzak KS., 1995).

α. Υπεροξειδωση των λιπιδίων

Η υπεροξειδωση των λιπιδίων ξεκινά με απόσπαση ενός ατόμου υδρογόνου από τις α-αλληλικές μεθυλενομάδες και σχηματισμό οργανικών υδροπεροξειδίων (R-OOH) που,



παρουσία ιόντων Fe^{2+} ή Fe^{3+} , μπορούν να δώσουν $(\text{R-OO})^\bullet$ και $(\text{R-O})^\bullet$. Από τις ρίζες αυτές προκύπτουν υδρογονάνθρακες, αλδεΐδες (κυρίως 4-υδροξυαλκανάλες και μηλονυλοδιαλδεΐδη), ROH και διεγερμένο μονήρες οξυγόνο. Μόρια που περιέχουν θειολικές ομάδες όπως η κυστεΐνη, η γλουταθειόνη και οι πρωτεΐνες αντιδρούν αυθόρμητα ή ενζυμικά με αλκενάλες ή υδροξυαλκενάλες και σχηματίζουν προϊόντα προσθήκης. Ταυτόχρονα, κατά την υπεροξειδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων παράγονται και καρβονυλικά προϊόντα διάσπασης που μπορούν να διαχυθούν από το σημείο παραγωγής τους (μεμβράνες ή λιποπρωτεΐνες) προς μακρινούς ενδοκυττάριους ή εξωκυττάριους στόχους, προκαλώντας βλάβες λόγω αντίδρασης με τα -SH και -NH₂ των αμινοξέων, πεπτιδίων, πρωτεϊνών, νουκλεοτιδίων και νουκλεϊνικών οξέων (Λέκκα Μ., 1999)

Η ενίσχυση της υπεροξειδωσης των λιπιδίων έχει παρατηρηθεί *in vivo* και *in vitro* από τα Cd(II), Co(II), Cu(II), Hg(II), Ni(II), Pb(II), Sn(II), V(v) Fe(III).

Τα προϊόντα της υπεροξειδωσης των λιπιδίων έχει βρεθεί ότι μεσολαβούν στον σχηματισμό 8-oxo-dG και ρήξης αλυσίδων του DNA (Park JW. et al, 1992, Hartwig A. et al, 1993).

Το Cd αναφέρεται ότι *in vitro* προκαλεί αύξηση της υπεροξειδωσης των λιπιδίων και αλλαγές στο δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης σε ανθρώπινους ινοβλάστες πνεύμονα, μαζί με την παραγωγή Δραστικών Μορφών Οξυγόνου (ROS), γεγονός που μπορεί να σχετίζεται στενά με την επαγόμενη τοξικότητα που οδηγεί σε καρκίνο ή εμφύσημα (Yang CF. et al, 1997).

Στην χρονιά ηπατική και νεφρική τοξικότητα του Cd, θεωρείται ότι ο ρόλος του οξειδωτικού stress είναι μείζων και ότι σχετίζεται με την παρατηρούμενη υπεροξειδωση των λιπιδίων και την σταδιακή αύξηση στα επίπεδα γλουταθειόνης τόσο στο ήπαρ όσο και στο νεφρικό φλοιό (Shaikh ZA. et al, 1999).

Σε μια προσπάθεια προσδιορισμού του μηχανισμού επαγωγής από το Cd της υπεροξειδωσης των λιπιδίων στα λιποσώματα ήπατος και νεφρών πειραματοζώων, αναφέρεται ότι μόνο παρουσία ιόντων Fe^{2+} παρατηρείται υπεροξειδωση και ότι το Cd προκαλεί μια χρονο-εξαρτώμενη απελευθέρωση ιόντων Fe από τις βιολογικές μεμβράνες, γεγονός που υποδεικνύει ότι η δράση του Cd είναι έμμεση και ότι σε αυτή μεσολαβεί ο Fe (Casalino E. et al, 1997).

Στα ερυθροκύτταρα η επαγόμενη από το Cd υπεροξειδωση των λιπιδίων μειώνει την αντιοξειδωτική τους ικανότητα με αλλαγές στα αντιοξειδωτικά τους συστήματα και βλάβες στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη (Sarkar S. et al, 1997).



Οι αντιδράσεις υπεροξειδωσης μεμβρανικών λιπιδίων και τα προϊόντα τους προκαλούν διαταραχές στην οργάνωση των βιολογικών μεμβρανών, ενώ όταν αφορούν πρωτεΐνες μεταβάλλουν τη βιολογική τους ενεργότητα, π.χ. την παραγωγή ή αναγνώριση βιολογικών σημάτων. Έχει αναφερθεί ότι οι αλκενάλες σε μικρές συγκεντρώσεις ενεργοποιούν την αδενυλοκυκλάση και τη φωσφολιπάση C, μεταβάλλουν τις ιδιότητες των απολιποπρωτεϊνών και μεταβάλλουν τα ανοσολογικά χαρακτηριστικά και την εξειδίκευση πρόσδεσης σε υποδοχείς. Αν σχηματιστούν κοντά σε νουκλεϊνικά οξέα μπορεί να προκληθούν βλάβες σε γενετικούς μηχανισμούς ή και στην βιοσύνθεση πρωτεϊνών (Λέκκα Μ., 1999).

Ο Pb έχει αναφερθεί ότι ενισχύει την επαγόμενη από τον Fe^{2+} υπεροξειδωση των λιπιδίων πιθανόν γιατί ιόντα χωρίς οξειδοαναγωγική δυνατότητα προωθούν τον διαχωρισμό φάσεων και την ακαμψία της μεμβράνης (Verstraeten SV. et al, 1997).

Όπως το Cd, ο Pb προκαλεί επίσης ενίσχυση της υπεροξειδωσης των λιπιδίων στα ερυθρά αιμοσφαίρια, ενώ στο επαγόμενο από τον Pb οξειδωτικό stress συμβάλλει και η αναστολή της δράσης της δ-αμινολεβουλινικής αφυδρατάσης (ALAD) που οδηγεί στην συσσώρευση και αυτοοξειδωση του δ-αμινολεβουλινικού οξέως, πρόδρομης ένωσης της αίμης (Gürer H. et al, 1998), με παραγωγή Δραστικών Μορφών Οξυγόνου (ROS). Το αμινολεβουλινικό οξύ (ALA) επηρεάζει το διαμεμβρανικό δυναμικό (ρευστότητα ιόντων Ca^{2+} και ρυθμό αναπνοής) και ο Pb^{2+} μπορεί να μπει στο εσωτερικό των κυττάρων, περνώντας μέσα από τα κανάλια Ca^{2+} , όπου συνδέεται γρήγορα με τις -SH ομάδες των πρωτεϊνών και σε υψηλές συγκεντρώσεις προκαλεί εξάλειψη της γλουταθειόνης (GSH). Ο Pb(II) προκαλεί συσσώρευση του δ-αμινολεβουλινικού οξέος που υφίσταται αυτοοξειδωση με σχηματισμό H_2O_2 και $\text{O}_2^{\cdot -}$ (Hermes-Lima M. et al, 1991).

Πρόσδεση με τις -SH ομάδες των πρωτεϊνών που οδηγεί σε εξάντληση του GSH έχει αναφερθεί και για το Cd.

Έτσι, η αυξημένη υπεροξειδωση των λιπιδίων κατά την έκθεση σε βαρέα μέταλλα των ιόντων αναφέρεται ότι μπορεί να είναι αποτέλεσμα: 1) του τραυματισμού των ιστών ή 2) της εξάντλησης της αντιοξειδωτικής γλουταθειόνης GSH, και όχι άμεσης τοξικότητας των μετάλλων καθ' αυτό (Sugiyama S., 1994).



β. Αναστολή μηχανισμών άμυνας : μείωση γονιδιακής ρύθμισης

Η γλουταθειόνη (GSH) είναι ένα υδατοδιαλυτό τριπεπτίδιο που εκτός από πηγή θειολικής ομάδας για τα κύτταρα, αντιδρά άμεσα ή έμμεσα (ως συμπαράγοντας σε υπεροξειδάσες ή αναγωγάσες) με τις ελεύθερες ρίζες (Λέκκα Μ., 1999).

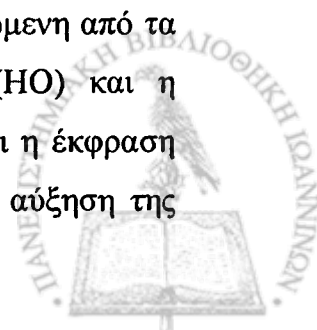
Ταυτόχρονα θα πρέπει να ελέγχει την γονιδιακή έκφραση πολλών αντιοξειδωτικών ενζύμων (Gong Q. et al, 1997). Σε παλιότερη εργασία αναφέρεται ότι η μείωση στην σύγκέντρωση γλουταθειόνης μπορεί να προωθήσει την καρκινογένεση ή μπορεί να επηρεάσει την ευαισθησία των καρκινικών κυττάρων στα χημειοθεραπευτικά ή στα αντιδρώντα αναγωγικά προϊόντα οξυγόνου που εκκρίνονται από τα φλεγμονώδη κύτταρα (Arrick BA. et al, 1984, Arrick BA. et al, 1982).

Η συγκέντρωση της GSH μειώνεται παρουσία βαρέων μετάλλων όπως το Cd, τα οποία είτε αντιδρούν μαζί της είτε προκαλούν την παραγωγή ελευθέρων ριζών που την προσβάλουν. Οι προτεινόμενοι μηχανισμοί μέσω των οποίων μειώνονται τα επίπεδα γλουταθειόνης παρουσία Cd αναφέρεται ότι συμπεριλαμβάνουν:

1. την αναστολή μεταφοράς κυστεΐνης στο κύτταρο
2. την αναστολή των ενζύμων σύνθεσης της γλουταθειόνης
3. την επαγωγή μεταλλοθειονίνης που επίσης χρησιμοποιεί κυστεΐνη στην σύνθεση της, με αποτέλεσμα τη μείωση της διαθέσιμης κυστεΐνης για την σύνθεση γλουταθειόνης (Takafumi O. et al, 1987).

Η μείωση στην συγκέντρωση GSH που επάγεται μετά από έκθεση σε βαρέα μέταλλα, προκαλεί μια προοξειδωτική κατάσταση που έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της σύνθεσης DNA και κυτταροδιαίρεσης. Σε κυτταρικό προοξειδωτικό στάδιο, το ενδοκυτταρικό επίπεδο ενεργών μορφών οξυγόνου αυξάνεται είτε μέσω υπερπαραγωγής ROS είτε μέσω αναστολής της μεταβολικής οδού καταστροφής τους. Πολλοί παράγοντες και μηχανισμοί επάγουν προοξειδωτικές ιδιότητες (π.χ. αυξημένη πίεση οξυγόνου, ακτινοβολία, ξеноβιοτικός μεταβολισμός και αντιδράσεις τύπου Fenton κ.λ.π.) (Cerutti P., 1985). Τα αντιοξειδωτικά βοηθούν στην διατήρηση σε σταθερές συγκεντρώσεις του ενεργού οξυγόνου, οπότε η αναστολή ή μείωση των επιπέδων τους επάγει την προοξειδωτική κατάσταση.

Η συγκέντρωση της ενδοκυτταρικής γλουταθειόνης ελέγχει την επαγόμενη από τα βαρέα μέταλλα γονιδιακή έκφραση ενζύμων όπως η αιμοξυγενάση-1(HO) και η γλουταθειόν-S-τρανσφεράση (GST). Όσο μειώνεται η GSH τόσο αυξάνεται η έκφραση των ρυθμιστικών γονιδίων των HO, MT (μεταλλοθειονίνη) και GST, ενώ αύξηση της



GSH και των άλλων θειολών προκαλεί μείωση της γονιδιακής τους έκφρασης. Η προκαλούμενη από το Cd μείωση GSH, σε χρόνια έκθεση ακολουθείται από μια γρήγορη αύξηση στην συνέχεια, πιθανόν λόγω επαγωγής του ενζύμου σύνθεσης της γ-γλουταμυλκυστεϊν-συνθετάση.

Από αυτό, οι Gong et al συμπεραίνουν ότι τα γονίδια που διατηρούν το ενδοκυτταρικό επίπεδο της GSH σταθερό θα πρέπει να απορυθμίζονται παρουσία βαρέων μετάλλων, και ότι κατά την χρόνια έκθεση η επαγόμενη «κυτταρική προσαρμογή» δεν είναι πάντα ευεργετική, γιατί οι προοξειδωτικές ιδιότητες του Cd, που αντανακλώνται στην ικανότητα αυτού του παράγοντα να μειώνουν την ενδοκυτταρική συγκέντρωση GSH, παίζουν ρόλο στην γονιδιακή ρύθμιση των αμυντικών ενζυμικών συστημάτων (Gong Q. et al, 1997).

Η επαγόμενη από το Cd γονιδιακή έκφραση ενισχύεται από την εξάλειψη GSH και σταματά από την παροχή συμπληρωματικής θειόλης.

Εκτός από την ενδοκυτταρική GSH, τα μέταλλα μετάπτωσης έχουν την ιδιότητα να μετατρέπουν και την δράση ορισμένων μεταλλοενζύμων όπως οι δισμουτάσες υπεροξειδίου (SOD-Zn, Cu, Mn), η καταλάση (Fe αίμη), η γλουταθειόν-υπεροξειδάση (Se), η αιμογλοβίνη και η σερουλοπλασμίνη που αποτελούν τα βασικά συστήματα των αμυντικών μηχανισμών εκκαθάρισης των ελευθέρων ριζών (Καπούλας Β., 1999, Dovinova I. et al, 1999).

Έτσι, σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα αναφέρεται ότι παρατηρήθηκε μειωμένη δράση της SOD που συσχετίζεται με την παρουσία μετάλλων όπως το Cr^{3+} και ο Pb^{2+} προκειμένου να αποδειχθεί ο ρόλος τους στην δημιουργία νεοπλασιών (Martin-Mateo MC. et al, 1997).

Η ελαττωματική δράση της MnSOD πρέπει να σχετίζεται κυρίως με τη μειωμένη έκφραση του υπεύθυνου γονιδίου παρά με την έλλειψή του. Σε πρώιμα στάδια καρκινογένεσης θα πρέπει να γίνεται παρεμπόδιση της μεταγραφής, σχετιζόμενη με την έλλειψη Mn, που θα πρέπει να περιορίζει την πρόσδεση στο DNA των μεταγραφικών παραγόντων και να μειώνει την γονιδιακή έκφραση της MnSOD (Borello S. et al, 1993).

Οι Yoo et al αναφέρουν παρόλα αυτά ότι η επαγωγή του SOD1 γονιδίου από μεταλλικά ιόντα απαιτεί την παρουσία ενός στοιχείου μεταλλο-αποκρινόμενου (metal-responsive element-MRE) μεταξύ των θέσεων 273 και 267 (GCGCGCA), που παράγεται μετά από έκθεση σε βαρέα μέταλλα (Yoo HY. et al, 1999).

Τα μεταλλο-αποκρινόμενα στοιχεία (Metal Responsive Elements MRE) συμμετέχουν μαζί με τους μεταλλο-μεταγραφικούς παράγοντες -1 (Metal Transcription

Factor -1 MTF-1), που είναι zinc finger πρωτεΐνες, στην επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης πολλών ενζυμικών συστημάτων (MT, HO). Ο MTF-1 είναι ένας ρυθμιστής που προσδένεται στον MRE στην περιοχή ενός προαγωγού γονιδίου και που παρουσία μεταλλικών ιόντων προκαλεί ενεργοποίηση της γονιδιακής έκφρασης (Palmiter RD., 1994).

Από τα μέταλλα εξαρτάται και η αλληλεπίδραση μεταξύ των στοιχείων αντιοξειδωτικής απόκρισης [Antioxidant Response Element (ARE)] με τις ενεργοποιούμενες πρωτεΐνες-1 [Activator Protein-1 (AP-1)] μια οικογένεια leucine zipper πρωτεϊνών που συμμετέχουν επίσης στην γονιδιακή ρύθμιση αντιοξειδωτικών ενζύμων (π.χ. GST). Η AP-1 αποτελείται από τις πρωτεΐνες c-jun και c-fos και έκθεση κυττάρων σε βαρέα μέταλλα (π.χ. Cd) προκαλεί αύξηση της έκφρασης των πρωτεϊνών αυτών (Timblin CR. et al, 1998), με συνεπακόλουθη αύξηση της σύνθεσης του AP-1, της πρόσδεσης του AP-1 στο DNA και της αύξησης της έκφρασης του γονιδίου παραγωγής (Bergelson S. et al, 1994 α,β).

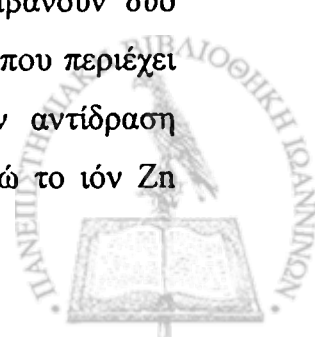
Επίσης, σε άλλη εργασία αναφέρεται ότι το Cd ενώ σε μικρές συγκεντρώσεις επάγει τον σχηματισμό 8-OHdG και σχάσεων στο DNA, σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις επάγει την πυρηνική δραστηριότητα ενεργότητα των καταλάσης και SOD, με ταυτόχρονη μείωση συγκέντρωσης της GSH και αύξηση της συγκέντρωσης της οξειδωμένης της μορφής (GSSG) (Mikhailova MV. et al, 1997).

Παρόλα αυτά, οι Sarkar et al αναφέρουν ότι το Cd στα ερυθρά αιμοσφαίρια προκαλεί μείωση της ενζυμικής δράσης της SOD και της καταλάσης (CAT), εξάλειψη της περιεχόμενης γλουταθειόνης και ενίσχυση της δράσης της γλουταθειόνης--S-τρανσφεράσης (Sarkar S., 1997).

γ. Αναστολή μηχανισμών άμυνας: Μείωση της ενζυματικής λειτουργίας αντιοξειδωτικών ενζύμων ή ενίσχυση συστημάτων ενεργοποίησης οξυγόνου

Εκτός από την γονιδιακή ρύθμιση αντιοξειδωτικών ενζύμων και την συγκέντρωση γλουταθειόνης, τα βαρέα μέταλλα μπορούν να επηρεάσουν και την ενζυμική δραστηριότητα και σταθερότητα βασικών ενζυμικών συστημάτων.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν οι CuZnSOD που περιλαμβάνουν δύο πρωτεϊνικές υποομάδες κάθε μια από τις οποίες φέρει μια ενεργειακή θέση που περιέχει ένα ιόν Cu και ένα ιόν Zn. Το ιόν Cu έχει λειτουργικό ρόλο στην αντίδραση δισμουτάσης, με το να υφίσταται εναλλακτικά οξείδωση και αναγωγή, ενώ το ιόν Zn βοηθά στην σταθεροποίηση του ενζύμου.



Κάθε υποομάδα συντίθεται κυρίως από 8 αντιπαράλληλους κλώνους που σχηματίζουν ένα πεπλατυσμένο κύλινδρο και από μια θηλειά ("loop"). Το ιόν Cu βρίσκεται στην ενεργό πλευρά αλληλοεπιδρώντας με τα άζωτα των ιμιδαζολικών δακτυλίων των τεσσάρων ριζών ιστιδίνης, ενώ ο Zn σχηματίζει "γέφυρα" με τον χαλκό αντιδρώντας με τα ιμιδαζόλια της His 61, με την His 69, την His 78 και την καρβοξυλομάδα του Asp 81. Η His 61 που αντιδρά με τα δύο ιόντα, θα πρέπει να συμμετέχει στην παροχή πρωτονίων που χρειάζονται στην αντίδραση δισμουτάσης.

Μεγάλη επιφάνεια κάθε υποομάδας έχει αρνητικό φορτίο εκτός από τα θετικά φορτισμένα «μονοπάτια» που οδηγούν τις ρίζες $O_2^{\cdot -}$ στις ενεργές περιοχές του ενζύμου.

Χημική τροποποίηση αυτών των θετικά φορτισμένα πλευρικών αλυσίδων αμινοξέων μειώνει την ενζυμική δραστηριότητα, ενώ υψηλή ιοντική δύναμη παρεμβαίνοντας στην ηλεκτροστατική διευκόλυνση της αντίδρασης δισμουτάσης του $O_2^{\cdot -}$ επίσης, μειώνει την ενζυμική δραστηριότητα (Fridovich I., 1995).

Αντικατάσταση του Cu^{2+} οδηγεί στην δημιουργία πρωτεΐνης με μειωμένη ενζυμική δράση (O'Neill P. et al, 1982), ενώ αντικατάσταση του Zn^{2+} επηρεάζει την ενζυμική σταθερότητα. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δύο υποομάδων είναι απαραίτητες για την σταθεροποίηση της ορθής γεωμετρίας της κοιλότητας και του άριστου προσανατολισμού των φορτισμένων ριζών του ενεργού καναλιού.

Για το λόγο αυτό, η μονομερής μετάλλαξη ανθρώπινων SOD παρουσία Cd διαταράσσεται, με τα ιόντα Cd να καταλαμβάνουν το 45% των θέσεων του Cu στα 4 μόρια ιστιδίνης. Ταυτόχρονα η δομή διαταράσσεται στην δισουλφιδική γέφυρα της περιοχής του loop IV που εδρεύει στην εσωτερική πλευρά των δύο υποομάδων, με αποτέλεσμα την διαταραχή της διαμόρφωσης της πλευρικής Arg143 που σχετίζεται με την κατάλυση (Ferraroni M. et al, 1999).

Το Cd(II) φαίνεται ότι είναι ένας ισχυρός και ειδικός αναστολέας της υπεροξειδιοδισμουτάσης (Shukla GS. et al, 1987), με αποτέλεσμα να προωθεί τον μεταβολικό σχηματισμό $O_2^{\cdot -}$ στους επηρεασμένους ιστούς. Επίσης φαίνεται ότι ενισχύει την παραγωγή $O_2^{\cdot -}$ μέσω διέγερσης της πυριδινο-νουκλεοτιδοξειδάσης (Ochi T. et al, 1983). Η καρκινογόνος δράση του Cd, σχετιζόμενη με τα παραπάνω, θα πρέπει να οφείλεται στην εκτομή του DNA από $O_2^{\cdot -}$ (Peskin AV. et al, 1986).



Η οξειδωτική προσβολή μπορεί επίσης να ενισχυθεί από τα βαρέα μέταλλα (π.χ. Ni(II) και Cu(II)) καθώς αυτά ενισχύουν ή μιμούνται τα ένζυμα ενεργοποίησης του οξυγόνου [π.χ. ο Cu(II) μιμείται την δράση της μυελουπεροξειδάσης] (Frenkel K. et al, 1986).

Επίσης τα καρκινογόνα μεταλλικά κατιόντα έχουν την ικανότητα να δεσμεύονται σε κυτταρικά αντιοξειδωτικά όπως η Cys, His, GSH κ.λ.π. και να τροποποιούν τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες.

δ. Αναστολή ή προστασία μηχανισμών άμυνας: αμφιλεγόμενη δράση MT

Η προσαρμογή και άμυνα διαφόρων ιστών όπως ο πνεύμονας στα διάφορα βαρέα μέταλλα και τις οξειδωτικές ρίζες είναι πολυπαραγοντική και συμπεριλαμβάνει την συμμετοχή πολλών παραμέτρων ανθεκτικότητας.

Μια από αυτές είναι η μεταλλοθειονίνη που συμβάλλει στην προστασία τόσο μέσω της δέσμευσης των βαρέων μετάλλων όπως το Cd, όσο και λειτουργώντας ως στόχος των οξειδωτικών ριζών (Gong Q. et al, 1997).

Η μεταλλοθειονίνη είναι μια απλή πολυπεπτιδική αλυσίδα 61 αμινοξέων με δύο διαφορετικά μεταλλοθειολικά clusters που περιέχουν αντίστοιχα 1 και 3 μεταλλικά ιόντα. Παίζει σημαντικό ρόλο στην αποτοξίκωση από βαρέα μέταλλα όπως το Cd και ο Hg, ενώ συμμετέχει στην απορρόφηση, αποθήκευση και ομοιόσταση απαραίτητων ιχνοστοιχείων όπως ο Zn και ο Cu. Ταυτόχρονα σχετίζεται και με τις αντιδράσεις μεταφοράς μετάλλων *in vivo*, όπως του Zn σε επιδιορθωτικά ένζυμα του DNA και με τις αντιδράσεις εκκαθάρισης των οξειδωτικών ριζών.

Η σύνθεση της επάγεται από τα βαρέα μέταλλα Cd και Cu και από χημικά ή περιβαλλοντικά ερεθίσματα που παράγουν ελεύθερες ρίζες καθώς και από ενδογενείς παράγοντες που παράγουν οξειδωτικό stress (δηλ. από κυτοκίνες=factor-α, ιντερλευκίνες IL1 και IL6 που εκκρίνονται από τα μακροφάγα κάτω από stress, τραυματισμό ιστού ή φλεγμονή, από τα γλυκοκορτικοειδή, την γλουκαγόνη κ.λ.π.) (Sato M. et al, 1993).

Στην επαγωγή της γονιδιακής της έκφρασης συμμετέχουν οι MRE και MTF-1 που προαναφέρθηκαν. Κάτω από έκθεση μετάλλου (π.χ. Cd ή Zn) το γονίδιο παραγωγής MT ενεργοποιείται και η παραγόμενη MT απενεργοποιεί τα μέταλλα με δέσμευση οπότε μειώνεται το διαθέσιμο μέταλλο που θα μπορούσε να αλληλεπιδράσει με κρίσιμους στόχους προκαλώντας την εμφάνιση όγκου (McKenna I. et al, 1998).



Τα ισομερή MT κωδικοποιούνται από διαφορετικές γονιδιακές αλληλουχίες, όπως π.χ. τα MTI και MTII που εντοπίστηκαν στους πνεύμονες πειραματοζώων.

Παρόλα αυτά, έχει αναφερθεί έλλειψη συσχέτισης μεταξύ της επαγωγής της MTmRNA και της MT πρωτεΐνης σε πειραματόζωα εκτεθειμένα σε Cd (Misra R. et al, 1997).

Τα Cd, Zn, Cu και Hg επάγουν την σύνθεση της αποπρωτεΐνης (θειονίνης) στην οποία και δεσμεύονται. Οι επαγόμενες από τα Cd ή Cu μεταλλοθειονίνες περιέχουν Zn ως δευτερεύον μέταλλο, ενώ τα Co, Ni, Mn, Cr ή Fe ενώ επάγουν την σύνθεση τους έχουν ως μεταλλοϊόν τον Zn. Η συγγένεια των μεταλλικών ιόντων στις θέσεις δέσμευσης, όπου εμπλέκονται οι 20 κυστεϊνικές ρίζες, είναι $Zn < Cd < Cu < Hg, Ag$, οπότε ο Zn αντικαθίσταται εύκολα από άλλα μέταλλα και αποδεσμεύεται από την πρωτεΐνη (Sato M. et al, 1993).

Η οξειδωτική προσβολή της MT πραγματοποιείται στα θειομεταλλικά clusters και έχει ως αποτέλεσμα την οξείδωση των θειολικών ομάδων και την απελευθέρωση των προσδεμένων μεταλλικών ιόντων (Thornalley S. et al, 1985).

Η αποδέσμευση π.χ. του Zn προστατεύει από την υπεροξείδωση των λιπιδίων, σταθεροποιώντας τις μεμβράνες ή επηρεάζει πολλές κυτταρικές λειτουργίες όπως την πρόσληψη Fe, την αναστολή της NADPH-κυτόχρωμα- c-αναγωγάσης, την ενεργοποίηση του γονιδίου παραγωγής της μεταλλοθειονίνης και /ή την αύξηση της δράσης της γλουταθειόν-υπεροξειδάσης.

Επίσης η μεταλλοθειονίνη δεσμεύοντας τα ιόντα Fe, τον απενεργοποιεί από την παραγωγή αντίδρασης τύπου Fenton (Sato M. et al, 1993).

Στους πνεύμονες αναφέρεται ότι η MT εκτός από την δέσμευση Cd θα πρέπει να εκκαθαρίζει τις ελεύθερες ρίζες που παράγονται κατά την φλεγμονώδη διαδικασία που ακολουθεί την εισπνοή αερίων Cd και που επίσης ενεργοποιούν τα γονίδια παραγωγής MT (McKenna I. et al, 1998).

Παρόλα αυτά, ορισμένοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι η μεταλλοθειονίνη έχει αντίθετο ρόλο στο οξειδωτικό stress και ότι διεγείρει την υπεροξείδωση των λιπιδίων που επάγουν οξειδωτικοί παράγοντες ή ότι προκαλεί βλάβες στο DNA από τις ελεύθερες ρίζες που παράγονται από το περιεχόμενο στην πρωτεΐνη Cd, συντελώντας στην καρκινογένεση (Müller T. et al, 1991).



ε. Αναστολή ή διέγερση αμυντικών μηχανισμών

Μέρος του μηχανισμού άμυνας του κυττάρου είναι και οι διαδικασίες που ενεργοποιούνται από τις δραστικές μορφές οξυγόνου και οδηγούν στην επαγωγή των πρωτεϊνών stress ή heatshock πρωτεϊνών (HSP₅). Κάτω από συγκεκριμένα ερεθίσματα αρχίζει η μεταγραφική ενεργοποίηση μιας μικρής ομάδας ειδικών γονιδίων που οδηγούν στην παραγωγή των stress πρωτεϊνών. Οι HSP₅ μπορεί να συμμετέχουν στην προστασία των κυττάρων με την αποτροπή της αποδόμησης των πρωτεϊνών, της υπεροξειδωσής των λιπιδίων, της εισροής ιόντων ασβεστίου από το εξωκυττάριο περιβάλλον, με την διατήρηση των επιπέδων ATP, την επαγωγή των κλασσικών εκκαθαριστών και την αναστολή οποιουδήποτε σταδίου μπορεί να οδηγήσει σε θάνατο των κυττάρων που προέρχεται από οξειδωτική βλάβη (Λέκκα Μ., 1999).

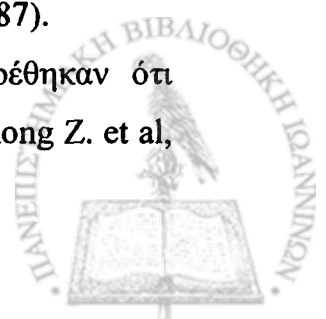
Έκθεση κυττάρων σε CdCl₂ φαίνεται ότι αυξάνει την παραγωγή των αποκρινόμενων στο stress πρωτεϊνών GRP78, HSP72/73 καθώς και την συγκέντρωση οξειδωμένων και αναγωγικών μορίων θειόλης με επαγωγή των παραγωγών γονιδίων (Timblin CR. et al, 1998), που μεσολαβούν στην ανταπόκριση στην οξειδωτική βλάβη.

στ. Μέταλλα και φλεγμονή

Η σχέση μεταξύ φλεγμονής και νεοπλασίας έχει αναφερθεί για πολλούς ιστούς, συμπεριλαμβανομένων των πνευμόνων. Η φλεγμονώδης αντίδραση είναι κρίσιμη στην αλληλουχία γεγονότων που μεσολαβούν μεταξύ της αντίδρασης των εισπνεόμενων σωματιδίων με τα κυψελιδικά μακροφάγα (AM) και τα δομικά επιθηλιακά κύτταρα μέχρι την ανάπτυξη νεοπλασίας ή ίνωσης. Τα καρκινογόνα μέταλλα, κυρίως εκείνα που δρουν τοπικά, προκαλούν μια φλεγμονώδη αντίδραση που έχει ως αποτέλεσμα την διήθηση του κατεστραμμένου ιστού από τα φαγοκύτταρα με όλα τα εκκριτικά οξειδωτικά όπλα τους. Τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα είναι γνωστό ότι καταστρέφουν τις νουκλεϊνικές βάσεις του DNA (Jackson JS. et al, 1985).

Κύτταρα HeLa με διεγερμένα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα βρέθηκαν ότι είχαν αυξημένα επίπεδα 5-υδροξυμεθυλ-2'-δεοξουριδίνης (5-OHMe-dU :5-hydroxymethyl-2'-deoxyuridine), ένα οξειδωτικό προϊόν της θυμιδίνης (dT) (Frenkel K. et al, 1987).

Επίσης, κάποια καρκινογόνα μεταλλικά σουλφιδικά σωματίδια βρέθηκαν ότι διεγείρουν τα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα για την παραγωγή H₂O₂ (Zhong Z. et al, 1990).



Οι φλεγμονώδεις συνθήκες στον πνευμονικό ιστό συμβάλουν στον σχηματισμό γονοτοξικών μεταβολικών ουσιών και μπορούν ν' απορυθμίσουν τα γονίδια που σχετίζονται με τον διπλασιασμό των κυττάρων στην κυψελιδική περιοχή, απάντηση καλά τεκμηριωμένη ύστερα από έκθεση σε περιβαλλοντικό stress, συμπεριλαμβανομένης της έκθεσης σε ενώσεις βαρέων μετάλλων όπως το οξείδιο του Cd.

Η εισπνοή μετάλλων προκαλεί σημαντικό διπλασιασμό των κυψελιδικών μακροφάγων που, αν και είναι πλήρως διαφοροποιημένα κύτταρα που δεν μπορούν να μετατραπούν σε καρκινικά, παίζουν διπλό ρόλο είτε ως αμυντικό σύστημα είτε ως επαγωγείς πνευμονικής βλάβης (McKenna I. et al, 1997).

Τα ενεργοποιημένα ΑΜ ελευθερώνουν αυξημένα ποσά διαμεσολαβητών φλεγμονής (λευκοτριένια), οξειδωτικές ρίζες, πρωτεολυτικά ένζυμα, κυτοκίνες (TNFα, IL-1, IL-8) και ρυθμιστικές πρωτεΐνες αύξησης (fibronectin, TGF-β) που σχετίζονται με την παθογένεια της χρόνιας και οξείας πνευμονικής βλάβης.

Οι διαμεσολαβητές διακρίνονται σε άμεσης (IL-8, TNF-α, MIP, IL-1), πρώιμης (IL-4) και όψιμης (IL-6, TGF-β) αντίδρασης.

Τόσο ο TNF-α όσο και ο IL-8 έχουν προφλεγμονώδη δράση κυρίως μέσω ενεργοποίησης (TNF) και χημειοέλξης (IL-8) των πολυμορφοκυττάρων.

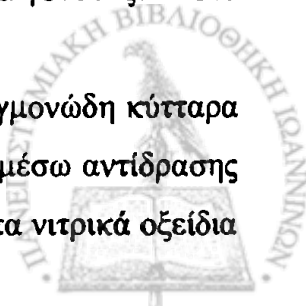
Επίσης οι TNF-α και TGF-β θα πρέπει να θεωρηθούν ως πολυπαραγοντικές κυτοκίνες που μεγεθύνουν μια σειρά αντιδράσεων όπως η έκφραση μορίων προσκόλλησης, η διέγερση της κυτταρικής αύξησης και η μιτογόνο δραστηριότητα.

Ο TNF-α εμπλέκεται στην απόπτωση και προκαλεί επαγωγή αντιοξειδωτικής προστασίας, μέσω MnSOD. Επίσης, η αυξημένη έκφραση του IL-8 και των μορίων προσκόλλησης στα επιθηλιακά κύτταρα προσδίδει ένα μηχανισμό προσέλκυσης και ενεργοποίησης (με παραγωγή ROS) των PMN (Borrm PJ. et al, 1996).

Έτσι, η έκκριση κυτοκίνης επηρεάζει την καρκινογένεση μέσω της ενίσχυσης της έκκρισης και δράσης ROS από τα PMN και μέσω της διέγερσης ή επιβεβαίωσης της κυτταροδιαίρεσης και αύξησης της απόπτωσης και νέκρωσης.

Η ελευθέρωση ROS από τα ουδετερόφιλα και μακροφάγα συμβάλει στην ανάπτυξη καρκίνου μέσω οξειδωτικού μηχανισμού διότι πραγματοποιούν βιοενεργοποίηση των καρκινογόνων των οποίων τα προϊόντα και οι ρίζες οι ίδιες είναι άμεσα γονοτοξικά στα πνευμονικά κύτταρα.

Οι Rosin et al αναφέρουν ότι πιθανώς τα παραγόμενα από τα φλεγμονώδη κύτταρα H₂O₂, αντιδρούν με τα μεταλλοϊόντα της χρωματίνης παράγοντας [•]OH μέσω αντίδρασης τύπου Fenton ή εναλλακτικά ότι τα ανιόντα υπεροξειδίου αντιδρούν με τα νιτρικά οξείδια



που παράγονται από τα διεγερμένα φλεγμονώδη κύτταρα και σχηματίζουν ρίζες υπεροξυνιτρώδεις που διασπώνται σε ρίζες υδροξυλίου και προσβάλουν το DNA (Rosin M. et al, 1994).

Ταυτόχρονα, τα ΑΜ, όντας κύτταρα μικρού χρόνου ζωής, με τον θάνατο τους ελευθερώνουν τα βαρέα μέταλλα που είχαν υποστεί φαγοκυττάρωση, αποτελώντας πηγή προσβολής και ενεργών ενδιάμεσων παραγόντων που μπορεί να αντιδράσουν με άλλα κύτταρα (McKenna I. et al, 1997).

Η μεταβολική ενεργοποίηση προκαρκινογόνων από τα φλεγμονώδη κύτταρα, έχει αποδειχθεί για τα ουδετερόφιλα που μέσω οξειδωτικών μηχανισμών ενεργοποιούν αρωματικές αμίνες, αφλατοξίνες, οιστρογόνα, φαινόλες και πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (Kensler TW. et al, 1992). Επίσης έχει αναφερθεί ότι τα φλεγμονώδη κύτταρα συμμετέχουν στον σχηματισμό νιτροζαμινών (Marletta MA., 1988).



2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Πειραματικό υλικό

Για την παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 40 νεαρά φυτά καπνού της ανατολικού τύπου Ποικιλίας Τσεμπέλια (Ποικιλία Ι) και 40 νεαρά φυτά καπνού της ανατολικού τύπου Μυρωδάτα (Ποικιλία ΙΙ), περιοχής Αγρινίου.

Τα νεαρά φυτά προέρχονταν από ειδικά σπορεία. Ο χρόνος σποράς είχε πραγματοποιηθεί κατά τα μέσα Μαρτίου σε νότιας έκθεσης, ελαφρό και αμμοιλυώδες έδαφος με οργανική ουσία 3-6%, αφού είχε προηγηθεί λίπανση N – P – K.

Στα αρτίβλαστα είχε γίνει κανονική παροχή νερού και προστασία με ειδικά καλύμματα για 30-40 μέρες μετά την σπορά.

Η μεταφύτευση των νεαρών φυτών πραγματοποιήθηκε στις 5-5-1995, σε εξωτερικό χώρο που βρίσκεται στο αγρόκτημα της Σχολής Τεχνολογίας Γεωπονίας των Τ.Ε.Ι. Ηπείρου, που εδρεύει στην Άρτα. Η μεταφύτευση των νεαρών φυτών έγινε σε πλαστικά δοχεία.

Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε όξινο έδαφος (pH 1 =5.5) προελεύσεως περιοχής Αγρινίου και αλκαλικό έδαφος (pH 2 =7.4) περιοχής Άρτας (χωρίς CaCO₃).

Ως λίπασμα χρησιμοποιήθηκε λάσπη pH =7,1 προερχόμενη από τον βιολογικό καθαρισμό Ιωαννίνων που μεταφέρθηκε στον χώρο ανάπτυξης των φυτών την ημέρα της μεταφύτευσης. Επίσης, στη μία ομάδα υποστρώματος χρησιμοποιήθηκε ανόργανο N – P – K λίπασμα τύπου 11 – 15 – 15 σε αναλογία 30gr/φυτοδοχείο.

2.1.1. Συνθήκες πειραματισμού

Για τον σκοπό της μελέτης τα φυτά της κάθε ποικιλίας χωρίστηκαν σε 10 διαφορετικές ομάδες υποστρωμάτων ανάπτυξης, με 4 φυτά κάθε ομάδα:

1. ΟΜΑΔΑ 0% – pH 1 : 0% λάσπη βιολογικού καθαρισμού + 100% έδαφος όξινο
2. ΟΜΑΔΑ 10% – pH 1 : 10% λάσπη βιολογικού καθαρισμού + 90% έδαφος όξινο
3. ΟΜΑΔΑ 20% – pH 1 : 20% λάσπη βιολογικού καθαρισμού + 80% έδαφος όξινο
4. ΟΜΑΔΑ 40% – pH 1 : 40% λάσπη βιολογικού καθαρισμού + 60% έδαφος όξινο
5. ΟΜΑΔΑ ΑΛ – pH 1 : N – P – K λίπανση + 100% όξινο έδαφος
6. ΟΜΑΔΑ 0% – pH 2 : 0% λάσπη βιολογικού καθαρισμού + 100% έδαφος αλκαλικό
7. ΟΜΑΔΑ 10% – pH 2 : 10% λάσπη βιολογικού καθαρισμού + 90% έδαφος αλκαλικό
8. ΟΜΑΔΑ 20% – pH 2 : 20% λάσπη βιολογικού καθαρισμού + 80% έδαφος αλκαλικό
9. ΟΜΑΔΑ 40% – pH 2 : 40% λάσπη βιολογικού καθαρισμού + 60% έδαφος αλκαλικό
10. ΟΜΑΔΑ ΑΛ – pH 2 : N – P – K λίπανση + 100% έδαφος αλκαλικό

Στις παραπάνω συνθήκες τα φυτά τοποθετήθηκαν ανά ένα σε κάθε δοχείο, αφού προηγήθηκε ανάμιξη εδάφους και οργανικής ή ανόργανης λίπανσης, και ακολούθησαν μια σειρά καλλιεργητικών φροντίδων ως την ημερομηνία έναρξης συλλογής των φύλλων:

1. Σκάλισμα (2 φορές μετά την μεταφύτευση)
2. Άρδευση (3 φορές μετά την μεταφύτευση)
3. Φυτοπροστασία (2 ψεκασμοί)

2.2 Συλλογή των φύλλων

Η περίοδος συλλογής των φύλλων προσδιορίζεται με βάση τα μακροσκοπικά γνωρίσματα που συνίστανται:

- α) στην αλλαγή του πράσινου χρώματος σε ανοιχτό πράσινο ή κιτρινοπράσινο, με την καταστροφή της χλωροφύλλης και την αποκάλυψη των κίτρινων χρωστικών
- β) στην εμφάνιση λεπτών αδενώδους τρίχωσης στην επιφάνεια του φύλλου και
- γ) στην σχετικά εύκολη απόσπασή του φύλλου από το στέλεχος του φυτού.

Τα φύλλα ωριμάζουν και συλλέγονται διαδοχικά από κάτω προς τα πάνω, σύμφωνα με την θέση τους στο στέλεχος και η περίοδος συλλογής συμπίπτει με το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από την ωρίμανση των κατώτατων μέχρι την ωρίμανση των ανώτατων φύλλων.

2.2.1. ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΕΣ ΣΥΛΛΟΓΗΣ ΤΩΝ ΦΥΛΛΩΝ

Στην παρούσα εργασία, η περίοδος συλλογής άρχισε στις 10/07, 67 ημέρες μετά τη μεταφύτευση και ολοκληρώθηκε σε διάστημα 5 ημερών, ως εξής:

- 12/07/1995: συλλογή φύλλων χρόνου 1
14/07/1995: συλλογή φύλλων χρόνου 2
17/07/1995: συλλογή φύλλων χρόνου 3
17/07/1995: συλλογή φύλλων χρόνου 4

2.2.2. ΤΡΟΠΟΣ ΣΥΛΛΟΓΗΣ ΤΩΝ ΦΥΛΛΩΝ

Η συλλογή των φύλλων έγινε με το χέρι και τμηματικά σε επίπεδα «χέρια» ώστε τα φύλλα σε κάθε επίπεδο να έχουν τον ίδιο βαθμό ωρίμανσης, όταν τα κύτταρά τους βρίσκονται σε σπαργή.

- ΧΡΟΝΟΣ 1:** κατώτερα φύλλα
ΧΡΟΝΟΣ 2: αμέσως νεώτερα φύλλα
ΧΡΟΝΟΣ 3: μεσαία φύλλα, αμέσως κάτω από τα κορυφαία φύλλα
ΧΡΟΝΟΣ 4: κορυφαία φύλλα



2.2.3. ΑΡΜΑΘΙΑΣΜΑ ΦΥΛΛΩΝ

Τη μέρα της συλλογής ακολούθησε το αρμάθιασμα, δηλ. η τοποθέτησή τους σε ειδικό νήμα από κάνναβη και σε σταθερή απόσταση 2,5 – 3,5cm, από την βάση του μίσχου στην περιοχή του κεντρικού νεύρου.

Τα φύλλα των 4 φυτών της κάθε ομάδας και του κάθε χρόνου, τοποθετήθηκαν χωριστά σε ξύλινο πλαίσιο στο θερμοκήπιο της σχολής για να αποξηρανθούν.

2.2.4. ΧΡΟΝΟΙ ΑΠΟΞΗΡΑΝΣΗΣ ΤΩΝ ΦΥΛΛΩΝ

Η αποκαθίλωση των φύλλων έγινε, αφού ολοκληρώθηκε η αποξήρανση στον ήλιο (SUN – CURED) όλων των επιμέρους κατηγοριών, στις 27/07/1995. Έτσι, οι χρόνοι αποξήρανσης ήταν:

φύλλα χρόνου 1: 15 ημέρες

φύλλα χρόνου 2: 13 ημέρες

φύλλα χρόνου 3: 10 ημέρες

φύλλα χρόνου 4: 10 ημέρες

Ακολούθησε μέτρηση του ξηρού βάρους των φύλλων των φυτών των επιμέρους επιπέδων ωρίμανσης και ομάδων κάθε ποικιλίας και τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε ειδικούς φακέλους προς αποθήκευση.

Έξι μήνες αργότερα, αφού μεσολάβησε η φυσική ζύμωση των συλλεγόμενων φύλλων, τα δείγματα κόπηκαν από ειδικό καπνεργάτη του Αγρινίου σε μορφή καπνού τσιγάρου και αποθηκεύτηκαν σε σκιερό και ξηρό μέρος, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν για την μέτρηση των επιμέρους παραμέτρων (βαρέων μετάλλων, νικοτίνης, ολικού N, κ.λ.π.).

2.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΒΑΡΕΩΝ ΜΕΤΑΛΛΩΝ (Cd, Cr, Pb, Zn, Cu)

2.3.1 Προετοιμασία Δειγμάτων

1. Τοποθέτηση ~0,6gr δείγματος στον κλίβανο για 24h σε θερμοκρασία 80°C.
2. Λειοτριβήση δείγματος
3. Ζύγιση λειοτριβημένου δείγματος



2.3.2 Όργανα

Φασματοφωτόμετρο ατομικής απορρόφησης με φλόγα τύπου Perkin – Elmer Mod 560 του Εργαστήριο Πειραματικής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων.

2.3.3 Μέθοδοι

Ο προσδιορισμός των βαρέων μετάλλων έγινε με την φασματοφωτομετρική μέθοδο ατομικής απορρόφησης με τη μέθοδο φλόγας. Εφαρμόστηκαν τροποποιημένα οι αναλυτικές μέθοδοι A.A.S. της Perkin – Elmer κεφάλαια AY-5.

2.3.4 Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων

ΧΑΛΚΟΣ (Cu)

Πρότυπα διαλύματα για την καμπύλη αναφοράς παρασκευάστηκαν από το αρχικό πυκνό διάλυμα νιτρικού χαλκού Spectrosol, BDH Chemicals Ltd Poole England, περιεκτικότητας 1mg Cu ανά ml διαλύματος. Οι συγκεντρώσεις των προτύπων ήταν οι ακόλουθες:

S1: 5,0 µg/ml

S2: 15,0 µg/ml

S3: 30,0 µg/ml

Ρυθμίσεις λειτουργίας του οργάνου

Μήκος λειτουργίας : 324,8 nm

Εύρος σχισμής (slit): 0,7 nm

Πηγή φωτός : Λάμπα κοίλης καθόδου Cu

Φλόγα : Μείγμα ασετυλίνης – αέρα, οξειδωτική

Ευαισθησία : 0,09 µg/ml Cu για 1% απορρόφηση. Τα 5,0 µg/ml έχουν απορρόφηση 0,25 μονάδες.

ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΣ (Zn)

Πρότυπα διαλύματα για την καμπύλη αναφοράς παρασκευάστηκαν από το αρχικό πυκνό διάλυμα νιτρικού ψευδαργύρου Spectrosol, BDH Chemicals Ltd Poole England, περιεκτικότητας 1mg Zn ανά ml διαλύματος. Οι συγκεντρώσεις των προτύπων ήταν οι ακόλουθες:

S1: 5,0 µg/ml

S2: 1,5 µg/ml

S3: 3,0 µg/ml



Ρυθμίσεις λειτουργίας του οργάνου

Μήκος λειτουργίας : 213,9 nm
Εύρος σχισμής (slit): 0,7 nm
Πηγή φωτός : Λάμπα κοίλης καθόδου Zn
Φλόγα : Μείγμα ασετυλίνης – αέρα, οξειδωτική
Ευαισθησία : 0,018 µg/ml Zn για 1% απορρόφηση. Τα 5,0 µg/ml έχουν απορρόφηση 0,12 μονάδες.

ΜΟΛΥΒΔΟΣ (Pb)

Πρότυπα διαλύματα για την καμπύλη αναφοράς παρασκευάστηκαν από το αρχικό πυκνό διάλυμα νιτρικού μολύβδου Spectrosol, BDH Chemicals Ltd Poole England, περιεκτικότητας 1mg Pb ανά ml διαλύματος. Οι συγκεντρώσεις των προτύπων ήταν οι ακόλουθες:

S1: 5,0 µg/ml
S2: 20,0 µg/ml
S3: 40,0 µg/ml

Ρυθμίσεις λειτουργίας του οργάνου

Μήκος λειτουργίας : 283,3 nm
Εύρος σχισμής (slit): 0,7 nm
Πηγή φωτός : Λάμπα κοίλης καθόδου Pb
Φλόγα : Μείγμα ασετυλίνης – αέρα, οξειδωτική
Ευαισθησία : 0,01 µg/ml Pb για 1% απορρόφηση. Τα 20,0 µg/ml έχουν απορρόφηση 0,18 μονάδες.

ΚΑΔΜΙΟ (Cd)

Πρότυπα διαλύματα για την καμπύλη αναφοράς παρασκευάστηκαν από το αρχικό πυκνό διάλυμα νιτρικού καδμίου Spectrosol, BDH Chemicals Ltd Poole England, περιεκτικότητας 1mg Cd ανά ml διαλύματος. Οι συγκεντρώσεις των προτύπων ήταν οι ακόλουθες:

S1: 1,0 µg/ml
S2: 2,0 µg/ml
S3: 4,0 µg/ml

Ρυθμίσεις λειτουργίας του οργάνου

Μήκος λειτουργίας : 228,8 nm
Εύρος σχισμής (slit): 0,7 nm
Πηγή φωτός : Λάμπα κοίλης καθόδου Pb
Φλόγα : Μείγμα ασετυλίνης – αέρα, οξειδωτική
Ευαισθησία : 0,025 µg/ml Cd για 1% απορρόφηση. Τα 2,0 µg/ml έχουν απορρόφηση 0,35 μονάδες.



ΧΡΩΜΙΟ (Cr)

Πρότυπα διαλύματα για την καμπύλη αναφοράς παρασκευάστηκαν από το αρχικό πυκνό διάλυμα νιτρικού χρωμίου Spectrosol, BDH Chemicals Ltd Poole England, περιεκτικότητας 1mg Cr ανά ml διαλύματος. Οι συγκεντρώσεις των προτύπων ήταν οι ακόλουθες:

S1: 2 $\mu\text{g/ml}$

S2: 4 $\mu\text{g/ml}$

S3: 8 $\mu\text{g/ml}$

Ρυθμίσεις λειτουργίας του οργάνου

Μήκος λειτουργίας : 357,9 nm

Εύρος σχισμής (slit): 0.7 nm

Πηγή φωτός : Λάμπα κοίλης καθόδου Cr

Φλόγα : Μείγμα ασετυλίνης-αέρα, αναγωγική

Ευαισθησία : 0,1 $\mu\text{g/ml}$ για 1% απορρόφηση. Τα 2 $\mu\text{g/ml}$ Cr έχουν περίπου απορρόφηση 0,1 μονάδες.

2.3.5 Όξινη Πέψη Φυτικών ιστών

Το ζυγισμένο και λειοτριβημένο δείγμα αποξηραμένου φυτικού ιστού τοποθετήθηκε σε κωνική φιάλη των 100ml με 10ml δισ-απεσταγμένου νερού. Προστέθηκαν 4ml πυκνού HNO_3 και 4ml πυκνού HClO_4 (Merck, Sympur) και το δείγμα αφέθηκε για 18h σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στην συνέχεια, η κωνική φιάλη με το οξυνισμένο δείγμα τοποθετήθηκε σε αμμόλουτρο 180°C μέχρι το διάλυμα να γίνει εντελώς διαυγές. Το διαυγές διάλυμα μεταφέρθηκε μετά σε ποτηράκια ζέσεως των 50ml.

2.3.6 Διήθηση

Προκειμένου να επιτευχθεί διαχωρισμός της στερεάς από την υγρή φάση, πραγματοποιήθηκε διήθηση με την βοήθεια φίλτρων κυτταρίνης 0,45 μm .

Πρώτα έγινε λήψη του διαλύματος που είχε προκύψει μετά την όξινη πέψη, με σύριγγα μιας χρήσεως των 10ml.

Η σύριγγα εφαρμόστηκε στην ειδική υποδοχή του φίλτρου, και ακολούθησε διήθηση σταγόνα – σταγόνα, ενώ τα στερεά υπολείμματα απομακρύνθηκαν από τα τοιχώματα της κωνικής φιάλης με δισ-απεσταγμένο H_2O .

Το διάλυμα μεταφέρθηκε σε πλαστικό φιαλίδιο των 100ml και συμπληρώθηκε μέχρι τα 10ml με δισ-απεσταγμένο νερό.



2.3.7 Αραιώσεις

Για τις μετρήσεις των συγκεντρώσεων των βαρέων μετάλλων Cu, Cd, Cr και Pb, χρησιμοποιήθηκε το παραπάνω διάλυμα, χωρίς επιπλέον αραιώση. Για τη μέτρηση της συγκέντρωσης Zn ακολούθησε μεγαλύτερη αραιώση, ανάλογα με τις τιμές απορρόφησης.

2.3.8 Υπολογισμοί συγκεντρώσεων των μετάλλων

Για τον σχηματισμό της καμπύλης αναφοράς του κάθε μετάλλου χρησιμοποιήθηκαν τα αντίστοιχα πρότυπα (όπως έχουν αναφερθεί παραπάνω). Ο υπολογισμός της τελικής συγκέντρωσης του μετάλλου έγινε βάσει του τύπου:

$$\text{Μέταλλο} (\mu\text{g} / \text{gr}) = \frac{(\mu\text{g} / \text{ml} \text{ διαλύματος}) \times (\text{όγκος διαλύματος σε ml})}{(\text{βάρος δείγματος σε gr})}$$

2.4 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΩΝ ΑΛΚΑΛΟΕΙΔΩΝ (ΩΣ ΝΙΚΟΤΙΝΗ) ΣΤΟΝ ΚΑΠΝΟ (CORESTA STANDARD METHOD)

2.4.1 Προετοιμασία δειγμάτων

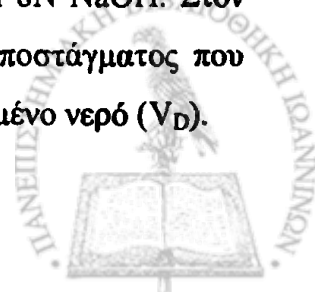
1. Ξήρανση δείγματος στον κλίβανο σε θερμοκρασία μέχρι 40°C.
2. Λειοτρίβηση δείγματος και κοσκίνισμα σε κόσκινο μεγέθους 500μm.
3. Ζύγιση 1g λειοτριβημένου δείγματος.

2.4.2 Όργανα

- Συσκευή αποστάξεως (ISO 3401)
- Φασματοφωτόμετρο υπεριώδους (μήκος κύματος 230-290nm)

2.4.3 Απόσταξη

1g δείγματος κονιοποιημένου καπνού μεταφέρθηκε σε φιάλη απόσταξης Kjeldahl 250ml. Προστέθηκαν 25ml αποσταγμένο νερό, 20-40gr NaCl και 5ml 8N NaOH. Στον υποδοχέα προστέθηκαν 15ml 2N H₂SO₄. Συλλέχθηκαν 220-230ml αποστάγματος που μεταφέρθηκαν σε φιάλη 250ml και συμπληρώθηκε ο όγκος με αποσταγμένο νερό (V_D).



2.4.4. Φασματοφωτομέτρηση

Από τον όγκο V_D μετά από καλή ανακίνηση της φιάλης, ελήφθη όγκος $V_v = 25\text{ml}$ που μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη 100ml και ο όγκος συμπληρώθηκε μέχρι την χαραγή με 0,05N H_2SO_4 . Η φιάλη ανακινήθηκε καλά (όγκος $V_M=100\text{ml}$).

Ακολούθησε μέτρηση της απορρόφησης του διαλύματος σε μήκος κύματος 236nm (A_{236}), 259nm (A_{259}) και 282nm (A_{282}), ως προς το διάλυμα αναφοράς (10ml διάλυμα 2N H_2SO_4 διαλυμένο σε 250ml H_2O).

Η επί % περιεκτικότητα των αλκαλοειδών (ως Νικοτίνη) επί ξηρού υπολογίστηκε από τον τύπο:

$$\text{Νικοτίνη \%} = \frac{100 * A * V_D * V_M}{\alpha * V_v * d * t \left(\frac{100 - b}{100} \right)} \quad \text{όπου}$$

A = ακριβής απορρόφηση υπολογισμένη από τον τύπο:

$$A = 1,059 \left[A_{259} - \frac{A_{236} + A_{282}}{2} \right]$$

V_D = όγκος αποστάγματος = 250ml

V_M = όγκος του αραιωμένου διαλύματος = 100ml

α = απορροφητικότητα νικοτίνης σε διάλυμα 0,05N H_2SO_4 σε μέγιστο μήκος κύματος 259nm = 34,3

V_v = όγκος που λαμβάνεται για αραιώση = 25ml

d = μήκος κυψελίδας (cm) = 1

t = βάρος δείγματος = 1gr

b = % υγρασία δείγματος

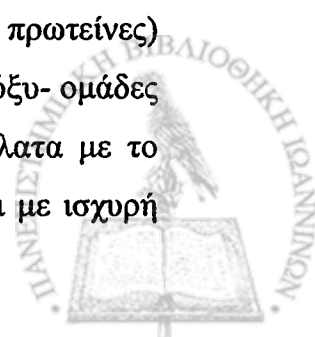
2.5 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΟΥ ΑΖΩΤΟΥ ΣΤΟΝ ΚΑΠΝΟ (ΜΕΘΟΔΟΣ KJELDAHL)

AOAC official method 955,4

(Βελτιωμένη Μέθοδος Kjeldahl για δείγματα περιέχοντα νιτρικές ενώσεις).

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος Kjeldahl βασίζεται στην οξείδωση με H_2SO_4 των αζωτούχων οργανικών ενώσεων. Το άζωτο των αμιδικών ή αμινικών ενώσεων (πρωτεΐνες) οξειδώνεται πλήρως σε αμμωνιακό άλας και τα νιτρικά άλατα, οι αζω- ή αζωόξυ- ομάδες όπως και οι ετεροκυκλικές αζωτούχες ενώσεις ανάγονται σε αμμωνιακά άλατα με το υποθειώδες νάτριο και το σαλικυλικό οξύ. Τα αμμωνιακά άλατα διασπώνται με ισχυρή



βάση και η αμμωνία που ελευθερώνεται δεσμεύεται με διάλυμα HCl. Στην συνέχεια, για τον προσδιορισμό της αμμωνίας, η περίσσεια του οξέως επανατιτλοδοτείται με ισχυρή βάση.

2.5.1 Αντιδραστήρια

- Διάλυμα H_2SO_4 (93 – 98%)
- Σαλικυλικό οξύ
- Διάλυμα HCl 0,1N
- Διάλυμα NaOH 0,1N
- Διάλυμα $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (80g σε 1lit)
- Δείκτης Bromkresol – green – Methyl red
- Μεταλλικός υδράργυρος
- K_2SO_4
- Κόκκοι ψευδάργυρου
- Διάλυμα NaOH + $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
(1kg NaOH + 50g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ σε 2lit με H_2O)

2.5.2 Όργανα

- α) Συσκευή ζέσεως
- β) Συσκευή αποστάξεως

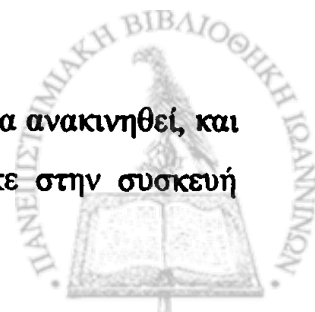
2.5.3 Προετοιμασία δείγματος

1gr σκόνης καπνού τοποθετήθηκε σε φιάλη Kjeldahl όγκου 500 – 800ml και προστέθηκαν 40ml H_2SO_4 που περιείχε 2 gr σαλικυλικού οξέως.

Η φιάλη ανακινήθηκε καλά και αφού αφέθηκε για 30', προστέθηκαν 5gr $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, ανακινήθηκε ξανά και τοποθετήθηκε στην συσκευή ζέσεως στην αρχή σε χαμηλή θερμοκρασία και κατόπιν στους 100°C. Αφού το δείγμα έγινε διαυγές κλείστηκε το ηλεκτρικό και η φιάλη αφέθηκε για 10' να φύγουν οι ατμοί. Στην συνέχεια προστέθηκαν 15gr K_2SO_4 με 1 σταγόνα μεταλλικού Hg ($\approx 0,65\text{gr}$), και το δείγμα έβρασε μέχρι να γίνει διαυγές ενώ η θερμοκρασία ανέβηκε στους 100°C και ο βρασμός συνεχίστηκε για 30' επιπλέον. Στην συνέχεια τοποθετήθηκε στον απαγωγό, προστέθηκαν 250ml απεσταγμένο H_2O και ανακινήθηκε καλά.

2.5.4 Απόσταξη

Στην φιάλη αποστάξεως προστέθηκαν μερικοί κόκκοι Zn, χωρίς να ανακινήθει, και 90ml διαλύματος NaOH - $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Η φιάλη τοποθετήθηκε στην συσκευή



αποστάξεως και μέσω του συμπυκνωτή συνδέθηκε με τον υποδοχέα συλλογής της αμμωνίας. Στον υποδοχέα προστέθηκαν 25ml 0,1N HCl και δύο σταγόνες Bromkresol – green – Methyl red. Η φιάλη ανακινήθηκε μέχρι ομογενοποίησης και ακολούθησε η απόσταξη. Στον υποδοχέα συλλέχθηκαν 150-200ml αποστάγματος και η περίσσεια του οξέος ογκομετρήθηκε με 0,1N NaOH. Από τον όγκο του χρησιμοποιούμενου οξέως υπολογίστηκε η % συγκέντρωση του ολικού αζώτου.

2.5.5 Υπολογισμός ολικού αζώτου (%)

Ο υπολογισμός του ολικού αζώτου έγινε βάσει του τύπου =

$$\begin{aligned} \text{Αζωτο \%} &= [(ml \text{ standard διαλύματος } HCl \times \text{κανονικότητα οξέως}) - \\ &- (ml \text{ standard διαλύματος } NaOH \times \text{κανονικότητα } NaOH)] \\ &\times 1,4007 / \text{gδείγματος} = [(25ml \times 0,1N - \\ &ml \text{ διαλύματος } NaOH \times 0,1N)] \times 1,4007 / \text{gδείγματος} \end{aligned}$$

2.6 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΙΟΝΤΩΝ (NO_3^-) ΣΤΟΝ ΚΑΠΝΟ

2.6.1 Όργανα

1. Συσκευή χρωματογραφίας ιόντων που περιλάμβανε:
 - α) Χρωματογράφο ιόντων Metrohm 690 Ion Chromatograph.
 - β) Αντλία Metrohm 697 Ion Chromatograph Pump.
 - γ) Ολοκληρωτή Schimatzu C – R 5A Chromatorac.

Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν:

2. I.C. Anion Column PRP – x100 για προσδιορισμό ανιόντων.
3. Ζυγός ακριβείας Mettler τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (Mettler H10 TW).
4. Τρεις μαγνητικοί αναδευτήρες.

2.6.2 Αντιδραστήρια

1. Κρυσταλλικό φθαλικό οξύ ($C_8H_6O_4$) της Merck.
2. Κρυσταλλικό νιτρικό νάτριο ($NaNO_3$) της Merck.
3. Διάλυμα νιτρικού οξέος (HNO_3) 14N της Merck.
4. Κρυσταλλικό καυστικό νάτριο ($NaOH$) της Merck.



2.6. 3 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ

1. Εκλουστικό διάλυμα για τον προσδιορισμό των ανιόντων.

Το διάλυμα παρασκευάστηκε σύμφωνα με τις οδηγίες της Metrohm. Ζυγίστηκαν 3,323gr φθαλικού οξέος και προστέθηκαν σε 950 ml απεσταγμένο νερό μαζί με 2 ml NaOH 30% και 10 ml ακετόνη, για την παρασκευή διαλύματος 2 m mol/l φθαλικού οξέος με 5% ακετόνη και pH = 5. Το διάλυμα θερμάνθηκε προκειμένου να διαλυθεί το φθαλικό οξύ και ακολούθως έγινε ρύθμιση του pH στο 4.5 με διάλυμα NaOH 1 mol/l. Ακολούθως το διάλυμα συμπληρώθηκε με απεσταγμένο νερό σε ογκομετρική φιάλη ως το 1L. Από το διάλυμα αυτό λαμβάνονταν κάθε φορά προς παρασκευή 1l εκλουστικού διαλύματος 100 ml και προστίθονταν 50 ml ακετόνης και 850 ml απεσταγμένου νερού, οπότε ακολουθούσε απαέρωση και διήθηση για την παρασκευή του τελικού διαλύματος που χρησιμοποιήθηκε ως εκλουστικό στον προσδιορισμό των ανιόντων.

2. Παρασκευή διαλύματος αναφοράς (standard).

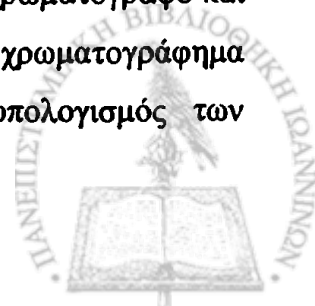
Για την βαθμονόμηση του ολοκληρωτή παρασκευάστηκε διάλυμα αναφοράς με 10 ppm NO_3^- .

3. Διάλυμα αναγέννησης στήλης ανιόντων.

Για την αναγέννηση της στήλης προσδιορισμού των ανιόντων χρησιμοποιήθηκε διάλυμα 10 ml HNO_3 6N σε 1 lt μεθανόλης. Το νιτρικό οξύ 6N παρασκευάστηκε με αραίωση από διάλυμα HNO_3 14N. Η ροή του διαλύματος διαμέσου της στήλης ήταν 0,5 ml/min για δύο περίπου ώρες.

2.6.4 Προσδιορισμός ανιόντων

Ζυγίστηκε 1gr καπνού και προστέθηκαν 1000 ml απεσταγμένου νερού με σιφόνιο ακριβείας. Ακολούθως το διάλυμα αναδευόταν σε μαγνητικό αναδευτήρα για 30 λεπτά. Στην συνέχεια γινόταν διήθηση του δείγματος μέσα από μεμβράνη κελουλόζης με διάμετρο πόρων 0,45μm. Κατόπιν γινόταν έγχυση του δείγματος στον χρωματογράφο και η ανάλυση διαρκούσε 17 λεπτά, οπότε τα αποτελέσματα καθώς και το χρωματογράφημα δινόταν αμέσως από τον ολοκληρωτή. Η καταγραφή και ο υπολογισμός των περιεχόμενων ιόντων ξεκινούσε την στιγμή της έγχυσης του δείγματος.



2.7 Στατιστική ανάλυση

Ο έλεγχος της περιεκτικότητας των διαφόρων μετάλλων καθώς και της νικοτίνης, του αζώτου και των νιτρικών μεταξύ των ποικιλιών των διαφορετικών pH, των διαφόρων ομάδων υποστρώματος και χρόνων συλλογής έγινε με Kruskal-Wallis ανάλυση διακύμανσης και Mann-Whitney U test.

Οι διαφορές θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές από το επίπεδο του 5% ($p < 0.05$). Για τις συσχετίσεις μεταξύ νικοτίνης και μετάλλων καθώς και των μετάλλων μεταξύ τους, χρησιμοποιήθηκε ο δείκτης Spearman.



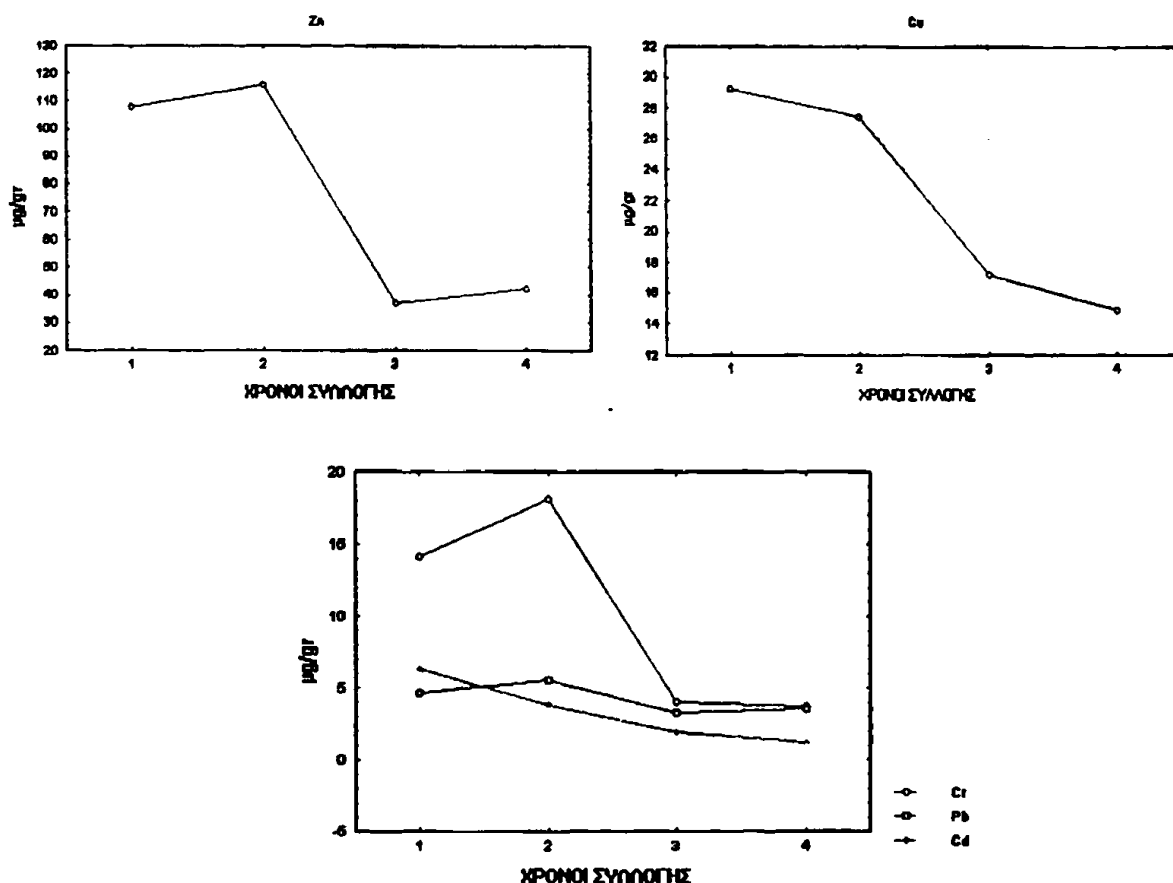
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Μέταλλα

3.1.1. ΕΠΙΠΕΔΑ ΜΕΤΑΛΛΩΝ ΣΤΟΝ ΚΑΠΝΟ ΣΥΝΑΡΤΗΣΕΙ ΧΡΟΝΟΥ ΣΥΛΛΟΓΗΣ ΚΑΙ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ

α) ΠΟΙΚΙΛΙΑ Ι – pH 1 (όξινο)

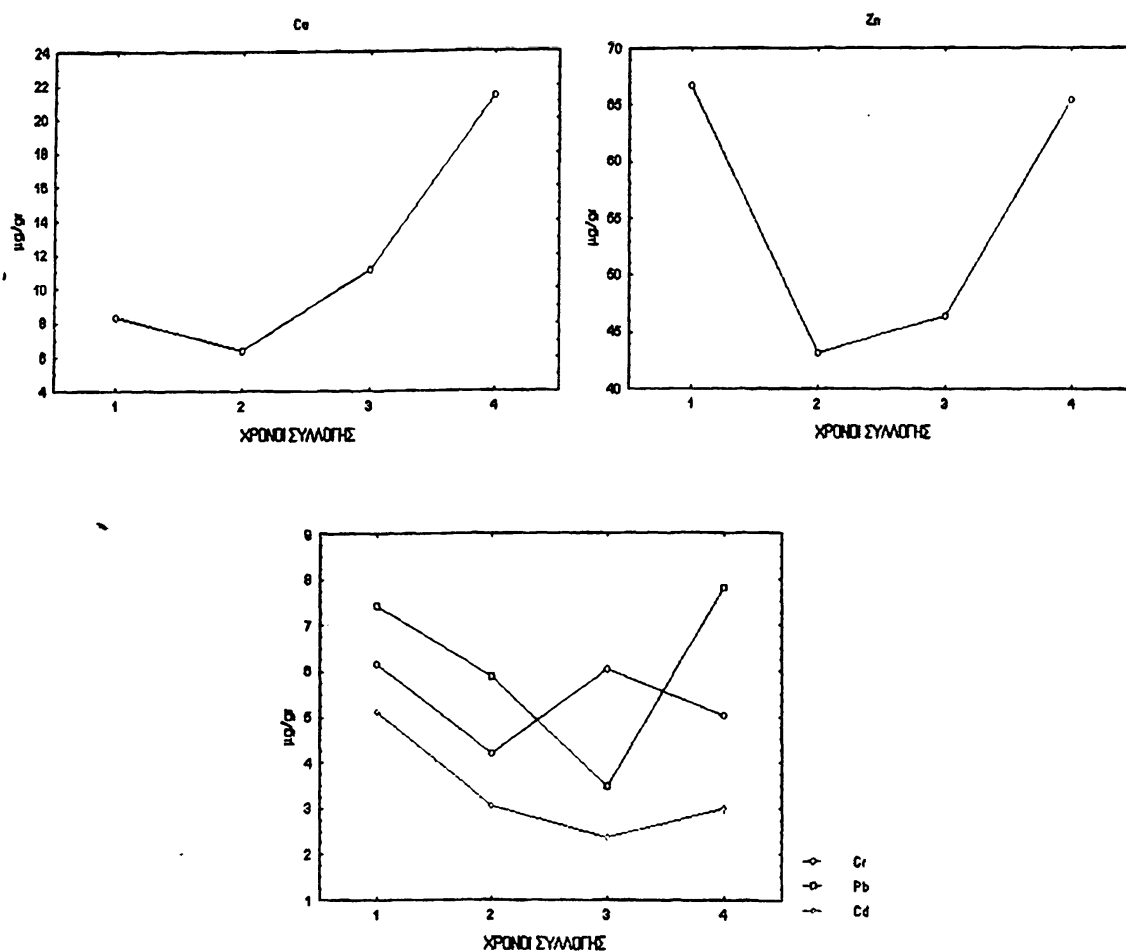
Στην Ποικιλία Ι σε συνθήκες pH 1, από την ανάλυση διακύμανσης προέκυψαν σημαντικές διαφορές ($p \leq 0,02$) στις συγκεντρώσεις όλων των μετάλλων μεταξύ των διαφόρων χρόνων συλλογής των φύλλων σε κάθε ομάδα διαφορετικού υποστρώματος.



Εικ. 3.1. Ποικ. Ι- pH 1- ομάδα 0%: Μεταβολές των Zn, Cu, Cr, Pb, Cd συναρτήσει του χρόνου συλλογής των φύλλων.

Στην ομάδα υποστρώματος με 0% αναλογία λάσπης (εικ.3.1), οι μικρότερες μέσες τιμές των Cr, Cu και Cd (3,736 μg/g, 14,843 μg/g και 1,251 μg/g αντίστοιχα) παρατηρούνται στα νεώτερα φύλλα (χρόνος 4), ενώ για τα Pb και Zn οι μικρότερες μέσες τιμές (3,234 μg/g και 36,786 μg/g) εμφανίζονται στα φύλλα της αμέσως προηγούμενης συλλογής (χρόνος 3). Οι μέγιστες συγκεντρώσεις των Zn, Cr και Pb (115,818 μg/g, 18,102 μg/g και 5,479 μg/g αντίστοιχα) παρατηρούνται στον δεύτερο χρόνο συλλογής

(χρόνος 2), ενώ των **Cu** και **Cd** (29,184 $\mu\text{g/g}$ και 6,301 $\mu\text{g/g}$ αντίστοιχα) στον πρώτο χρόνο συλλογής (χρόνος 1).

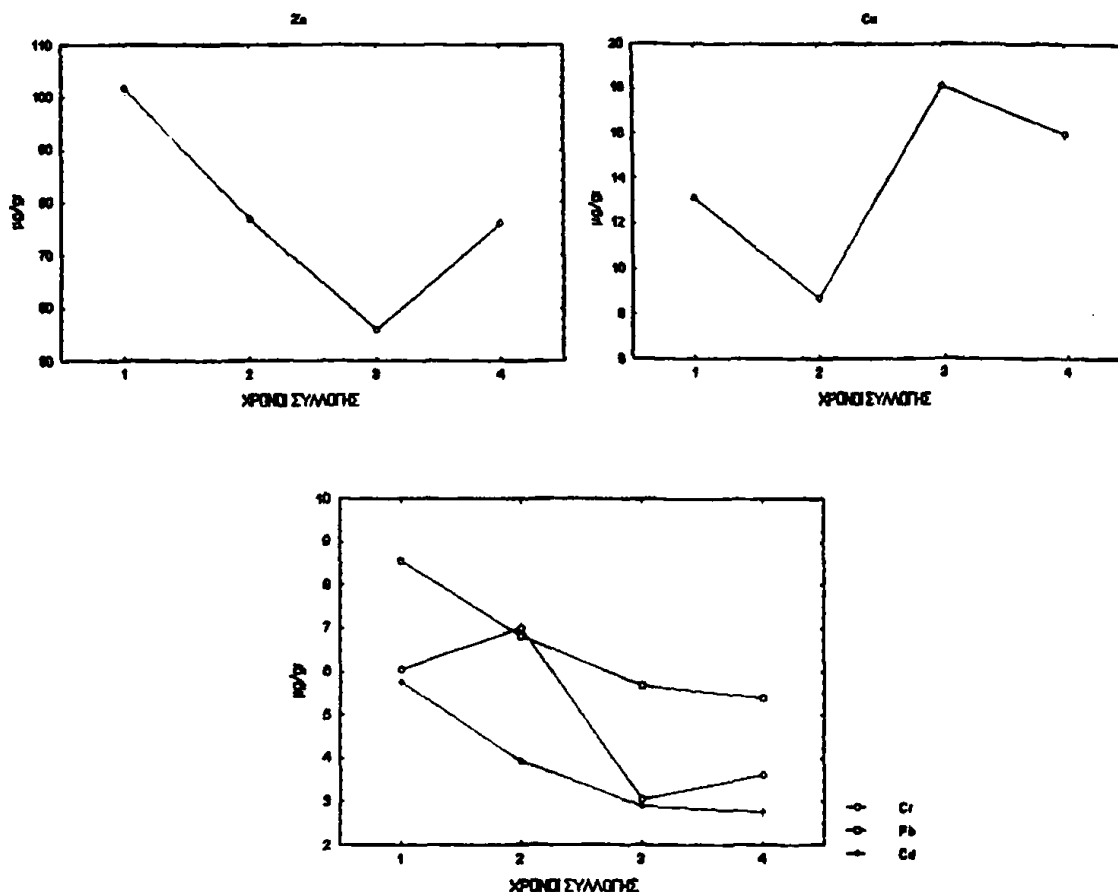


Εικ. 3.2. Ποικ. I-pH 1- ομάδα 10%: Μεταβολές των Zn, Cu, Cr, Pb, Cd συναρτήσει του χρόνου συλλογής των φύλλων.

Στην ομάδα φυτών που αναπτύχθηκαν σε έδαφος εμπλουτισμένο με 10% αναλογία λάσπης (ομάδα 10%), οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις των Zn, Cr και Cu (43,171 $\mu\text{g/g}$, 4,207 $\mu\text{g/g}$ και 6,343 $\mu\text{g/g}$ αντίστοιχα) εμφανίζονται στον δεύτερο χρόνο συλλογής, ενώ για τα Pb και Cd (3,465 $\mu\text{g/g}$ και 2,372 $\mu\text{g/g}$ αντίστοιχα) στον χρόνο 3. Οι κατώτερες τιμές των Pb, Cd, Cr και Zn της ομάδας 10% είναι ελαφρά αυξημένες σε σχέση με τις κατώτερες μέσες τιμές της ομάδας 0%. Ωστόσο, η ελάχιστη συγκέντρωση του Cu είναι σημαντικά μειωμένη σε σχέση με την αντίστοιχη της προηγούμενης ομάδας.

Τα γηραιότερα φύλλα (χρόνος 1) συσσωρεύουν κυρίως Zn, Cr και Cd, ενώ τα νεώτερα φύλλα (χρόνος 4) κυρίως Pb και Cu (εικ.3.2).

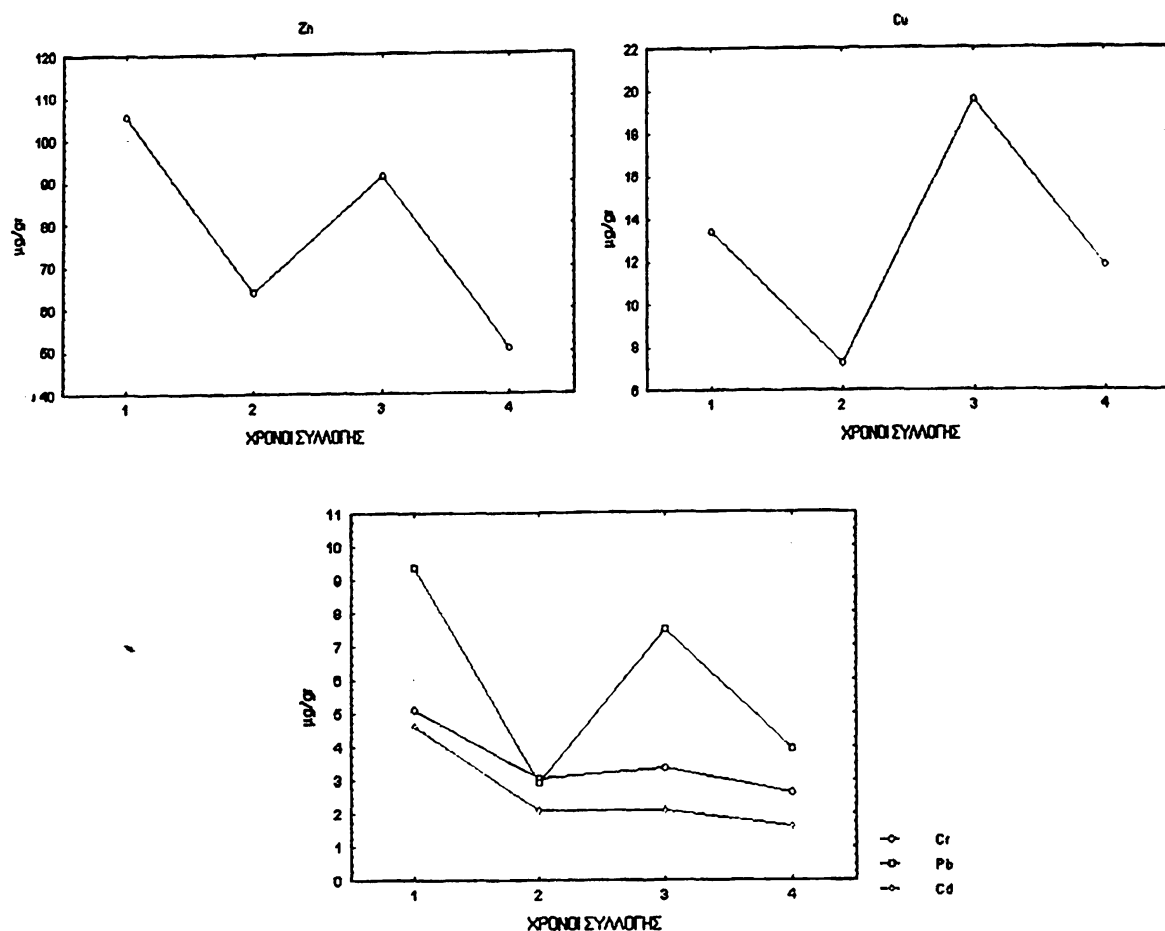




Εικ. 3.3. Ποικ. Ι- pH 1- ομάδα 20% : Μεταβολές των Zn, Cu, Cr, Pb, Cd συναρτήσει του χρόνου συλλογής των φύλλων.

Στην ομάδα φυτών που αναπτύχθηκαν σε όξινο έδαφος εμπλουτισμένο με 20% λάσπη (ομάδα 20%), οι μικρότερες μέσες τιμές των Zn και Cr (55,959 μg/g και 3,034 μg/g αντίστοιχα) παρατηρούνται στην τρίτη συλλογή (χρόνος 3), ενώ των Pb και Cd (5,382 μg/g και 2,745 μg/g αντίστοιχα) στα νεώτερα φύλλα (χρόνος 4). Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις των Zn, Pb και Cd (101,636 μg/g, 8,551 μg/g και 5,748 μg/g αντίστοιχα) εμφανίζονται στα γηραιότερα φύλλα (χρόνος 1). Στην ομάδα 20% παρατηρούνται αυξημένες τιμές Zn, Cu και Pb σε σχέση με την ομάδα όπου η αναλογία λάσπης βιολογικού καθαρισμού ήταν 10%, ενώ θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι μέσες τιμές των Cd και Cr φαίνεται ότι δεν επηρεάζονται από την αυξημένη συγκέντρωση λάσπης (εικ.3.3).

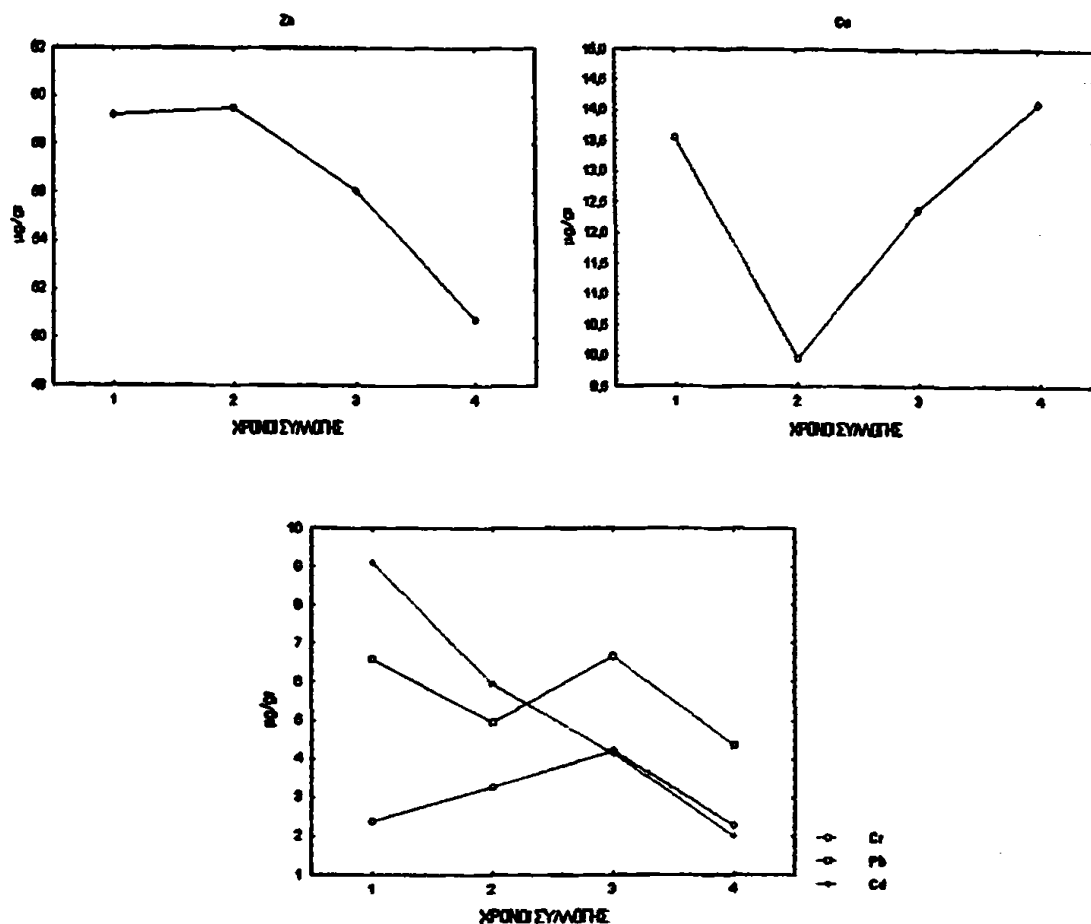




Εικ. 3.4. Ποικ. I-pH 1- ομάδα 40%: Μεταβολές των Zn, Cu, Cr, Pb, Cd συναρτήσει του χρόνου συλλογής των φύλλων.

Στην ομάδα υποστρώματος όπου η αναλογία λάσπης ήταν 40% (ομάδα 40%) (εικ.3.4) παρατηρούμε ότι οι μικρότερες μέσες τιμές Zn, Cr και Cd (50,473 $\mu\text{g/g}$, 2,626 $\mu\text{g/g}$ και 1,628 $\mu\text{g/g}$ αντίστοιχα) εμφανίζονται στον τέταρτο χρόνο συλλογής (νεώτερα φύλλα), ενώ ο Cu και ο Pb ακολουθώντας διαφορετική κινητική στο φυτό σημειώνουν τις ελάχιστες συγκεντρώσεις στον χρόνο 2 (7,239 $\mu\text{g/g}$ και 2,908 $\mu\text{g/g}$ αντίστοιχα). Οι μέγιστες μέσες τιμές για τα Zn, Cr, Pb και Cd (105,460 $\mu\text{g/g}$, 5,089 $\mu\text{g/g}$ και 9,366 $\mu\text{g/g}$ και 4,621 $\mu\text{g/g}$ αντίστοιχα) εμφανίζονται στα γηραιότερα φύλλα (χρόνος 1).

Επίσης παρατηρούμε ότι στην ομάδα 40% οι κατώτερες συγκεντρώσεις όλων των μετάλλων είναι σε χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές της ομάδας 20%.

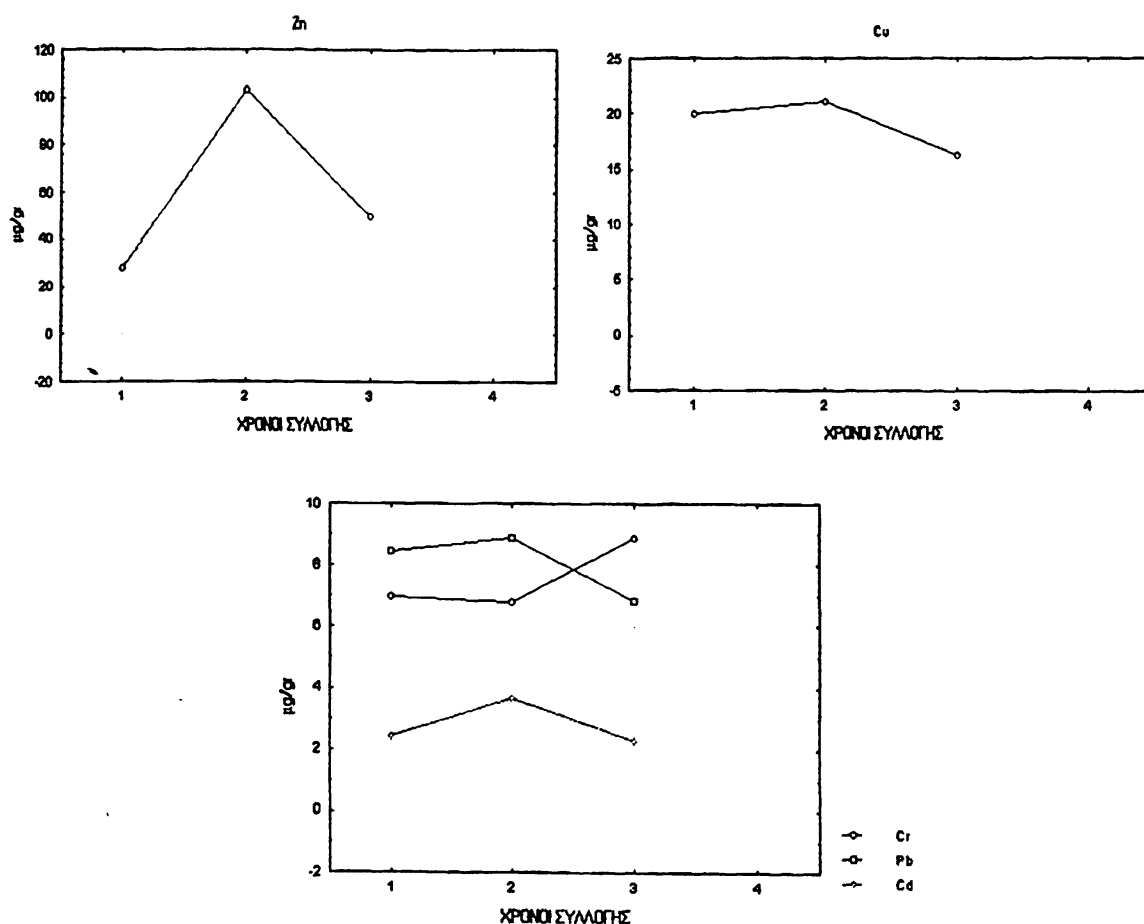


Εικ. 3.5. Ποικ. I-pH 1- ομάδα ΑΛ : Μεταβολές των Zn, Cu, Cr, Pb, Cd συναρτήσει του χρόνου συλλογής των φύλλων.

Στην τελευταία ομάδα υποστρώματος όπου χρησιμοποιήθηκε ανόργανη λίπανση (ομάδα ΑΛ) (εικ.3.5), παρατηρούμε ότι οι ελάχιστες μέσες τιμές των Zn, Cr, Pb και Cd εντοπίζονται στα νεώτερα φύλλα (χρόνος 4) και είναι αντίστοιχα 50,712 μg/g, 2,266 μg/g, 4,340 μg/g και 1,989 μg/g. Ο Cu συνεχίζει να παρουσιάζει και σε αυτήν την ομάδα ελάχιστη μέση τιμή στον δεύτερο χρόνο συλλογής (χρόνος 2). Η μέγιστη μέση τιμή του Cd (9,110 μg/g) εμφανίζεται στα γηραιότερα φύλλα (χρόνος 1). Στην ομάδα ΑΛ, ο Zn εμφανίζεται σημαντικά μειωμένος και το Cd σημαντικά αυξημένο σε σχέση με την ομάδα με 40% λάσπη.

β) ΠΟΙΚΙΛΙΑ Ι – pH 2

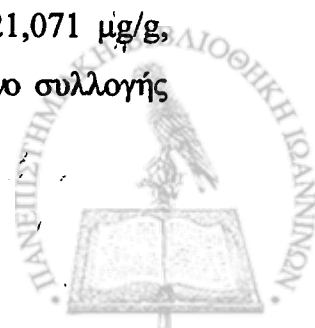
Στην Ποικιλία Ι σε συνθήκες pH 2, από την ανάλυση διακύμανσης προέκυψαν στατιστικές διαφορές ($p \leq 0,046$) στις συγκεντρώσεις όλων των μετάλλων σε κάθε ομάδα υποστρώματος μεταξύ των διαφόρων χρόνων συλλογής των φύλλων.

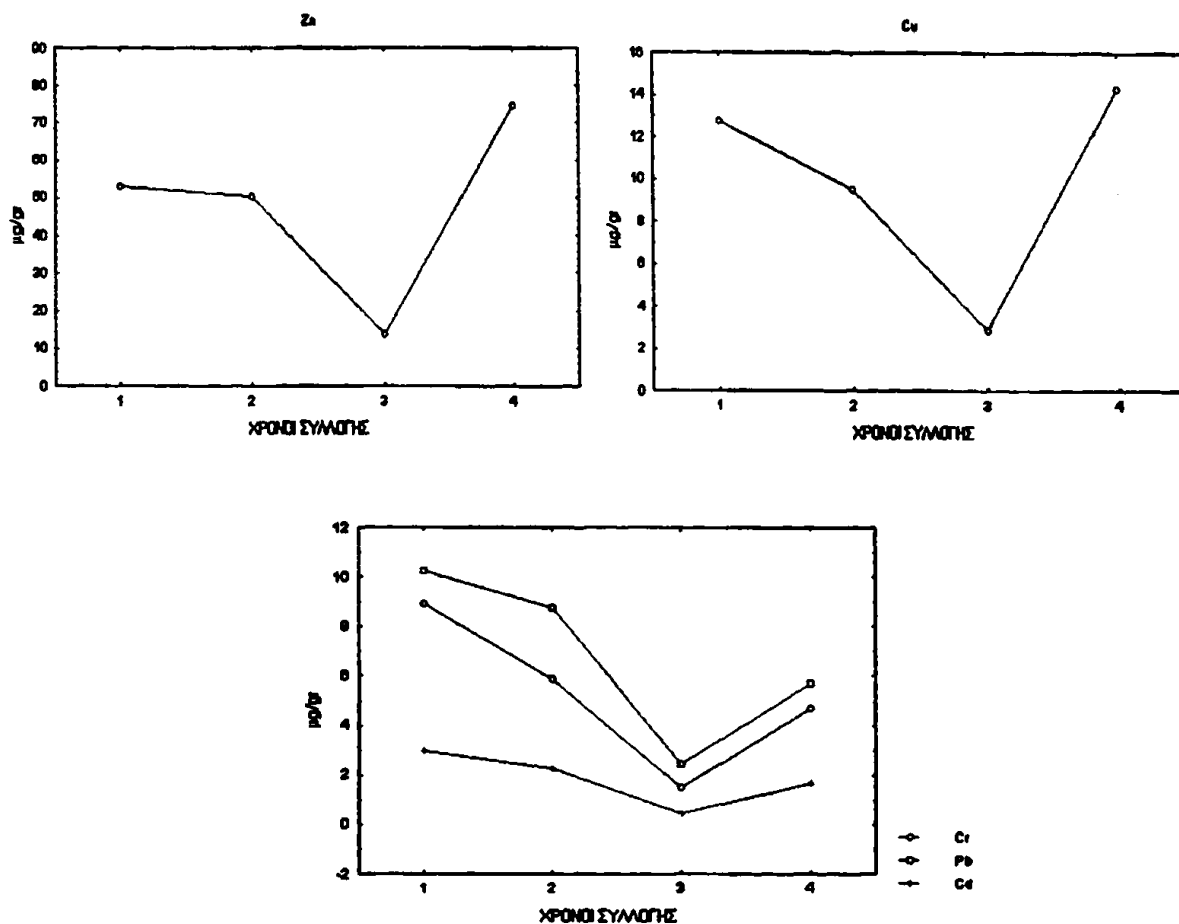


Εικ. 3.6. Ποικ. Ι- pH 2- ομάδα 0%: Μεταβολές των Zn, Cu, Cr, Pb, Cd συναρτήσει του χρόνου συλλογής των φύλλων.

Στην ομάδα 0% (έδαφος χωρίς οργανική ή ανόργανη λίπανση) (εικ.3.6) οι μικρότερες μέσες τιμές για τα Pb, Cu και Cd (6,834 $\mu\text{g/g}$, 16,186 $\mu\text{g/g}$ και 2,248 $\mu\text{g/g}$ αντίστοιχα) παρατηρούνται στα φύλλα τρίτης συλλογής (χρόνος 3), ενώ οι μικρότερες συγκεντρώσεις των Zn (27,659 $\mu\text{g/g}$) και Cr (6,780 $\mu\text{g/g}$) εμφανίζονται σε γηραιότερα φύλλα (χρόνος 1 και χρόνος 2 αντίστοιχα).

Οι μέγιστες συγκεντρώσεις των Pb, Cu, Cd και Zn (8,877 $\mu\text{g/g}$, 21,071 $\mu\text{g/g}$, 3,625 $\mu\text{g/g}$ και 102,676 $\mu\text{g/g}$ αντίστοιχα) παρατηρούνται στον δεύτερο χρόνο συλλογής (χρόνος 2).



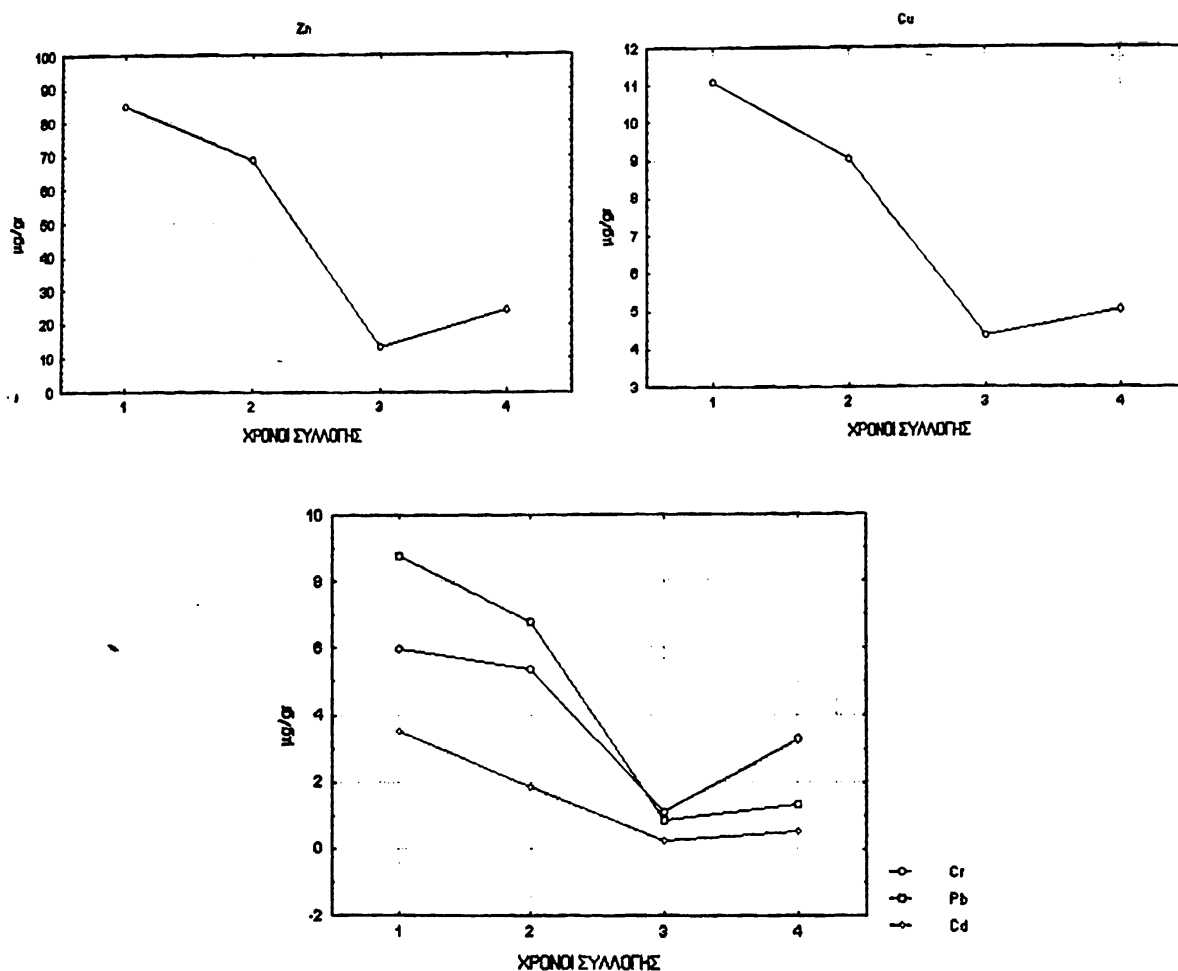


Εικ. 3.7. Ποικ. Ι- pH 2- ομάδα 10% : Μεταβολές των Zn, Cu, Cr, Pb, Cd συναρτήσει του χρόνου συλλογής των φύλλων.

Στην ομάδα των φυτών που αναπτύχθηκαν σε έδαφος αναμιγμένο με λάσπη σε αναλογία 10% (εικ.3.7), οι μικρότερες τιμές όλων των μετάλλων (Zn, Cr, Pb, Cu και Cd) παρατηρούνται στον τρίτο χρόνο συλλογής (χρόνος 3) (13,880 μg/g, 1,488 μg/g, 2,406 μg/g, 2,823 μg/g και 0,429 μg/g αντίστοιχα). Οι μέγιστες μέσες τιμές των Cr, Pb και Cd (8,928 μg/g, 10,230 μg/g και 2,991 μg/g αντίστοιχα) εμφανίζονται στα γηραιότερα φύλλα (χρόνος 1), ενώ των Zn και Cu (74,827 μg/g και 14,295 μg/g αντίστοιχα) στα νεώτερα φύλλα.

Οι ελάχιστες συγκεντρώσεις όλων των μετάλλων είναι σημαντικά μικρότερες στην ομάδα 10% σε σχέση με τις αντίστοιχες στην ομάδα 0% όπου δεν έγινε πρόσθεση οργανικής ουσίας.

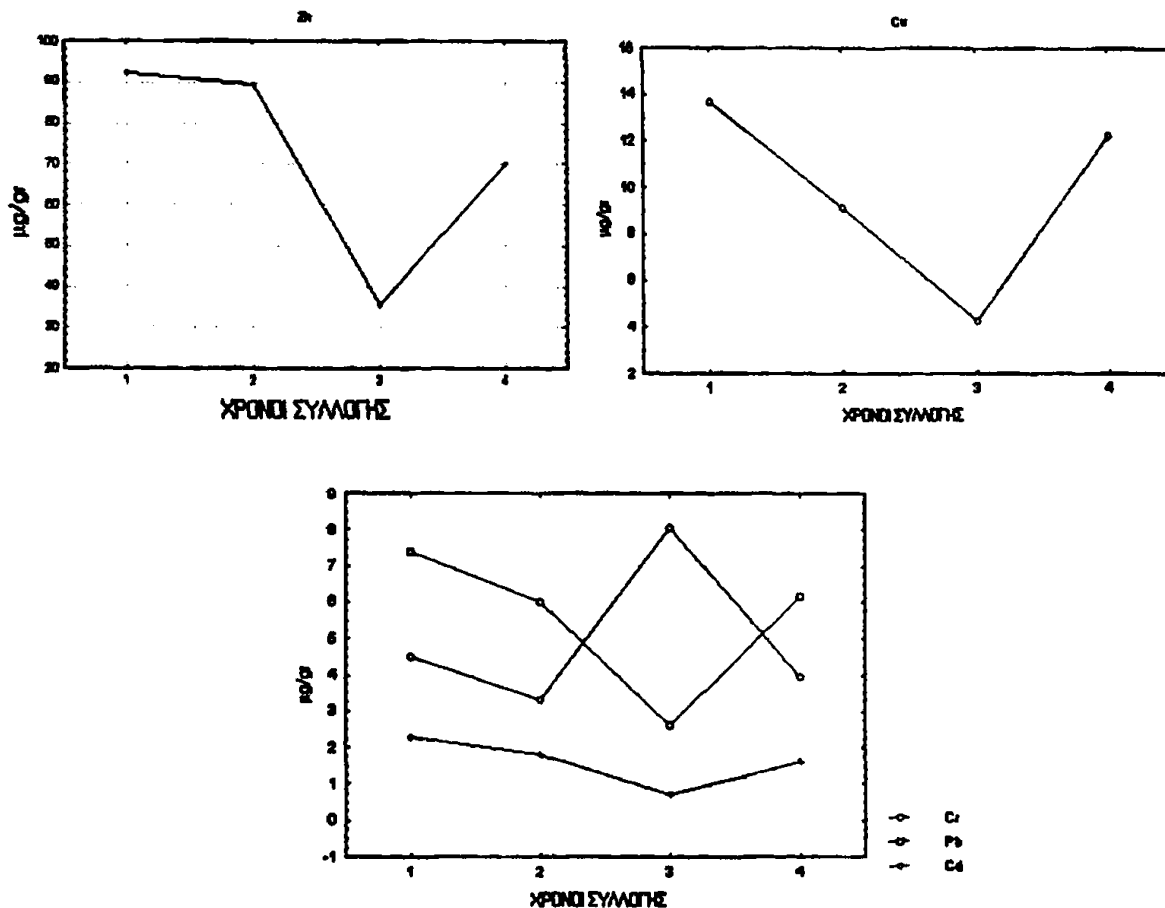




Εικ. 3.8. Ποικ. Ι- pH 2-ομάδα 20% : Μεταβολές των Zn, Cu, Cr, Pb, Cd συναρτήσει του χρόνου συλλογής των φύλλων.

Στην ομάδα φυτών που αναπτύχθηκαν σε έδαφος εμπλουτισμένο με 20% αναλογία λάσπης (ομάδα 20%)(εικ.3.8), οι μικρότερες μέσες τιμές όλων των μετάλλων παρατηρούνται στον τρίτο χρόνο και είναι: Zn=13,248 $\mu\text{g/g}$, Cr=1,065 $\mu\text{g/g}$, Pb=0,864 $\mu\text{g/g}$, Cu=4,318 $\mu\text{g/g}$ και Cd=0,214 $\mu\text{g/g}$.

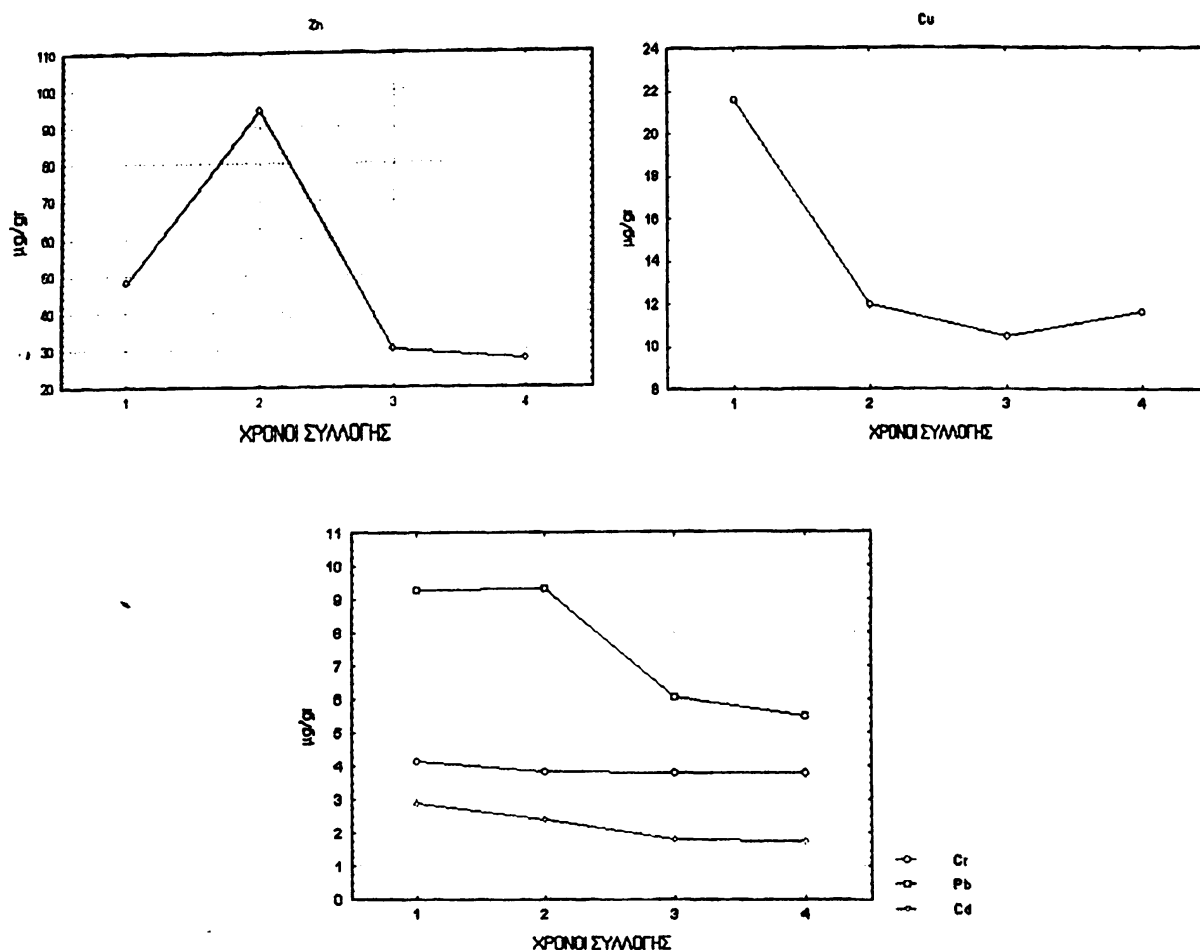
Στην ίδια ομάδα οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις όλων των μετάλλων εμφανίζονται στα γηραιότερα φύλλα (χρόνος 1) και είναι: Zn=84,762 $\mu\text{g/g}$, Cr=5,966 $\mu\text{g/g}$, Pb=8,764 $\mu\text{g/g}$, Cu=11,081 $\mu\text{g/g}$ και Cd=3,486 $\mu\text{g/g}$.



Εικ. 3.9. Ποικ. Ι- pH 2- ομάδα 40% : Μεταβολές των Zn, Cu, Cr, Pb, Cd συναρτήσει του χρόνου συλλογής των φύλλων.

Στην ομάδα με τη μεγαλύτερη αναλογία λάσπης (ομάδα 40%) (εικ.3.9), παρατηρείται ανάλογη κινητική με την ομάδα 20% για όλα τα μέταλλα εκτός του Cr.

Έτσι, οι ελάχιστες μέσες τιμές των Zn, Pb, Cu και Cd (35,329 $\mu\text{g/g}$, 2,589 $\mu\text{g/g}$, 4,250 $\mu\text{g/g}$ και 0,683 $\mu\text{g/g}$ αντίστοιχα) εντοπίζονται στα φύλλα τρίτης συλλογής (χρόνος 3) και οι μέγιστες μέσες τιμές τους (92,425 $\mu\text{g/g}$, 7,386 $\mu\text{g/g}$, 13,659 $\mu\text{g/g}$ και 2,273 $\mu\text{g/g}$ αντίστοιχα) στα φύλλα της μεγαλύτερης ηλικίας (χρόνος 1).



Εικ. 3.10. Ποικ. I-pH 2- ομάδα ΑΛ : Μεταβολές των Zn, Cu, Cr, Pb, Cd συναρτήσει του χρόνου συλλογής των φύλλων.

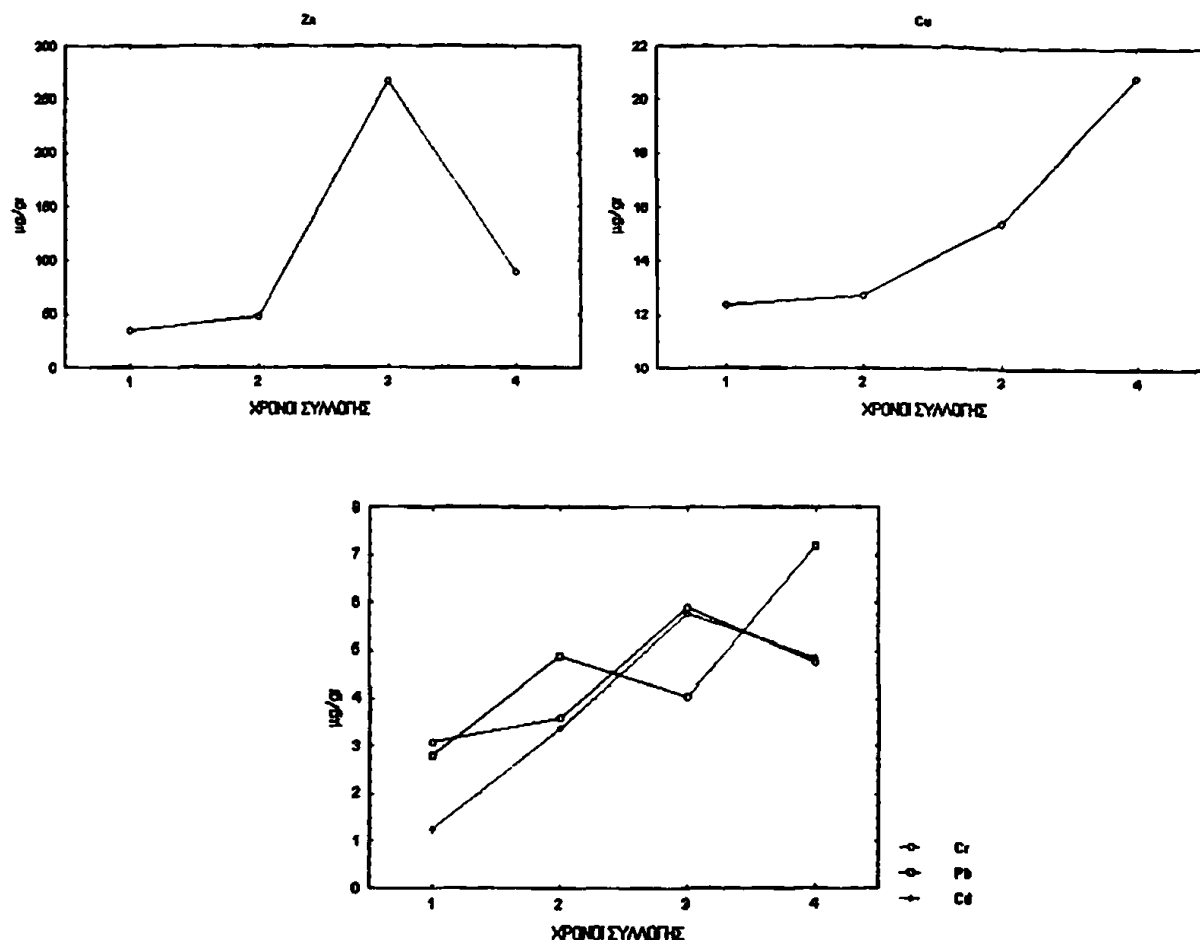
Στην ομάδα υποστρώματος ΑΛ όπου χρησιμοποιήθηκε ανόργανη λίπανση (εικ.3.10), οι ελάχιστες συγκεντρώσεις όλων των μετάλλων παρατηρούνται στα πιο νέα φύλλα (χρόνος 4 ή χρόνος 3 για τον Cu), ενώ οι μέγιστες μέσες τιμές εμφανίζονται στα γηραιότερα φύλλα (χρόνος 1 για τα Cr, Cu και Cd και χρόνος 2 για τα Zn και Pb).

Στην ίδια ομάδα οι ελάχιστες μέσες τιμές των Cr, Pb, Cu και Cd (3,765 $\mu\text{g/g}$, 5,478 $\mu\text{g/g}$, 10,444 $\mu\text{g/g}$ και 1,747 $\mu\text{g/g}$ αντίστοιχα) είναι υψηλότερες από τις αντίστοιχες της προηγούμενης ομάδας φυτών (ομάδα 40%). Επίσης, οι μέγιστες συγκεντρώσεις των Zn, Pb, Cu και Cd (94,186 $\mu\text{g/g}$, 9,320 $\mu\text{g/g}$, 21,535 $\mu\text{g/g}$ και 2,864 $\mu\text{g/g}$ αντίστοιχα) της ομάδας ΑΛ είναι μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες της προηγούμενης ομάδας.



γ) ΠΟΙΚΙΛΙΑ II – pH 1

Στην Ποικιλία II στις ομάδες φυτών που αναπτύχθηκαν σε έδαφος με pH 1, από την ανάλυση διακύμανσης προέκυψαν ισχυρά στατιστικές διαφορές ($p \leq 0,002$) στις τιμές όλων των μετάλλων μεταξύ των διαφόρων χρόνων συλλογής των φύλλων.

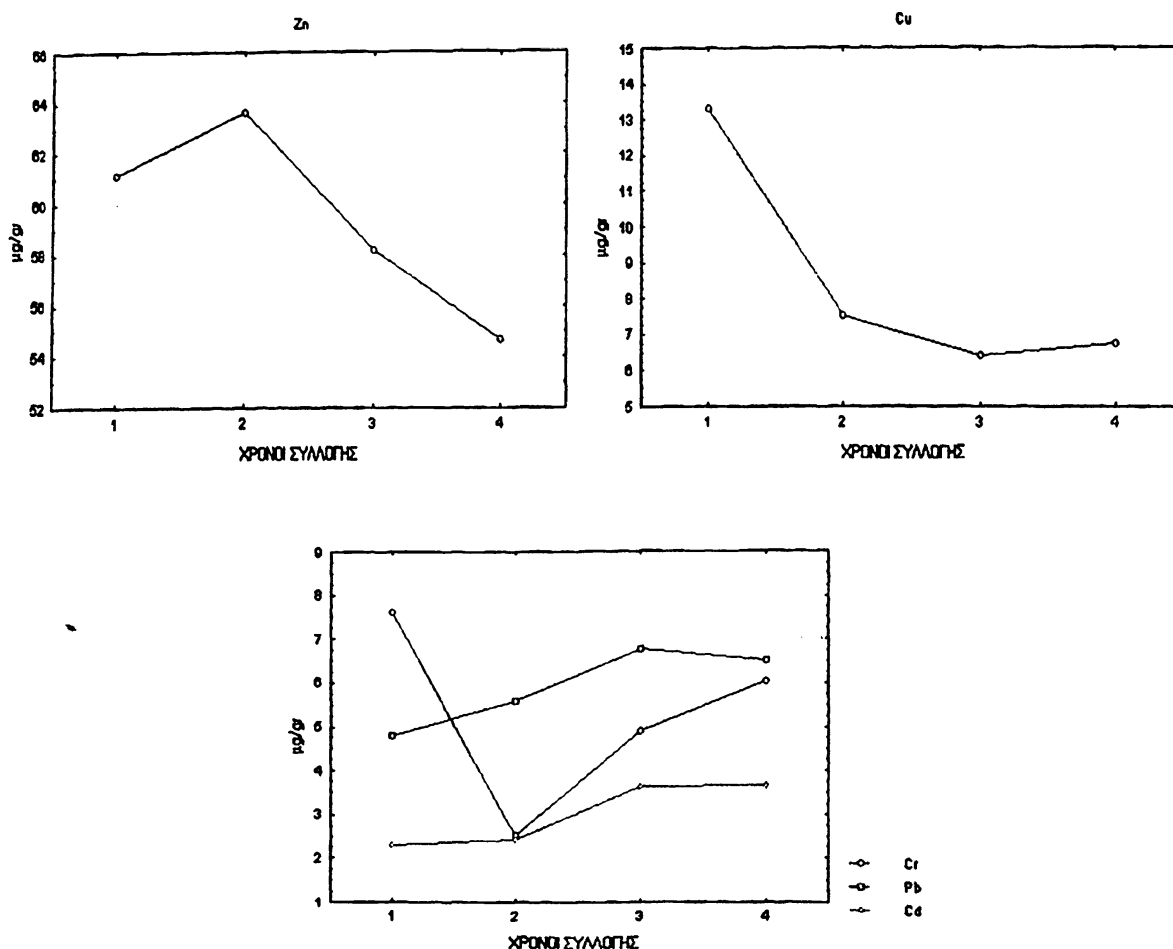


Εικ. 3.11. Ποικ. II- pH 1- ομάδα 0%: Μεταβολές των Zn, Cu, Cr, Pb, Cd συναρτήσει του χρόνου συλλογής των φύλλων.

Στην ομάδα υποστρώματος 0% (έδαφος χωρίς οργανική ή ανόργανη λίπανση) (εικ.3.11), οι μικρότερες μέσες τιμές όλων των μετάλλων παρατηρούνται στα φύλλα πρώτης συλλογής (γρηραιότερα φύλλα) και είναι 34,909 μg/g για τον Zn, 3,072 μg/g για το Cr, 2,796 μg/g για το Pb, 12,359 μg/g για τον Cu και 1,236 μg/g για το Cd.

Οι μέγιστες συγκεντρώσεις των Zn, Cr και Cd (266,859 μg/g, 5,881 μg/g και 5,750 μg/g αντίστοιχα) εντοπίζονται στα φύλλα τρίτης συλλογής, ενώ για τα Pb και Cu (7,167 μg/g και 20,904 μg/g αντίστοιχα) παρατηρούνται στα αμέσως νεώτερα φύλλα (χρόνος 4).

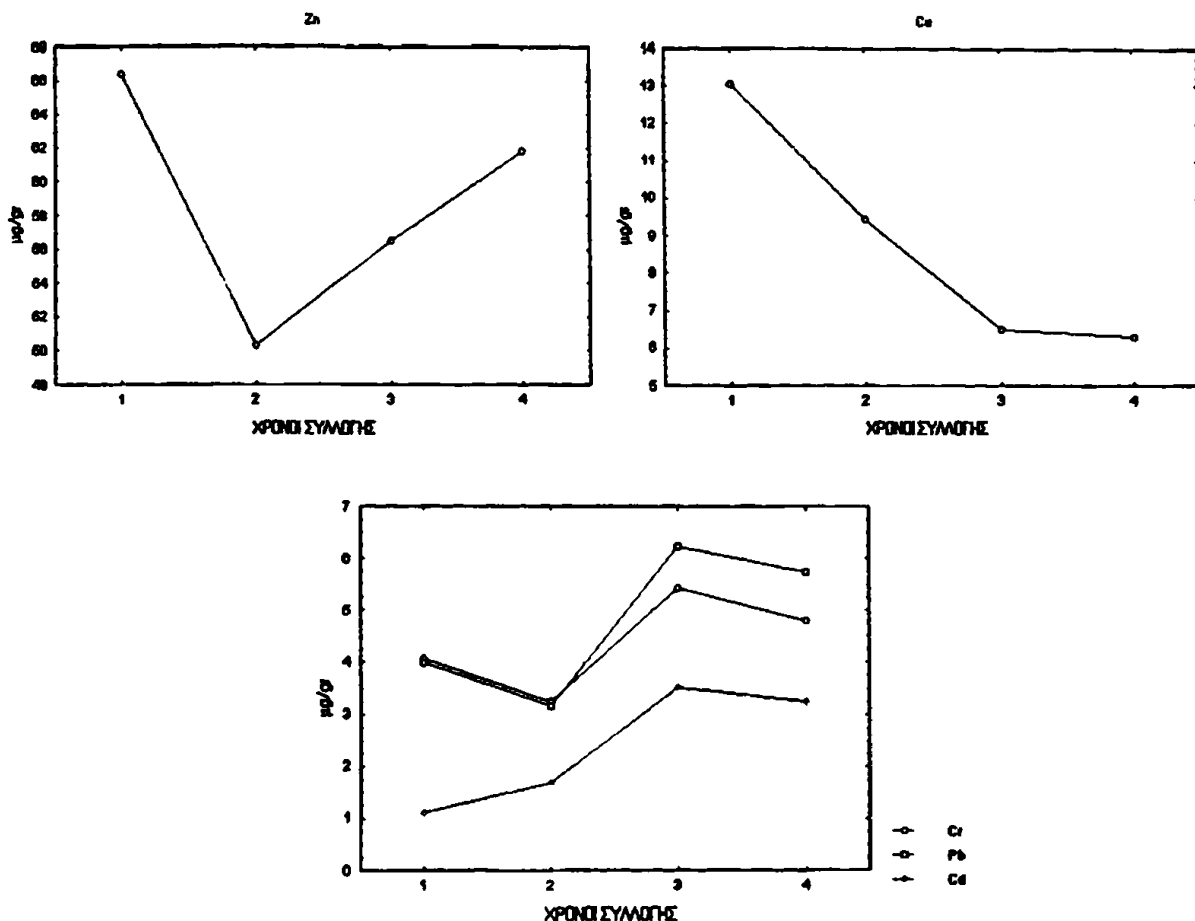




Εικ. 3.12. Ποικ. Π-pH 1- ομάδα 10%: Μεταβολές των Zn, Cu, Cr, Pb, Cd συναρτήσει του χρόνου συλλογής των φύλλων.

Η ανάμιξη του εδάφους με λάσπη βιολογικού καθαρισμού σε αναλογία 10% (ομάδα 10%) (εικ.3.12), διατηρεί την εμφάνιση των μικρότερων μέσων τιμών στα γηραιότερα φύλλα για τρία μέταλλα. Έτσι ο Pb και το Cd παρουσιάζουν τις ελάχιστες συγκεντρώσεις στα φύλλα πρώτης συλλογής (χρόνος 1) (4,802 $\mu\text{g/g}$ και 2,292 $\mu\text{g/g}$ αντίστοιχα) και το Cr παρουσιάζει την μικρότερη μέση τιμή στα φύλλα 2^{ου} χρόνου συλλογής (2,528 $\mu\text{g/g}$). Αντιθέτως ο Zn και ο Cu παρουσιάζουν τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις (54,667 $\mu\text{g/g}$ και 6,397 $\mu\text{g/g}$ αντίστοιχα) στα νεώτερα φύλλα (χρόνος 4 και χρόνος 3 αντίστοιχα). Οι **μέγιστες** μέσες τιμές των **Zn, Cr και Cu** (63,600 $\mu\text{g/g}$, 7,624 $\mu\text{g/g}$ και 13,319 $\mu\text{g/g}$ αντίστοιχα) εμφανίζονται σε γηραιότερα φύλλα (χρόνοι 1 και 2).



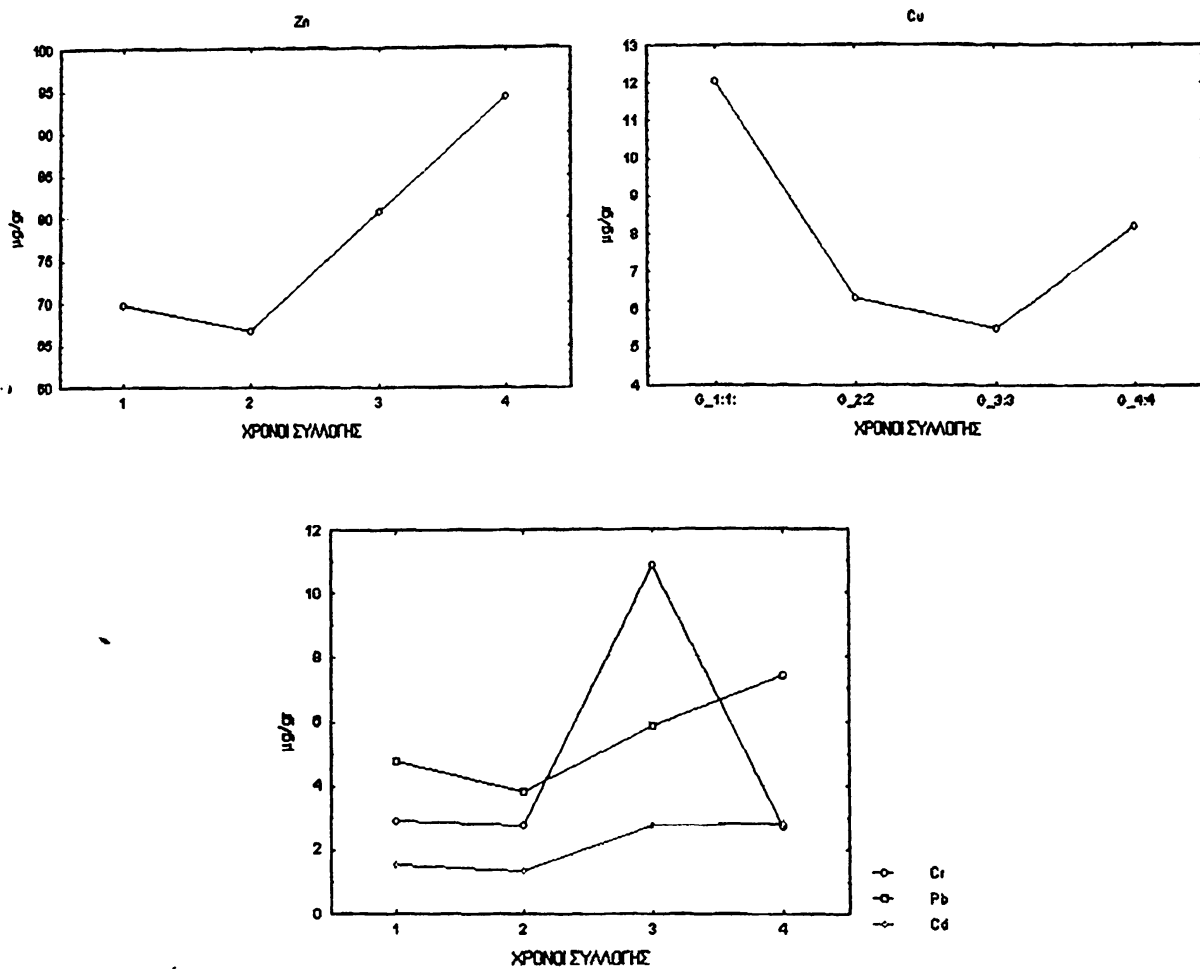


Εικ. 3.13. Ποικ. Π-pH 1- ομάδα 20%: Μεταβολές των Zn, Cu, Cr, Pb, Cd συναρτήσει του χρόνου συλλογής των φύλλων.

Στην ομάδα 20% (φυτά που μεταφυτεύτηκαν σε έδαφος αναμιγμένο με 20% αναλογία λάσπης) (εικ.3.13) επανέρχεται η κατανομή της ομάδας 0%, με εμφάνιση των ελάχιστων μέσων τιμών στα γηραιότερα φύλλα και των μέγιστων μέσων τιμών στα νεώτερα φύλλα για τα περισσότερα μέταλλα.

Έτσι, ο Zn, το Cr και ο Pb παρουσιάζουν τις μικρότερες συγκεντρώσεις (50.297 $\mu\text{g/g}$, 3,235 $\mu\text{g/g}$ και 3,145 $\mu\text{g/g}$ αντίστοιχα) στα φύλλα χρόνου 2 και το Cd (1,103 $\mu\text{g/g}$) στα φύλλα χρόνου 1. Αντιθέτως, ο Cu παρουσιάζει αντίστροφη κινητική, με την ελάχιστη μέση τιμή να εμφανίζεται στα νεώτερα φύλλα (6,301 $\mu\text{g/g}$) και τη μέγιστη μέση τιμή στα γηραιότερα φύλλα (13,029 $\mu\text{g/g}$). Οι μέγιστες συγκεντρώσεις όλων των άλλων μετάλλων εκτός του Zn εμφανίζονται στα φύλλα τρίτης συλλογής και είναι: Cr=5,417 $\mu\text{g/g}$, Pb=6,231 $\mu\text{g/g}$ και Cd=3,525 $\mu\text{g/g}$. Επίσης παρατηρούμε ότι τα κατώτερα επίπεδα όλων των μετάλλων εκτός του Cr στην ομάδα 20% είναι χαμηλότερα από τα αντίστοιχα της ομάδας 10%.



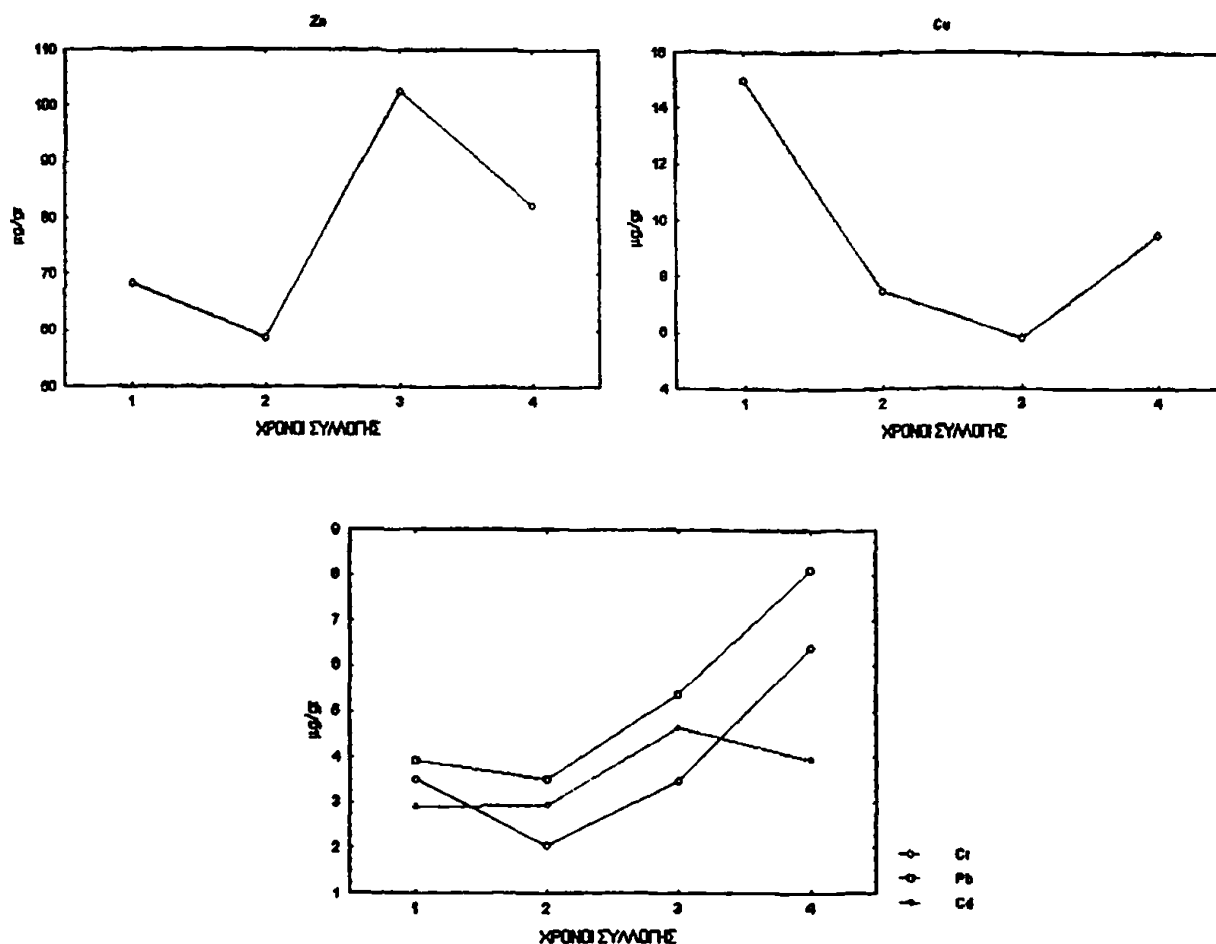


Εικ. 3.14. Ποικ. Π-ρΗ 1- ομάδα 40% : Μεταβολές των Zn, Cu, Cr, Pb, Cd συναρτήσει του χρόνου συλλογής των φύλλων.

Στην **ομάδα** όπου το έδαφος αναμίχθηκε με μεγαλύτερη αναλογία λάσπη (**ομάδα 40%**) (εικ.3.14), παρατηρούνται ελάχιστες τιμές για τα Zn, Pb και Cd (66,597 μg/g, 3,795 μg/g και 1,311 μg/g αντίστοιχα) στα φύλλα δευτέρου χρόνου συλλογής, ενώ οι μικρότερες συγκεντρώσεις των Cr και Cu (2,692 μg/g και 5,477 μg/g αντίστοιχα) εμφανίζονται σε νεώτερα φύλλα (χρόνος 4 και χρόνος 3 αντίστοιχα).

Οι **μέγιστες** μέσες τιμές των **Zn, Cr, Pb και Cd** (94,289 μg/g, 10,843 μg/g, 7,398 μg/g και 2,811 μg/g αντίστοιχα) εντοπίζονται στα φύλλα **τελευταίων συλλογών**. Ο **Cu** συνεχίζει να παρουσιάζει τη **μέγιστη** μέση τιμή (12,058 μg/g) στα γηραιότερα φύλλα (**χρόνος 1**) και σε αυτή την ομάδα υποστρώματος. Οι κατώτερες συγκεντρώσεις των περισσότερων μετάλλων δεν μεταβάλλονται σημαντικά στην ομάδα 40% σε σχέση με την ομάδα 20%.

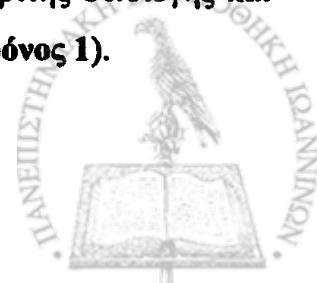




Εικ. 3.15. Ποικ. Π- pH 1- ομάδα ΑΛ : Μεταβολές των Zn, Cu, Cr, Pb, Cd συναρτήσει του χρόνου συλλογής των φύλλων.

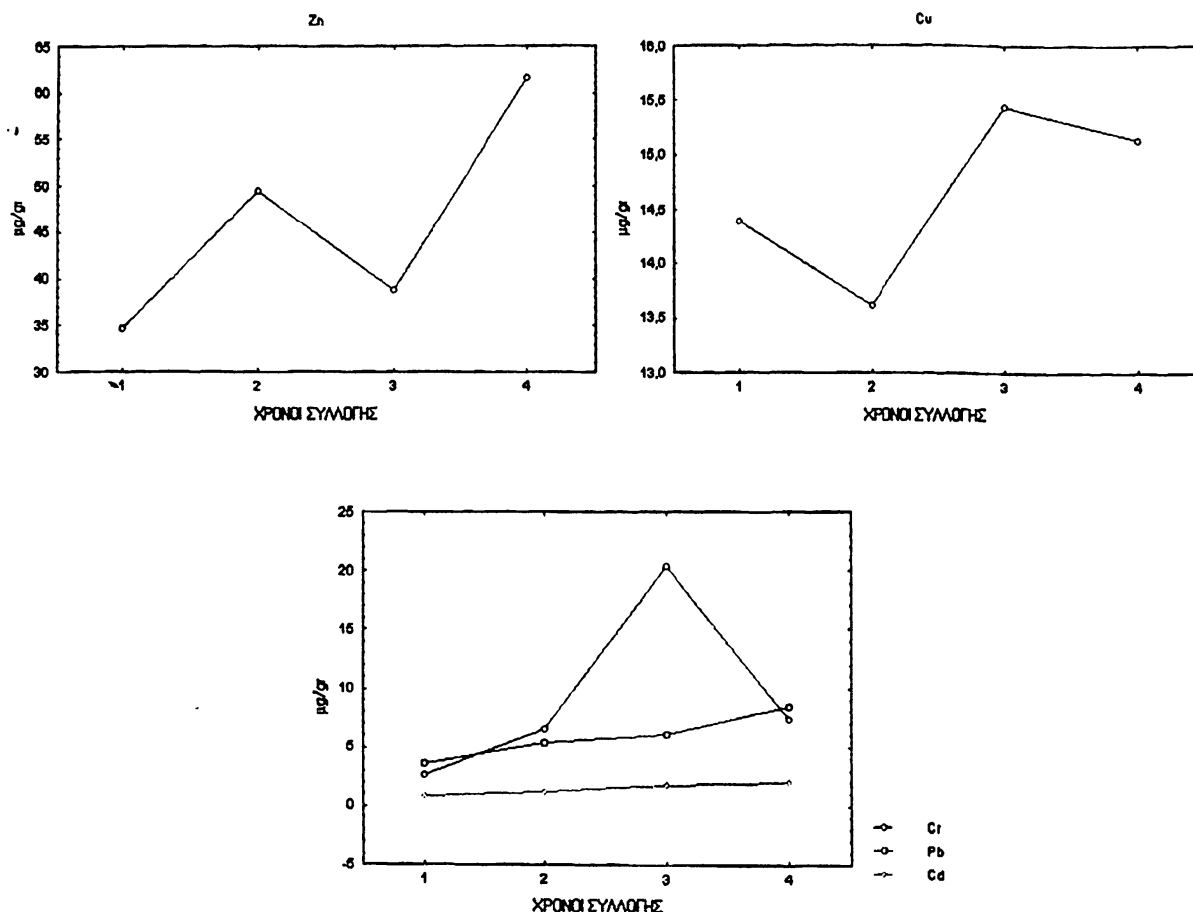
Στην ομάδα ΑΛ (φυτά που αναπτύχθηκαν σε έδαφος όπου εφαρμόστηκε ανόργανη λίπανση) (εικ.3.15), είναι εμφανές ότι όλα τα μέταλλα, εκτός του Cu που έχει αντίστροφη κινητική, παρουσιάζουν τις μικρότερες μέσες τιμές στα γηραιότερα φύλλα και τις μεγαλύτερες μέσες τιμές στα νεώτερα φύλλα.

Έτσι, ο Zn, το Cr, ο Pb και το Cd εμφανίζουν τις κατώτερες συγκεντρώσεις τους (58,522 $\mu\text{g/g}$, 2,053 $\mu\text{g/g}$, 3,506 $\mu\text{g/g}$ και 2,908 $\mu\text{g/g}$ αντίστοιχα) στα φύλλα πρώτου ή δευτέρου χρόνου συλλογής και τις ανώτατες τιμές τους (102,622 $\mu\text{g/g}$, 6,420 $\mu\text{g/g}$, 8,122 $\mu\text{g/g}$ και 4,641 $\mu\text{g/g}$ αντίστοιχα) στα φύλλα τρίτου ή τέταρτου χρόνου συλλογής. Αντιθέτως, ο Cu ελάχιστη τιμή (5,791 $\mu\text{g/g}$) εμφανίζει στα φύλλα τρίτης συλλογής και μέγιστη συγκέντρωση (14,974 $\mu\text{g/g}$) στα φύλλα πρώτης συλλογής (χρόνος 1).



δ) ΠΟΙΚΙΛΙΑ II - pH 2

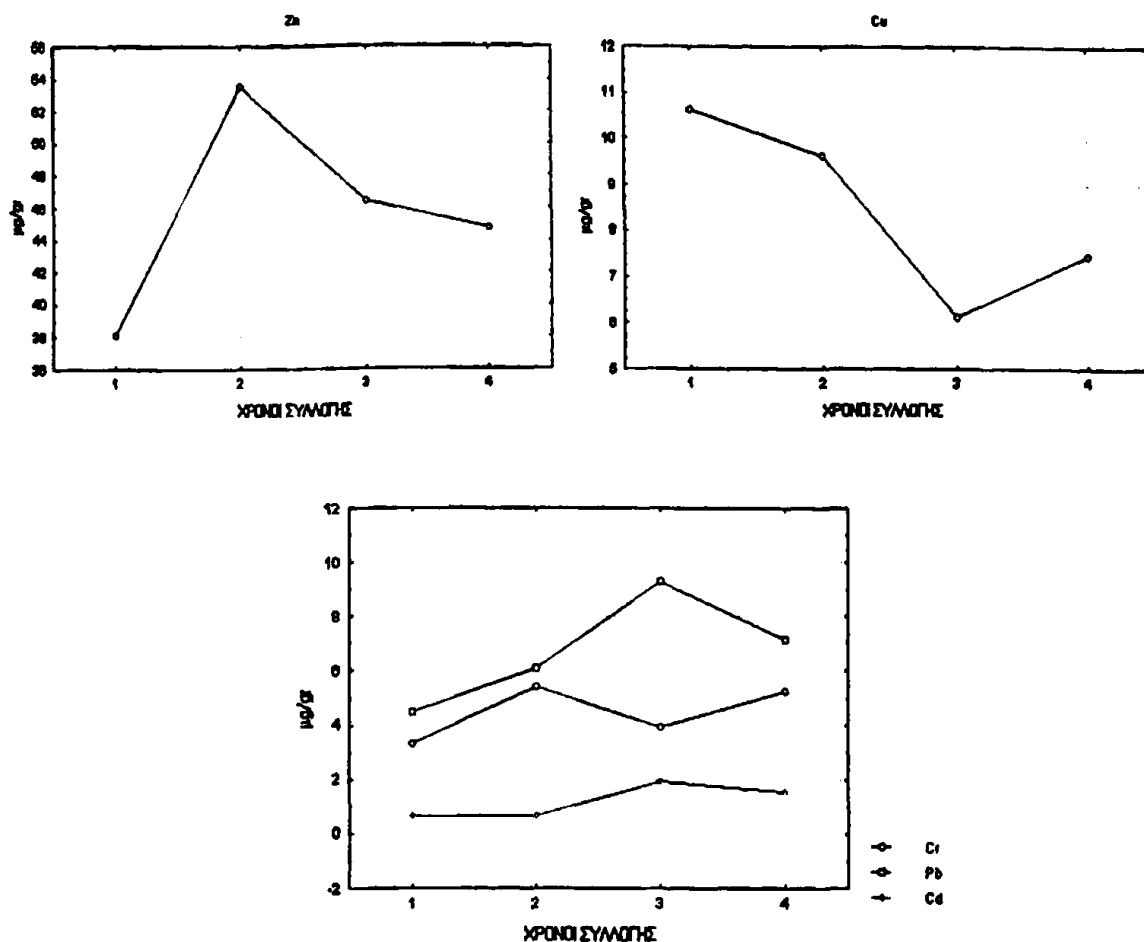
Στην Ποικιλία II, στις ομάδες φυτών που αναπτύχθηκαν σε έδαφος με pH 2, από την ανάλυση διακύμανσης προέκυψαν ισχυρά στατιστικές διαφορές ($p \leq 0,002$) στις τιμές όλων των μετάλλων μεταξύ των διαφόρων χρόνων συλλογής των φύλλων.



Εικ. 3.16. Ποικ. II- pH 2-ομάδα 0%: Μεταβολές των Zn, Cu, Cr, Pb, Cd συναρτήσει του χρόνου συλλογής των φύλλων.

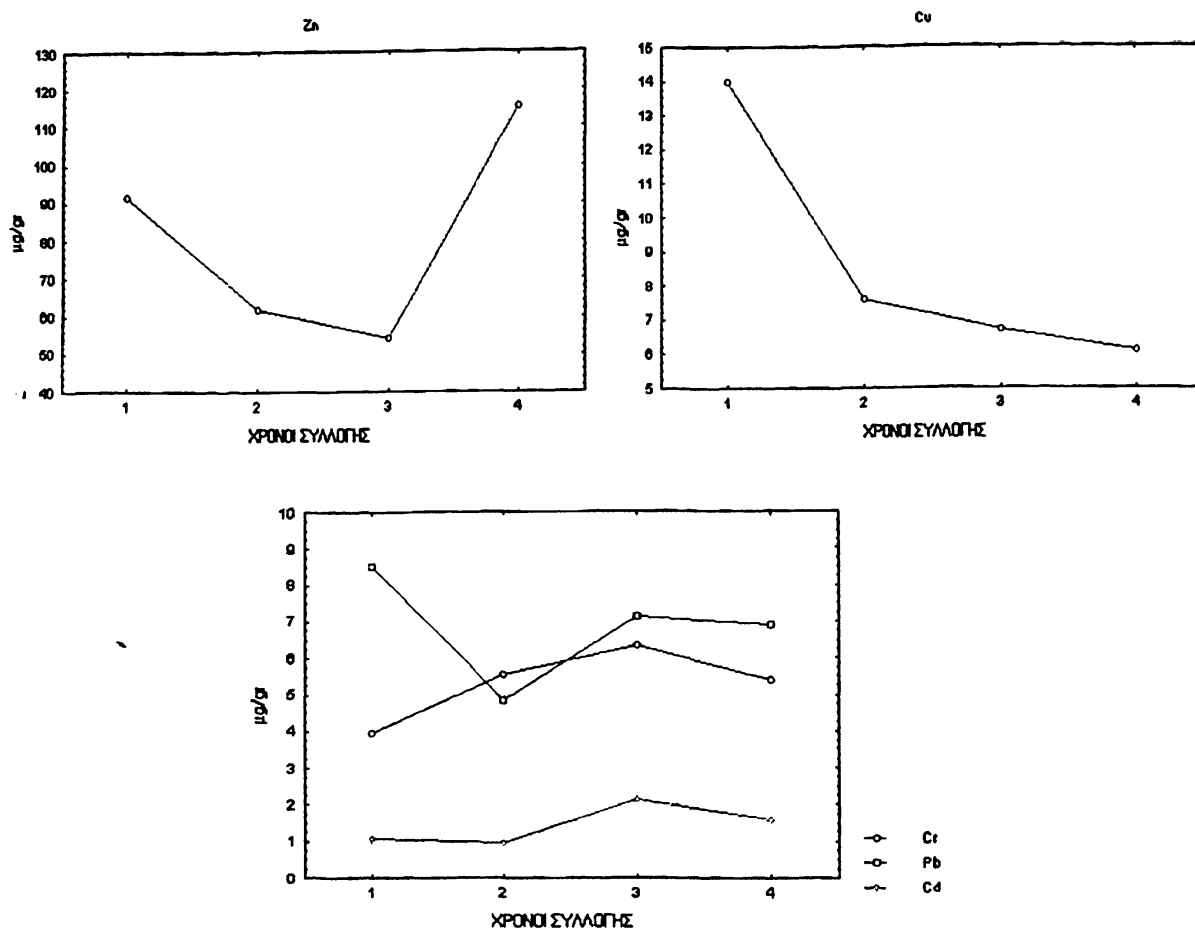
Στην ομάδα 0% (φυτά σε έδαφος χωρίς οργανική ή ανόργανη λίπανση) (εικ.3.16), οι μικρότερες μέσες τιμές των Zn, Cr, Pb και Cd ($34,610 \mu\text{g/g}$, $2,536 \mu\text{g/g}$, $3,507 \mu\text{g/g}$ και $0,800 \mu\text{g/g}$ αντίστοιχα) παρατηρούνται στα γηραιότερα φύλλα (χρόνος 1) και η ελάχιστη συγκέντρωση Cu ($13,604 \mu\text{g/g}$) στα αμέσως νεώτερα (χρόνος 2).

Τα μέγιστα επίπεδα για τα Zn, Pb και Cd εμφανίζονται στον χρόνο 4 (νεώτερα φύλλα) και για τα Cr και Cu στον χρόνο 3.



Εικ. 3.17. Πουκ. Π- pH 2- ομάδα 10%: Μεταβολές των Zn, Cu, Cr, Pb, Cd συναρτήσει του χρόνου συλλογής των φύλλων.

Στην ομάδα υποστρώματος 10% (εικ.3.17), ο Zn, το Cr και ο Pb παρουσιάζουν τις μικρότερες μέσες τιμές (38,160 μg/g, 3,339 μg/g και 4,463 μg/g αντίστοιχα) στα φύλλα πρώτου χρόνου συλλογής και το Cd (0,652 μg/g) στα φύλλα δευτέρου χρόνου συλλογής. Αντιθέτως ο Cu εμφανίζει τη μικρότερη συγκέντρωση (6,131 μg/g) σε νεώτερα φύλλα (χρόνος 3) και τη μέγιστη μέση τιμή (10,624 μg/g) στα γηραιότερα φύλλα (χρόνος 1). Οι κατώτερες τιμές των Zn, Cr και Pb στην ομάδα 10% είναι αυξημένες σε σχέση με την προηγούμενη ομάδα, ενώ θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι κατώτερες συγκεντρώσεις των Cd και Cu είναι σε μικρότερα επίπεδα σε σχέση με τα επίπεδα των φυτών της ομάδας 0%.



Εικ. 3.18. Ποικ. Π- pH 2- ομάδα 20%: Μεταβολές των Zn, Cu, Cr, Pb, Cd συναρτήσει του χρόνου συλλογής των φύλλων.

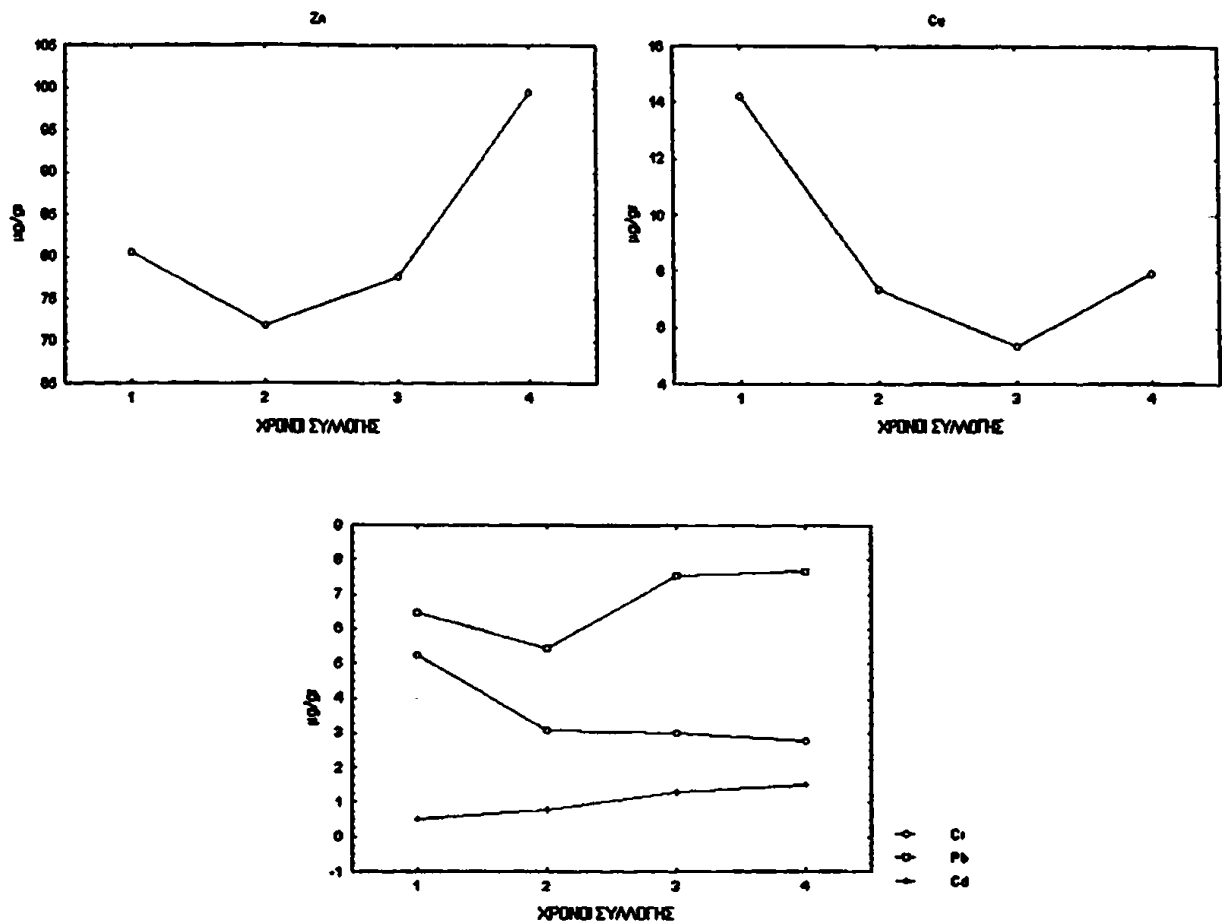
Στην ομάδα φυτών που μεταφύτευτηκαν σε έδαφος αναμιγμένο με λάσπη σε αναλογία 20% (ομάδα 20%) (εικ.3.18), διατηρείται η κινητική που φαίνεται να χαρακτηρίζει την ποικιλία Π, με μέγιστες συσσωρεύσεις όλων των μετάλλων εκτός του Cu και του Pb στα νεώτερα φύλλα (χρόνοι 4 και 3).

Έτσι, οι μέγιστες τιμές των Cr, και Cd παρατηρούνται στα φύλλα τρίτης συλλογής (6,320 μg/g, και 2,134 μg/g αντίστοιχα) και του Zn (115,503 μg/g) στα φύλλα τέταρτης συλλογής.

Ο Cu παρουσιάζει ελάχιστη μέση τιμή (6,121 μg/g) στα νεώτερα φύλλα (χρόνος 4) και μέγιστη μέση τιμή (13,999 μg/g) στα γηραιότερα φύλλα (χρόνος 1), όπου εμφανίζεται και η μέγιστη τιμή του Pb (7,108 μg/g).

Οι κατώτερες συγκεντρώσεις όλων των μετάλλων εμφανίζονται ελαφρά αυξημένες στην ομάδα 20% σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές της ομάδας 10%.



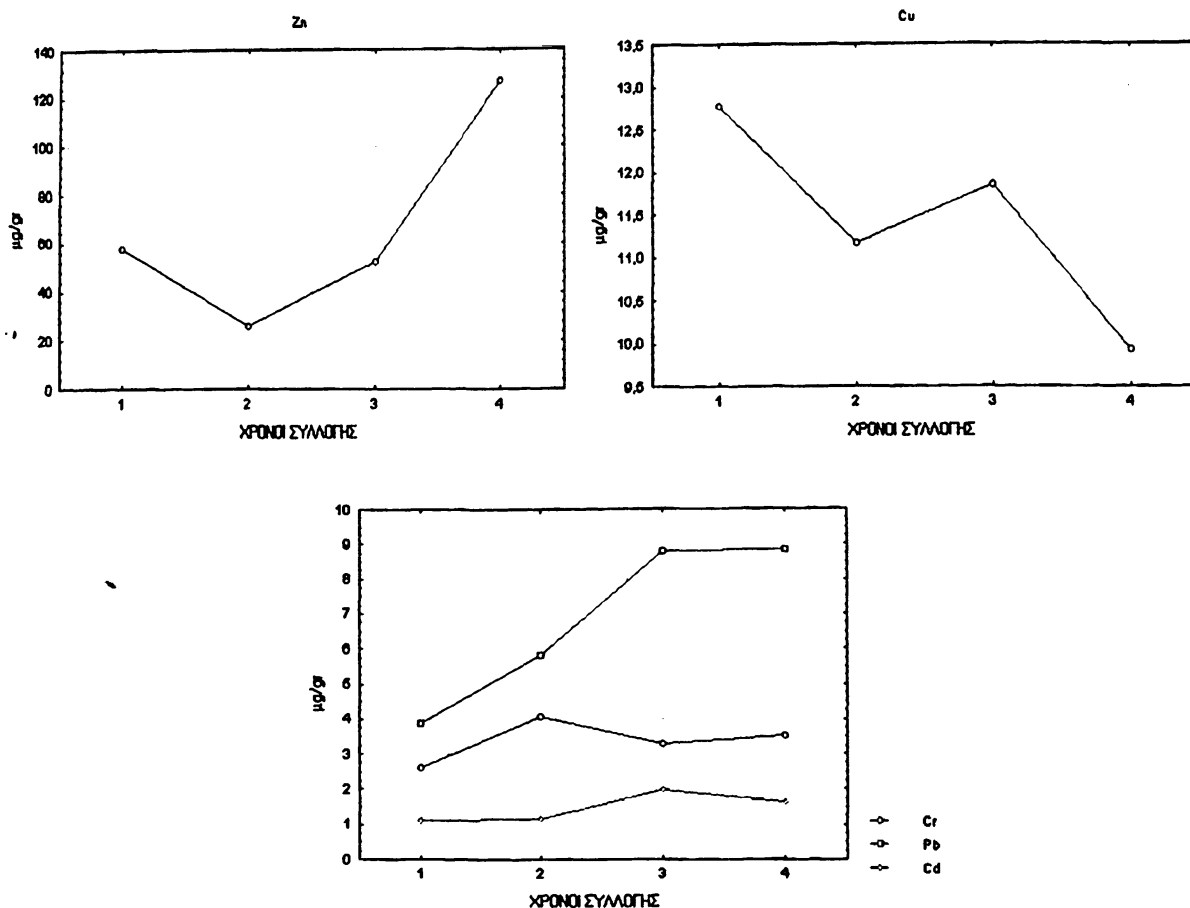


Εικ. 3.19. Ποικ. Π-ρΗ 2-ομάδα 40%: Μεταβολές των Zn, Cu, Cr, Pb, Cd συναρτήσει του χρόνου συλλογής των φύλλων.

Στην ομάδα υποστρώματος 40% (εικ.3.19), παρατηρείται κοινή συμπεριφορά στην κινητική των μετάλλων με τις προηγούμενες ομάδες, με μόνη εξαίρεση το Cr που ακολουθεί την κινητική του Cu. Έτσι, οι μικρότερες μέσες τιμές των Zn, Pb και Cd (71,763 $\mu\text{g/g}$, 5,436 $\mu\text{g/g}$ και 0,503 $\mu\text{g/g}$ αντίστοιχα) εμφανίζονται στα γηραιότερα φύλλα (χρόνος 1 και 2) και οι μέγιστες (99,460 $\mu\text{g/g}$, 7,662 $\mu\text{g/g}$ και 1,504 $\mu\text{g/g}$ αντίστοιχα) στα νεώτερα φύλλα (χρόνος 4).

Για το Cr η ελάχιστη συγκέντρωση (2,742 $\mu\text{g/g}$) παρατηρείται στα φύλλα τέταρτης συλλογής και η μέγιστη μέση τιμή (5,237 $\mu\text{g/g}$) στα φύλλα πρώτης συλλογής. Τα κατώτερα επίπεδα των Cr, Cu και Cd στην ομάδα 40% είναι πιο χαμηλά από τα αντίστοιχα της προηγούμενης ομάδας υποστρώματος.





Εικ. 3.20. Ποικ. Π-ρΗ 2-ομάδα ΑΛ: Μεταβολές των Zn, Cu, Cr, Pb, Cd συναρτήσει του χρόνου συλλογής των φύλλων.

Τέλος, στην ομάδα φυτών που μεταφυτεύτηκαν σε έδαφος όπου εφαρμόστηκε ανόργανη λίπανση (εικ. 3.20), επιβεβαιώνεται για ακόμα μια φορά η τάση συσσώρευσης που χαρακτηρίζει την ποικιλία Π όλων των μετάλλων σε νεώτερα φύλλα και του Cu σε γηραιότερα φύλλα.

Έτσι, οι μικρότερες μέσες τιμές των Cr, Pb και Cd (2,592 μg/g, 3,889 μg/g και 1,101 μg/g αντίστοιχα) εμφανίζονται στα φύλλα πρώτης συλλογής (χρόνος 1) και του Zn (25,412 μg/g) στα φύλλα δεύτερης συλλογής (χρόνος 2).

Οι μέγιστες συγκεντρώσεις των Zn, Pb και Cd (126,723 μg/g, 8,795 μg/g και 1,981 μg/g αντίστοιχα) παρατηρούνται σε φύλλα τελευταίων συλλογών (χρόνοι 3 και 4).

Η ελάχιστη μέση τιμή Cu (9,916 μg/g) εντοπίζεται στα νεώτερα φύλλα και η μέγιστη (12,779 μg/g) στα γηραιότερα φύλλα.

Οι κατώτερες συγκεντρώσεις των Zn, Pb, Cu και Cd στην ομάδα ΑΛ βρέθηκαν αυξημένες σε σχέση με τις αντίστοιχες της προηγούμενης ομάδας υποστρώματος.



3.1.2. ΕΠΙΠΕΔΑ ΜΕΤΑΛΛΩΝ ΣΥΝΑΡΤΗΣΕΙ ΧΡΟΝΟΥ ΣΥΛΛΟΓΗΣ ΚΑΙ pH ΚΑΙ ΑΝΕΞΑΡΤΗΤΩΣ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ

α) ΠΟΙΚΙΛΙΑ I-pH 1, pH 2

Από τα διαγράμματα (εικ.3.21 & 3.22) και την ανάλυση διακύμανσης των τιμών διαπιστώνεται ότι με εξαίρεση τον Cu και μερικώς τον Zn, τα μέταλλα εμφανίζουν παρόμοια κινητική στα 2 διαφορετικά pH, στους 4 χρόνους συλλογής των φύλλων.

Από αυτό συμπεραίνεται ότι στην ποικιλία I το pH δεν επηρεάζει την κινητική των μετάλλων στους χρόνους έκθεσης των φυτών.

Έτσι, στις 5 ομάδες υποστρώματος με pH 1 η μέση τιμή του Cr μειώνεται από 6,761 μg/g στον χρόνο 1 σε 3,451 μg/g στον χρόνο 4 και η μέγιστη συγκέντρωση (7,126 μg/g) παρατηρείται στον χρόνο 2.

Αντίστοιχα, στις 5 ομάδες υποστρώματος με pH 2 τα επίπεδα του Cr μειώνονται από 6,095 μg/g στον χρόνο 1 σε 3,917 μg/g στον χρόνο 4.

Στις ομάδες εδαφικού pH 1 η συγκέντρωση του Pb μειώνεται από 7,311 μg/g στον χρόνο 1 σε 4,981 μg/g στον χρόνο 4 και στις ομάδες εδαφικού pH 2 η μέση τιμή του μειώνεται από 8,816 μg/g στον χρόνο 1 σε 4,663 μg/g στον χρόνο 4.

Για το Cd παρατηρούμε ότι στις ομάδες με εδαφικό pH 1 τα επίπεδα μειώνονται από 6,178 μg/g στον χρόνο 1 σε 2,122 μg/g στον χρόνο 4 και στις ομάδες εδαφικού pH 2 η μέση τιμή μειώνεται από 2,801 μg/g στον χρόνο 1 σε 1,376 μg/g στον χρόνο 4.

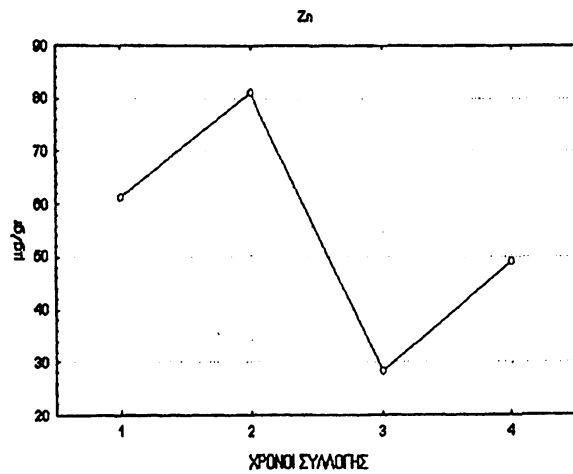
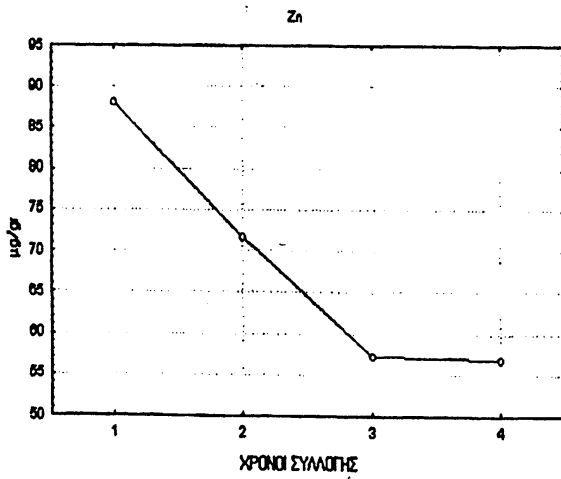
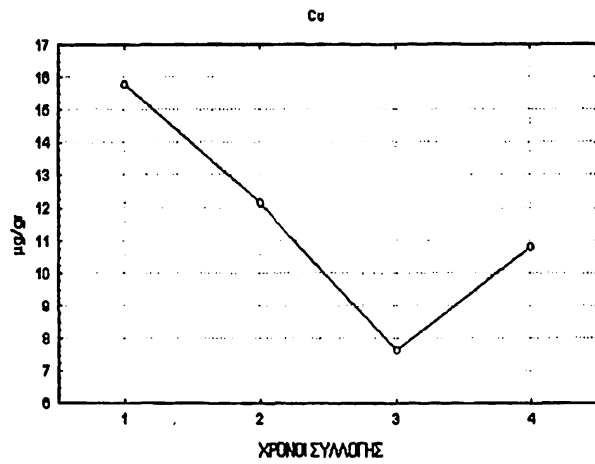
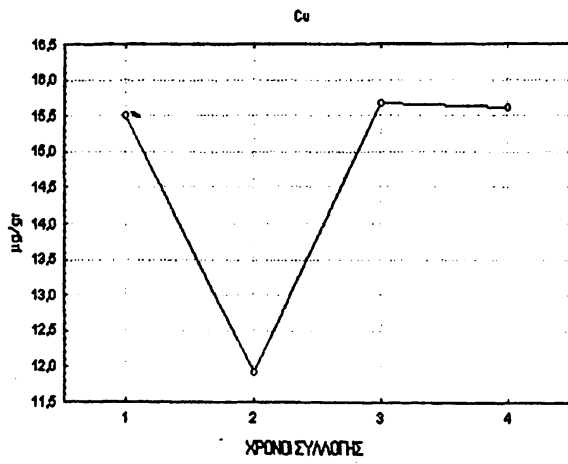
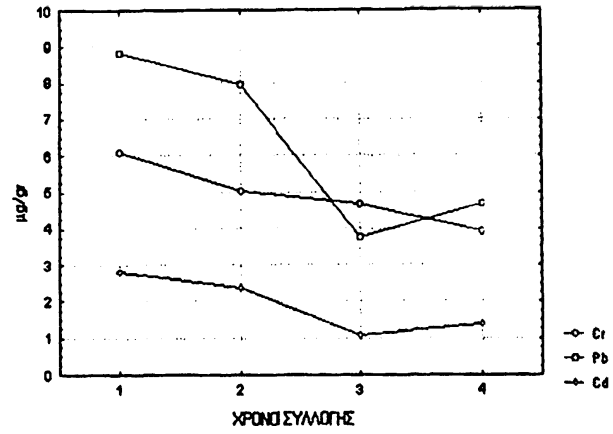
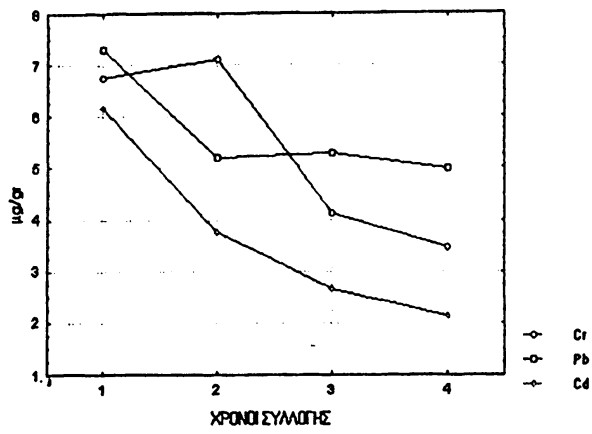
Για τον Zn σε συνθήκες pH 1 παρατηρείται μείωση της συγκέντρωσης από 88,160 μg/g στον χρόνο 1 σε 56,934 μg/g στον χρόνο 4, ενώ αντίστοιχα σε συνθήκες pH 2 παρατηρείται αύξηση της μέσης τιμής σε 81,083 μg/g στον χρόνο 2 που ακολουθείται από σημαντική μείωση σε 28,441 μg/g στον χρόνο 3.

Για τον Cu σε συνθήκες pH 1 η μέση τιμή διατηρείται σχεδόν σταθερή (από 15,504 μg/g έως 15,670 μg/g) σε όλες τις συλλογές φύλλων με μικρή μείωση στον χρόνο 2 (11,915 μg/g).

Αντιθέτως σε συνθήκες pH 2 τα επίπεδα του Cu μειώνονται από 15,775 μg/g στον χρόνο 1 σε 7,604 μg/g στον χρόνο 3 και ακολουθεί αύξηση στον χρόνο 4 (μέση τιμή = 10,794 μg/g).

Τα επίπεδα γενικά των Cu και Zn είναι σημαντικά υψηλότερα στο όξινο pH 1 σε σχέση με αυτά του αλκαλικού pH 2.





Εικ. 3.21. Ποικ. I- pH 1: Μεταβολές των Zn, Cu, Cr, Pb, Cd συναρτήσει του χρόνου συλλογής των φύλλων.

Εικ. 3.22. Ποικ. I- pH 2: Μεταβολές των Zn, Cu, Cr, Pb, Cd συναρτήσει του χρόνου συλλογής των φύλλων.



β) ΠΟΙΚΙΛΙΑ Π-ρΗ 1, ρΗ 2

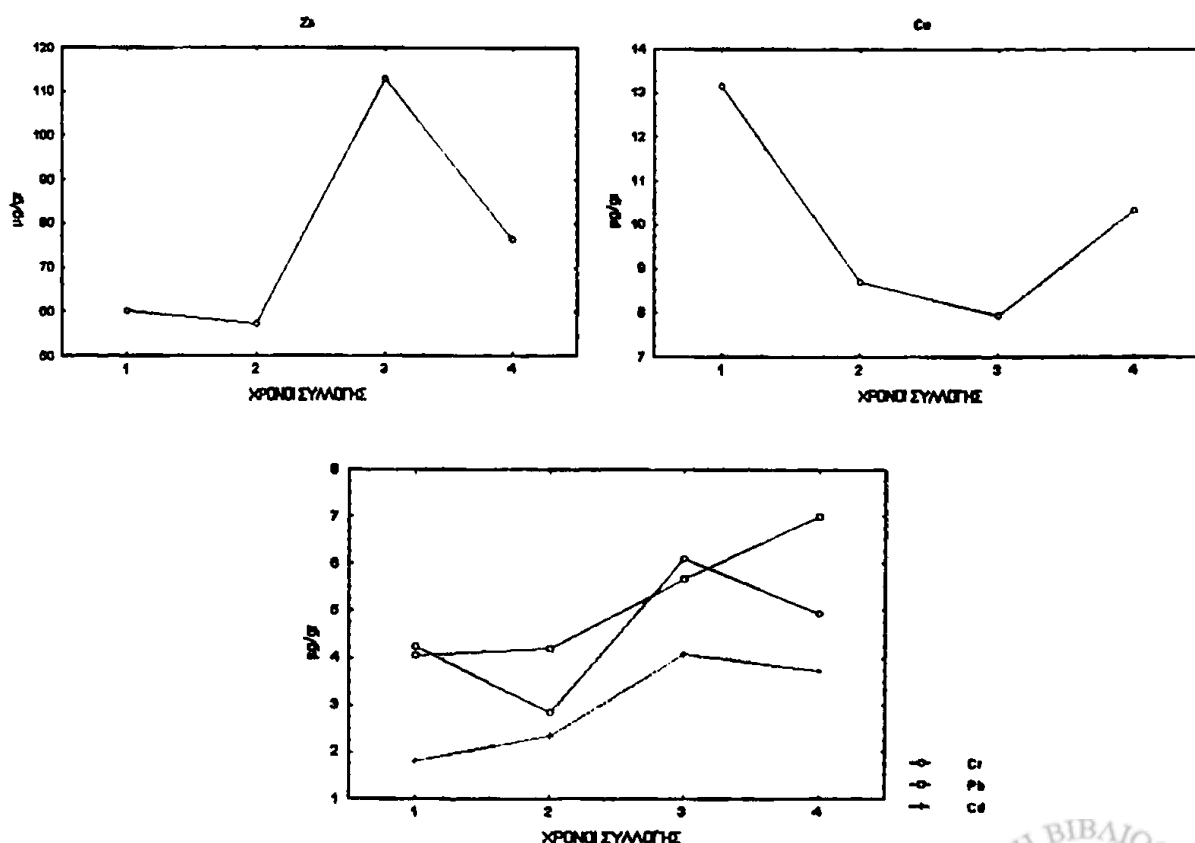
Από τα διαγράμματα (εικ.3.23) και την στατιστική ανάλυση φαίνεται ότι στις ομάδες εδαφικού ρΗ 1 η μέση τιμή του Pb αυξάνεται από 4,047 μg/g στον χρόνο 1 σε 6,983 μg/g στον χρόνο 4.

Η συγκέντρωση του Cd στις ίδιες συνθήκες ρΗ αυξάνεται από 1,811 μg/g στον χρόνο 1 σε 4,061 μg/g στον χρόνο 3, ενώ τα νεώτερα φύλλα (χρόνος 4) παρουσιάζουν μειωμένη μέση τιμή σε σχέση με τα αμέσως γηραιότερα (3,702 μg/g).

Το Cr στο εδαφικό ρΗ 1 παρουσιάζει μια αυξητική τάση από τον χρόνο 1 στον χρόνο 4, παρόλο που στους χρόνους 2 και 3 εμφανίζονται αντίστοιχα η ελάχιστη (2,830 μg/g) και η μέγιστη (6,101 μg/g) μέση τιμή.

Τα επίπεδα του Cu μειώνονται από 13,148 μg/g στον χρόνο 1 σε 7,914 μg/g στον χρόνο 3, και στον χρόνο 4 παρατηρείται αύξηση σε 10,328 μg/g.

Από το διάγραμμα φαίνεται ότι ο Zn σε συνθήκες ρΗ 1 παρουσιάζει αύξηση μέσης τιμής (από 60,064 μg/g σε 112,976 μg/g) από τον χρόνο 1 στον χρόνο 3 που ακολουθείται από μείωση (76,391 μg/g) στον χρόνο 4.

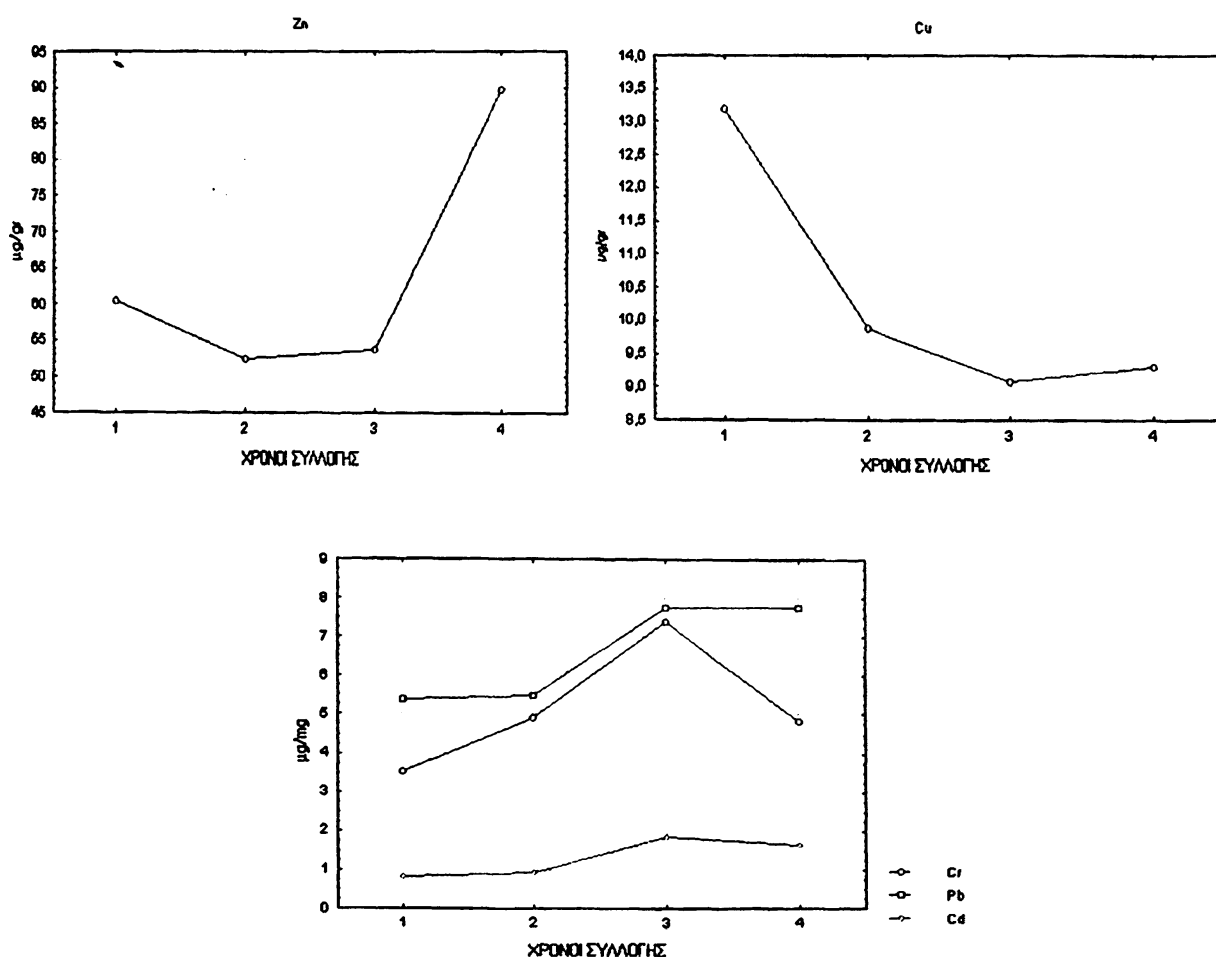


Εικ. 3.23. Ποικ. Π-ρΗ 1: Μεταβολές των Zn, Cu, Cr, Pb, Cd συναρτήσει του χρόνου συλλογής των φύλλων.



Στις ομάδες των φυτών που μεγάλωσαν σε συνθήκες εδαφικού pH 2 (εικ.3.24), παρουσιάζεται σχεδόν ανάλογη με τις ομάδες του εδαφικού pH 1 αυξητική τάση συσσώρευσης των **Pb** και **Cd** από τα γηραιότερα (χρόνος 1) στα νεώτερα (χρόνος 4) φύλλα, ενώ το **Cr** παρουσιάζει αύξηση από τον χρόνο 1 στον χρόνο 3 που ακολουθείται από μείωση στον χρόνο 4.

Από τα διαγράμματα φαίνεται επίσης ότι ο **Cu** μειώνεται από τον χρόνο 1 στον χρόνο 4 από 13,200 $\mu\text{g/g}$ σε 9,308 $\mu\text{g/g}$ και ότι ο **Zn** σε συνθήκες εδαφικού pH 2 αυξάνεται από τον χρόνο 1 στον χρόνο 4, παρόλο που οι μέσες τιμές στους χρόνους 2 (52,360 $\mu\text{g/g}$) και 3 (53,768 $\mu\text{g/g}$) είναι μικρότερες σε σχέση με τον χρόνο 1 (60,364 $\mu\text{g/g}$).



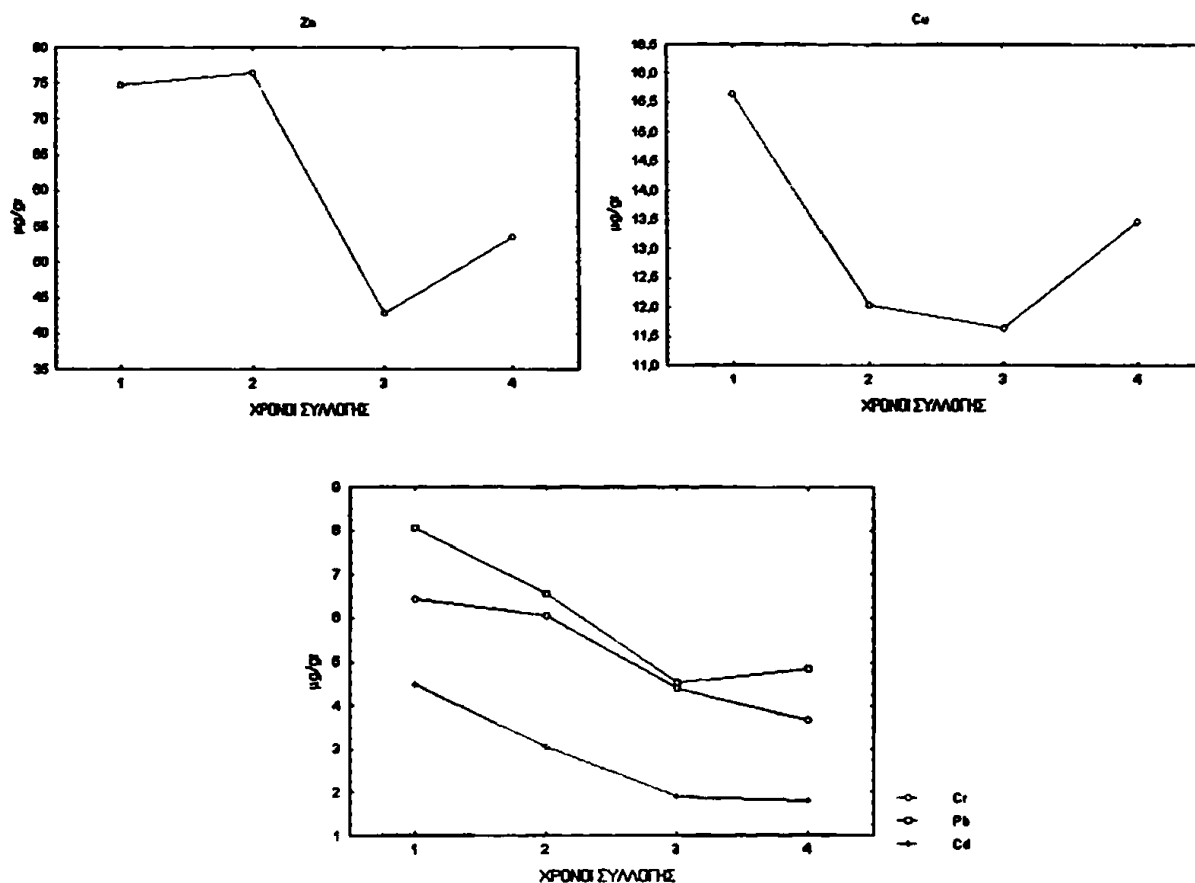
Εικ. 3.24. Ποικ. Π-pH 2: Μεταβολές των Zn, Cu, Cr, Pb, Cd συναρτήσει του χρόνου συλλογής των φύλλων.

Φαίνεται λοιπόν ότι το εδαφικό pH δεν αποτελεί και για τις 2 ποικιλίες τον κύριο παράγοντα μεταβολής των επιπέδων των μετάλλων (με επιφύλαξη για τα Zn, Cu) στα φύλλα των φυτών καπνού που αναπτύχθηκαν στις αναφερθείσες πειραματικές συνθήκες.

3.1.3. ΕΠΙΠΕΔΑ ΜΕΤΑΛΛΩΝ ΣΥΝΑΡΤΗΣΕΙ ΧΡΟΝΟΥ ΣΥΛΛΟΓΗΣ ΚΑΙ ΑΝΕΞΑΡΤΗΤΩΣ pH ΚΑΙ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ

α) ΠΟΙΚΙΛΙΑ Ι

Στην ποικιλία Ι από την ανάλυση διακύμανσης διαπιστώθηκε ότι υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις συγκεντρώσεις όλων των μετάλλων μεταξύ των διαφόρων χρόνων συλλογής των φύλλων, ανεξαρτήτως εδαφικού pH.



Εικ. 3.25. Ποικ. Ι: Μεταβολές των Zn, Cu, Cr, Pb, Cd συναρτήσει του χρόνου συλλογής των φύλλων.

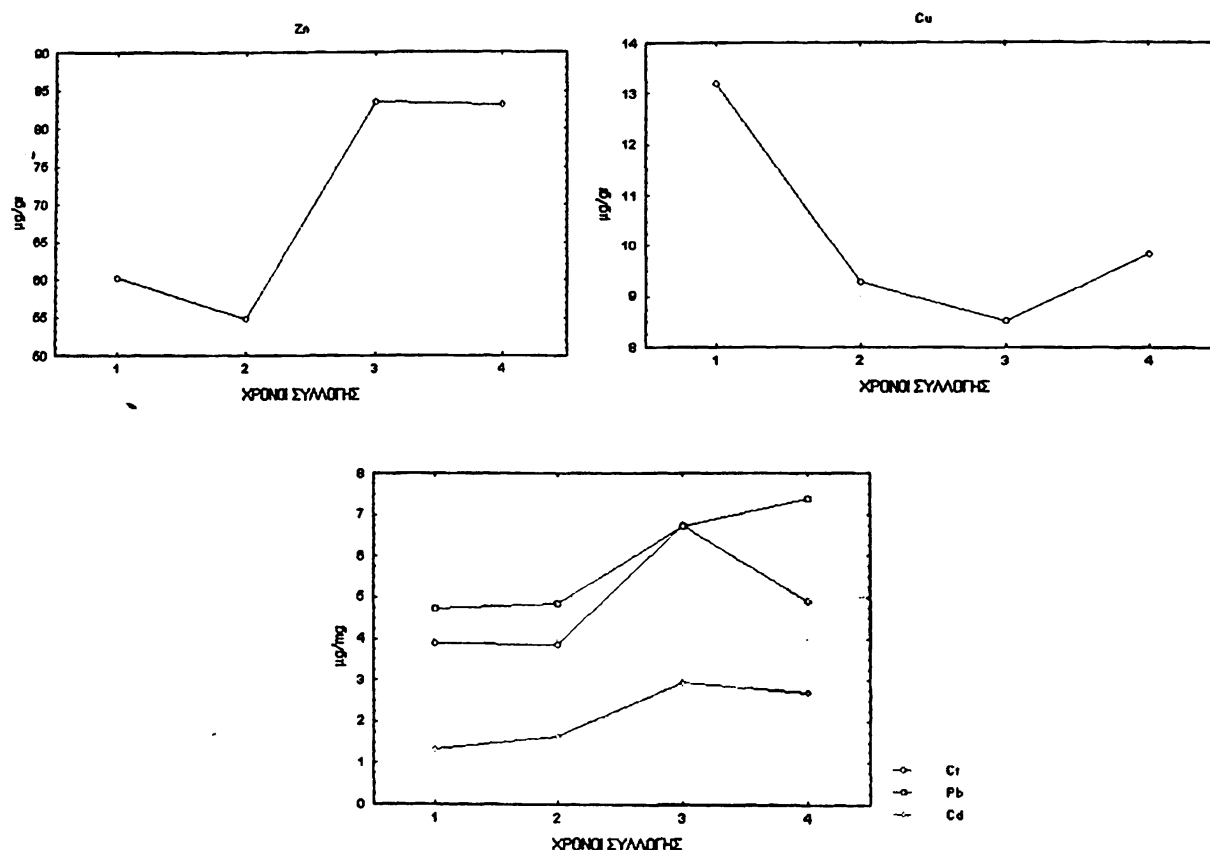
Από τα αποτελέσματα (εικ.3.25) μας παρατηρούμε ότι το **Cd μειώνεται** από 4,489 $\mu\text{g/g}$ στον χρόνο 1 σε 1,791 $\mu\text{g/g}$ στον χρόνο 4, ο **Pb μειώνεται** από 8,063 $\mu\text{g/g}$ στον χρόνο 1 σε 4,840 $\mu\text{g/g}$ στον χρόνο 4, και το **Cr μειώνεται** από 6,428 $\mu\text{g/g}$ στον χρόνο 1 σε 3,658 $\mu\text{g/g}$ στον χρόνο 4.

Στο διάγραμμα επίσης φαίνεται ότι ο **Cu μειώνεται** από 15,639 $\mu\text{g/g}$ στον χρόνο 1 σε 11,637 $\mu\text{g/g}$ στον χρόνο 3 και στην συνέχεια αυξάνεται σε 13,469 $\mu\text{g/g}$ στον χρόνο 4.

Ο **Zn** επίσης **μειώνεται** από 74,676 $\mu\text{g/g}$ στον χρόνο 1 σε 53,491 $\mu\text{g/g}$ στον χρόνο 4, παρόλο που η μέγιστη συσσώρευση εμφανίζεται στον χρόνο 2 (μέση τιμή = 76,413 $\mu\text{g/g}$) και η ελάχιστη συσσώρευση εμφανίζεται στον χρόνο 3 (μέση τιμή = 42,872 $\mu\text{g/g}$).

β) ΠΟΙΚΙΛΙΑ II

Στην ποικιλία II, από την ανάλυση διακύμανσης διαπιστώθηκε ότι υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις συγκεντρώσεις όλων των μετάλλων μεταξύ των διαφόρων χρόνων συλλογής των φύλλων, ανεξαρτήτως εδαφικού pH.



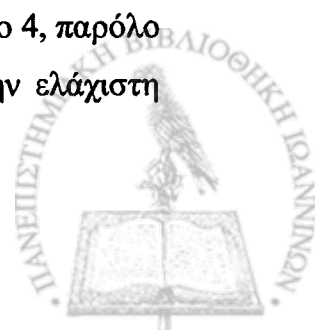
Εικ. 3.26. Ποικ. II: Μεταβολές των Zn, Cu, Cr, Pb, Cd συναρτήσει του χρόνου συλλογής των φύλλων.

Από τα αποτελέσματα μας (εικ.3.26), παρατηρούμε ότι το **Cd** αυξάνεται από 1,317 $\mu\text{g/g}$ στον χρόνο 1 σε 2,678 $\mu\text{g/g}$ στον χρόνο 4 και ο **Pb** αυξάνεται από 4,708 $\mu\text{g/g}$ στον χρόνο 1 σε 7,371 $\mu\text{g/g}$ στον χρόνο 4.

Επίσης, το **Cr** αυξάνεται από 3,885 $\mu\text{g/g}$ στον χρόνο 1 σε 6,743 $\mu\text{g/g}$ στον χρόνο 3 και ακολουθεί μείωση σε 4,893 $\mu\text{g/g}$ στον χρόνο 4.

Όσον αφορά τον **Cu**, παρατηρείται μείωση της συγκέντρωσης από 13,174 $\mu\text{g/g}$ στον χρόνο 1 σε 8,498 $\mu\text{g/g}$ στον χρόνο 3 και ακολουθεί μικρή αύξηση σε 9,818 $\mu\text{g/g}$ στον χρόνο 4.

Ο **Zn** αυξάνεται από 60,214 $\mu\text{g/g}$ στον χρόνο 1 σε 83,004 $\mu\text{g/g}$ στον χρόνο 4, παρόλο που εμφανίζει τη μέγιστη συσσώρευση (=83,372 $\mu\text{g/g}$) στον χρόνο 3 και την ελάχιστη συσσώρευση (=54,724 $\mu\text{g/g}$) στον χρόνο 2.



3.1.4. ΕΠΙΠΕΔΑ ΜΕΤΑΛΛΩΝ ΣΥΝΑΡΤΗΣΕΙ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΝΕΞΑΡΤΗΤΩΣ ΧΡΟΝΟΥ ΣΥΛΛΟΓΗΣ

α) ΠΟΙΚΙΛΙΑ Ι – pH 1

Στην ποικιλία Ι σε συνθήκες pH 1, από την ανάλυση διακύμανσης παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές στις συγκεντρώσεις όλων των μετάλλων εκτός του Cd ($p=0,09$) μεταξύ των διαφόρων ομάδων υποστρώματος.

Από τα αποτελέσματα μας (εικ.3.27) παρατηρείται ότι ο Cu είναι σημαντικά αυξημένος (μέση τιμή = 22,159μg/g) στην ομάδα 0%, ενώ στις άλλες ομάδες η συγκέντρωση του μειώνεται σε τιμές που κυμαίνονται από 11,776μg/g (ομάδα 10%), έως 13,953μg/g (ομάδα 20%).

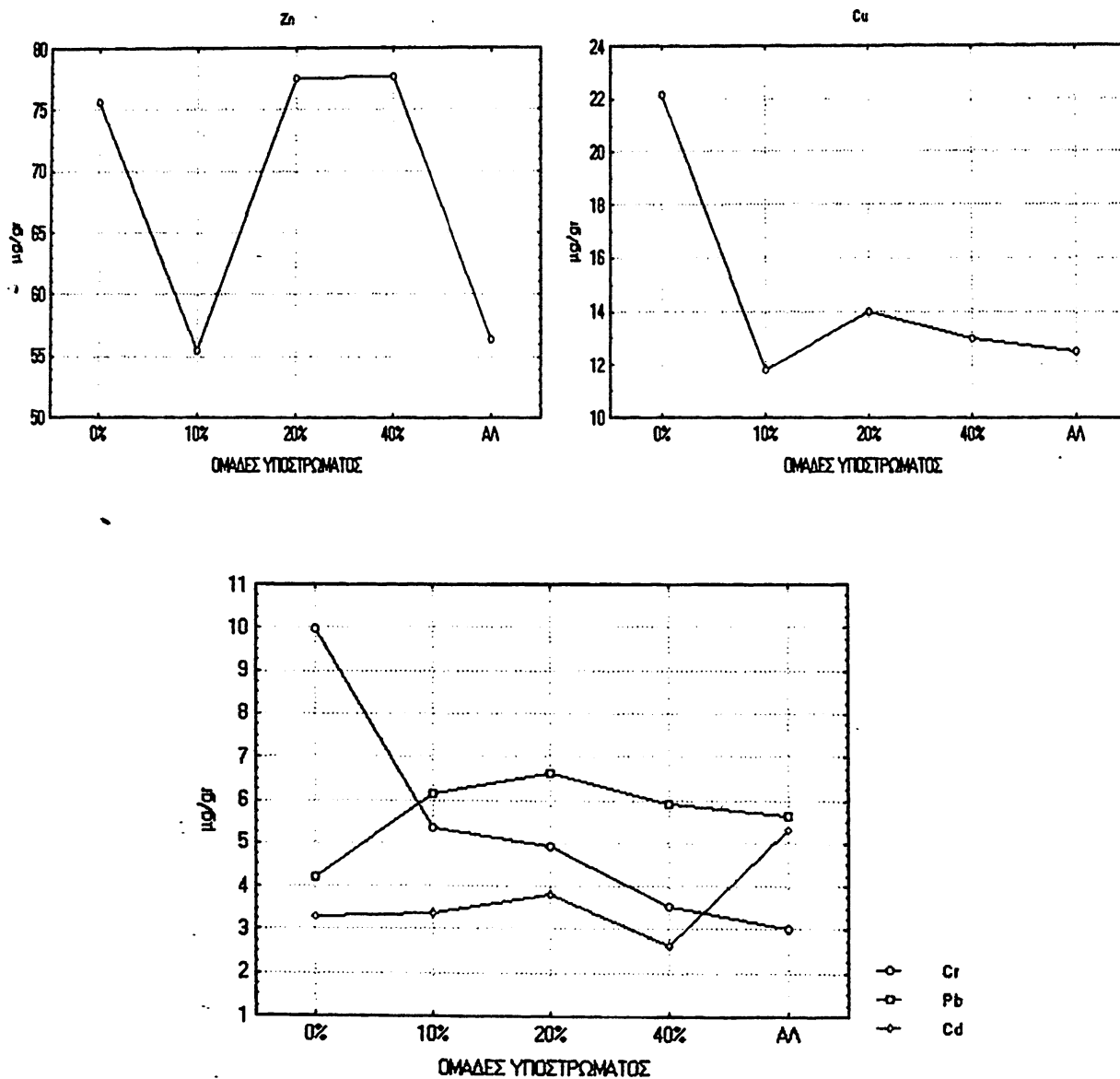
Το Cr επίσης φαίνεται να είναι σημαντικά αυξημένο στην ομάδα φυτών που μεγάλωσαν σε έδαφος χωρίς οργανική ή ανόργανη λίπανση (μέση τιμή = 9,987μg/g), ενώ η συγκέντρωση του μειώνεται σταδιακά από 5,351μg/g στην ομάδα 10% σε 3,032μg/g στην ομάδα ΑΛ (έδαφος με ανόργανη λίπανση).

Όσον αφορά το Pb, τη μικρότερη συσσώρευση εμφανίζει η ομάδα 0% (4,199μg/g), ενώ η εφαρμογή λίπανσης (οργανικής και ανόργανης) έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της τιμής από 5,638μg/g (ομάδα ΑΛ) έως 6,596μg/g (ομάδα 20%).

Η συγκέντρωση του Zn μειώνεται σημαντικά (από 75,647μg/g στην ομάδα 0% σε 55,418μg/g στην ομάδα 10%) με την εφαρμογή λάσπης σε αναλογία 10%, ενώ η αύξηση του ποσοστού της οργανικής ουσίας (ομάδες 20% και 40%) προκαλεί αύξηση στα επίπεδα (77,552μg/g και 77,736μg/g αντίστοιχα). Η εφαρμογή ανόργανης λίπανσης (ομάδα ΑΛ) δεν φαίνεται να προκαλεί συσσώρευση Zn (μέση τιμή = 56,378μg/g).

Τέλος το Cd, κάτω από συνθήκες εδαφικού pH 1, παρόλο που δεν διαφέρει στατιστικά σημαντικά στις διάφορες εδαφικές συγκεντρώσεις, παρουσιάζει μέγιστη συσσώρευση στην ομάδα ΑΛ (μέση τιμή = 5,291μg/g) και ελάχιστη συσσώρευση στην ομάδα 40% (2,602μg/g).





Εικ. 3.27. Ποικ. Ι- pH 1: Συγκεντρώσεις των Zn, Cu, Cr, Pb, Cd στις ομάδες υποστρωμάτων.

β) ΠΟΙΚΙΛΙΑ Ι – pH 2

Σε συνθήκες εδαφικού pH 2 (αλκαλικό) από την ανάλυση διακύμανσης βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις συγκεντρώσεις όλων των μετάλλων μεταξύ των πέντε ομάδων υποστρώματος. Οι μικρότερες διαφορές παρατηρούνται για τα Zn ($p=0,03$) και Pb ($p=0,03$).

Από τα αποτελέσματα μας (εικ.3.28), παρατηρούμε ότι ο Cu είναι σημαντικά αυξημένος (μέση τιμή = 19,045μg/g) στην ομάδα 0%, και η συγκέντρωση του μειώνεται με την εφαρμογή οργανικής ουσίας από 7,363μg/g στην ομάδα 20% έως 9,835μg/g στην ομάδα 10%. Στην ομάδα ΑΛ (έδαφος με ανόργανη λίπανση), παρατηρείται επίσης αυξημένη συσσώρευση Cu (μέση τιμή = 13,879μg/g), αλλά σε μικρότερα επίπεδα από την ομάδα 0%.

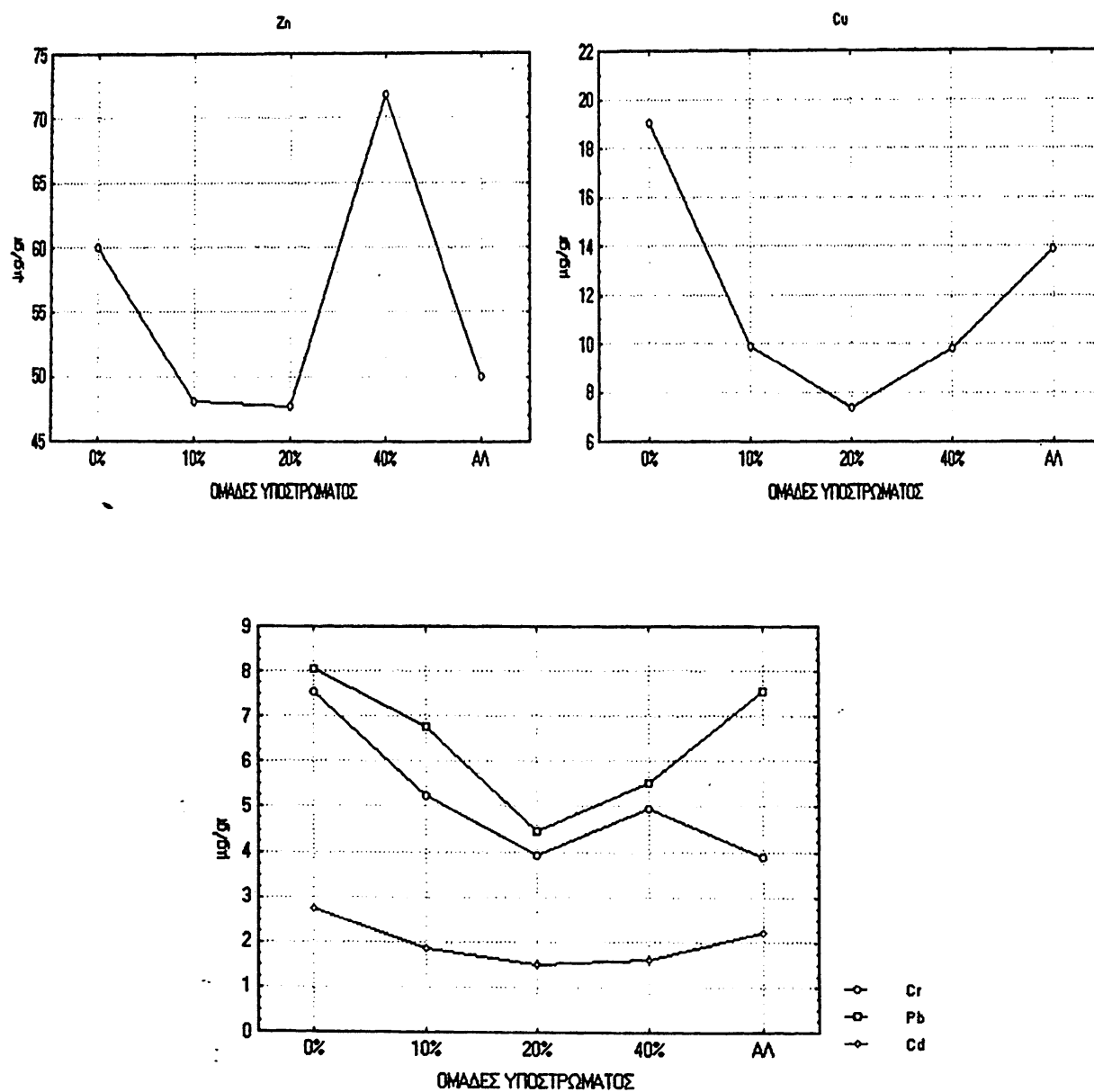
Το Cr φαίνεται να είναι επίσης σημαντικά αυξημένο στην ομάδα ελέγχου (ομάδα 0%), με μέση τιμή 7,545μg/g, ενώ η εφαρμογή λίπανσης φαίνεται να προκαλεί μείωση στα επίπεδά του από 3,878μg/g στην ομάδα ΑΛ έως 5,239μg/g στην ομάδα 10%.

Όσον αφορά τον Pb, μέγιστη μέση τιμή παρουσιάζει στην ομάδα 0% (μέση τιμή = 8,045μg/g) και στην ομάδα ΑΛ (μέση τιμή = 7,532μg/g). Η εφαρμογή λάσπης προκαλεί μικρότερη συσσώρευση Pb και οι συγκεντρώσεις του κυμαίνονται από 4,431μg/g στην ομάδα 20% έως 6,766μg/g στην ομάδα 10%.

Η συγκέντρωση του Zn μειώνεται από 59,980μg/g στην ομάδα 0% σε 48,047μg/g στην ομάδα 10% και 47,679μg/g στην ομάδα 20%, ενώ η εφαρμογή μεγαλύτερης αναλογίας λάσπης (ομάδα 40%), φαίνεται να προκαλεί αύξηση συγκέντρωσης (μέση τιμή = 71,839μg/g). Στην ομάδα ΑΛ, τα επίπεδα του Zn είναι σημαντικά μικρότερα (μέση τιμή = 49,978μg/g).

Όσον αφορά το Cd, παρατηρούμε ότι μέγιστη συσσώρευση εμφανίζει η ομάδα φυτών που μεταφυτεύτηκαν σε έδαφος χωρίς οργανική ή ανόργανη λίπανση (μέση τιμή = 2,756μg/g), και η αμέσως μικρότερη μέση τιμή εμφανίζεται στην ομάδα ΑΛ (μέση τιμή = 2,197μg/g). Επίσης παρατηρούμε ότι στις ομάδες 10%, 20% και 40% οι συγκεντρώσεις του Cd είναι μικρότερες σε σχέση με τις τιμές των ομάδων 0% και ΑΛ (1,840μg/g, 1,505μg/g και 1,589μg/g αντίστοιχα).





Εικ. 3.28. Ποικ. Ι-ρΗ 2 : Συγκεντρώσεις των Zn, Cu, Cr, Pb, Cd στις ομάδες υποστρωμάτων.

γ) ΠΟΙΚΙΛΙΑ II - pH 1

Στην ποικιλία II σε συνθήκες pH 1, από την ανάλυση διακύμανσης παρατηρούνται ισχυρά σημαντικές διαφορές ($p \leq 0,003$) στις συγκεντρώσεις όλων των μετάλλων μεταξύ των διαφόρων ομάδων υποστρώματος, εκτός του Pb όπου οι διαφορές είναι οριακές ($p = 0,056$).

Στα διαγράμματα που ακολουθούν (εικ.3.29), φαίνεται ότι ο Cu εμφανίζεται σημαντικά αυξημένος (μέση τιμή = 15,351 $\mu\text{g/g}$) στην ομάδα 0% σε σχέση με τις άλλες ομάδες. Στις άλλες ομάδες η συγκέντρωση Cu είναι σχεδόν σταθερή (από 8,003 $\mu\text{g/g}$ έως 8,495 $\mu\text{g/g}$), με την εξαίρεση της ομάδας ΑΛ όπου η μέση τιμή αυξάνεται σε 9,432 $\mu\text{g/g}$.

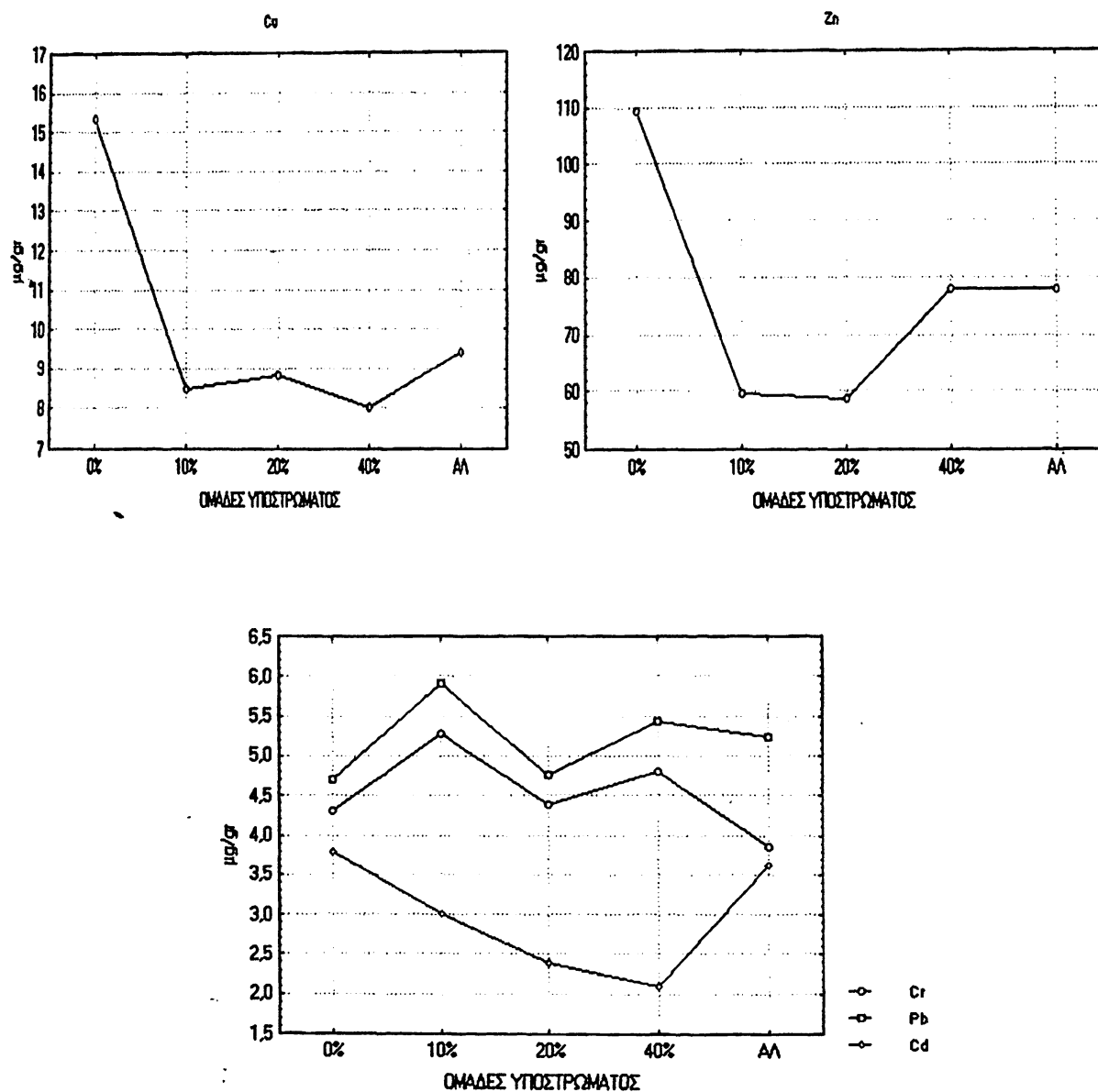
Το Cr παρουσιάζεται σχεδόν σταθερό στις 5 ομάδες υποστρώματος, με ελάχιστη συγκέντρωση (μέση τιμή = 3,859 $\mu\text{g/g}$) στην ομάδα ΑΛ και μέγιστη συσσώρευση (μέση τιμή = 5,271 $\mu\text{g/g}$) στην ομάδα 20%.

Όσον αφορά το Cd, μέγιστη μέση τιμή = 3,796 $\mu\text{g/g}$ εμφανίζει στην ομάδα φυτών που μεταφυτεύτηκαν σε έδαφος χωρίς οργανική ή ανόργανη λίπανση (ομάδα 0%), ενώ στην ομάδα ΑΛ παρατηρείται η αμέσως μικρότερη συγκέντρωση (μέση τιμή = 3,609 $\mu\text{g/g}$). Η εφαρμογή λάσπης προκαλεί μείωση στην τιμή του Cd με αντιστρόφως ανάλογο τρόπο, από 2,995 $\mu\text{g/g}$ στην ομάδα 10%, σε 2,102 $\mu\text{g/g}$ στην ομάδα 40%.

Τα επίπεδα του Zn μειώνονται σημαντικά (από 109,301 $\mu\text{g/g}$ σε 59,392 $\mu\text{g/g}$ και 58,737 $\mu\text{g/g}$) στις ομάδες 10% και 20% αντίστοιχα, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (0%). Όταν το έδαφος αναμίχθηκε με οργανική ουσία σε αναλογία 40% (ομάδα 40%) η συγκέντρωση Zn βρέθηκε ότι αυξάνεται σε 77,818 $\mu\text{g/g}$, τιμή που προσεγγίζει την συγκέντρωση στην ομάδα ΑΛ (μέση τιμή = 77,902 $\mu\text{g/g}$).

Όσον αφορά τον Pb, παρόλο που διαφέρει οριακά στις διάφορες εδαφικές συγκεντρώσεις ($p = 0,056$), παρουσιάζει μέγιστη συσσώρευση στην ομάδα 10% (μέση τιμή = 5,909 $\mu\text{g/g}$) και ελάχιστη συσσώρευση στην ομάδα 0% (μέση τιμή = 4,706 $\mu\text{g/g}$). Οι συγκεντρώσεις στις υπόλοιπες ομάδες είναι σχεδόν σταθερές.





Εικ. 3.29. Ποικ. Π- pH 1: Συγκεντρώσεις των Zn, Cu, Cr, Pb, Cd στις ομάδες υποστρωμάτων.



δ) ΠΟΙΚΙΛΙΑ II – pH 2

Στην ποικιλία II σε συνθήκες εδαφικού pH 2, από την ανάλυση διακύμανσης διαπιστώνονται ισχυρά στατιστικές διαφορές ($p \leq 0,001$) μεταξύ των διαφόρων ομάδων υποστρώματος, στις συγκεντρώσεις όλων των μετάλλων εκτός του Pb και του Cd.

Ο Cu εμφανίζεται σημαντικά αυξημένος (μέση τιμή = 14,643μg/g) στην ομάδα 0% σε σχέση με τις ομάδες 10%, 20% και 40% όπου η συγκέντρωση είναι σταθερή και κυμαίνεται από 8,459μg/g στην ομάδα 10% έως 8,700μg/g στην ομάδα 40%. Η ομάδα ΑΛ παρουσιάζει αύξηση στη μέση τιμή σε σχέση με τις ομάδες όπου εφαρμόστηκε οργανική λίπανση (μέση τιμή = 11,424μg/g).

Για το Cr παρατηρείται επίσης μείωση των επιπέδων του από την ομάδα 0% στις υπόλοιπες ομάδες όπου εφαρμόστηκε οργανική ή ανόργανη λίπανση.

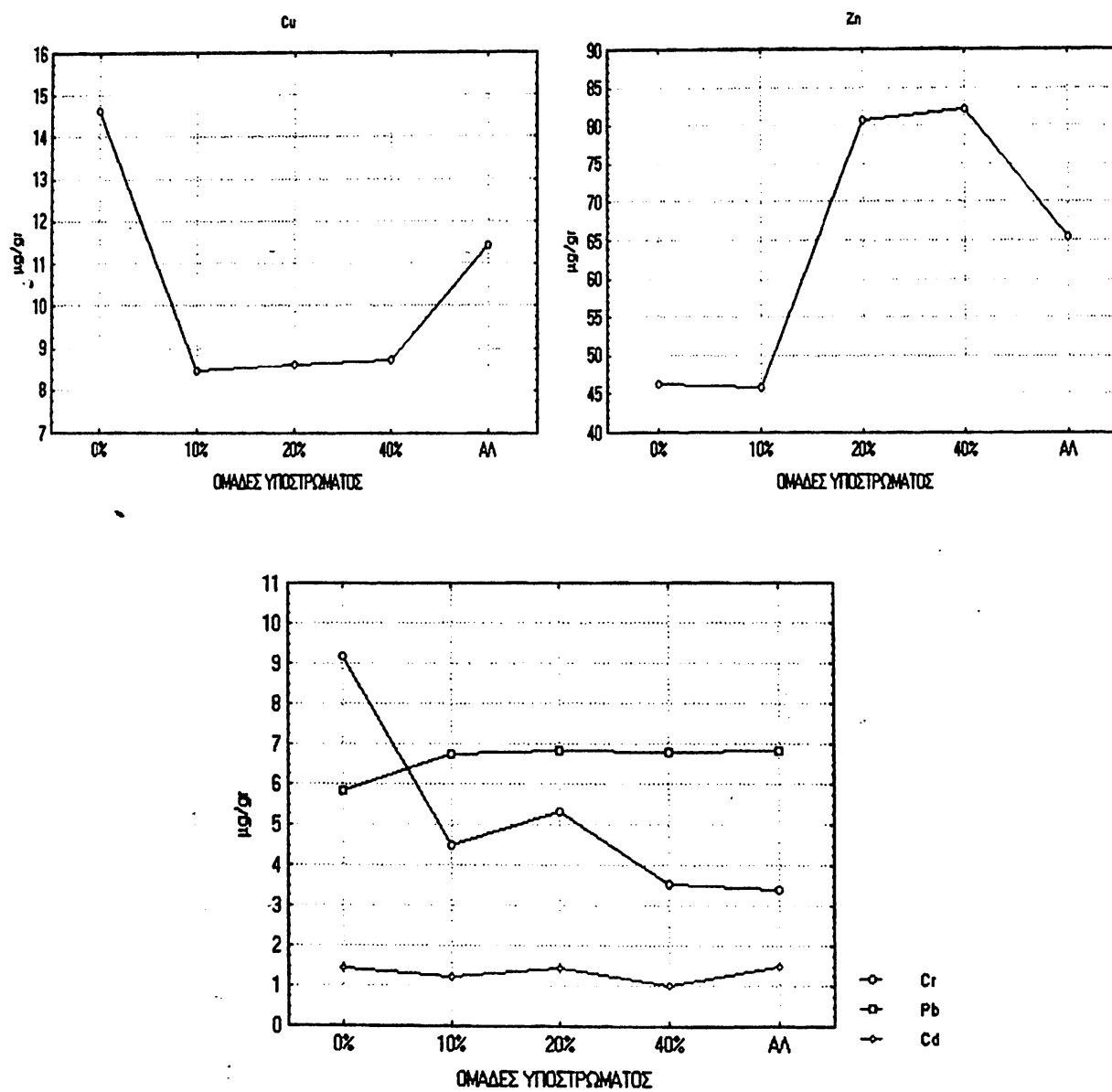
Έτσι, η μέγιστη συγκέντρωση εμφανίζεται στην ομάδα 0% (9,183μg/g), ενώ ελάχιστη μέση τιμή παρουσιάζεται στην ομάδα ΑΛ (3,377μg/g). Στις υπόλοιπες ομάδες η συγκέντρωση Cr διαφέρει ελαφρά και κυμαίνεται από 3,507μg/g στην ομάδα 40% έως 5,306μg/g στην ομάδα 20%.

Όσον αφορά τον Pb, στην ομάδα 0% παρατηρείται η ελάχιστη συσσώρευση (μέση τιμή = 5,808μg/g), ενώ ανάμιξη με οργανική ή ανόργανη λίπανση φαίνεται ότι προκαλεί μη στατιστικά σημαντική αύξηση συγκέντρωσης με μέγιστη μέση τιμή στην ομάδα 20% (=6,831μg/g).

Το Cd παρόλο που δεν διαφέρει στατιστικά σημαντικά στις 5 ομάδες υποστρώματος, παρουσιάζει μέγιστη μέση τιμή (1,465μg/g) στην ομάδα ΑΛ και ελάχιστη συγκέντρωση (1,020μg/g) στην ομάδα 40%. Τα επίπεδα Cd στην ομάδα 0% εμφανίζονται ελαφρά αυξημένα (1,432μg/g) σε σχέση με τις ομάδες 10%, 20% και 40% όπου εφαρμόστηκε οργανική ουσία.

Όσον αφορά τον Zn, παρατηρούμε ότι οι ομάδες 0% και 10% παρουσιάζουν τις μικρότερες συγκεντρώσεις (46,101μg/g και 45,721μg/g αντίστοιχα), ενώ αύξηση της αναλογίας οργανικής ουσίας σε 20% και 40% προκαλούν αύξηση της τιμής σε 80,619μg/g και 82,266μg/g αντίστοιχα. Η ομάδα ΑΛ εμφανίζεται να έχει μειωμένη συσσώρευση Zn (65,429μg/g) σε σχέση με τις ομάδες 20% και 40% (εικ.3.30).





Εικ. 3.30. Ποικ. Π-ρΗ 2 :Συγκεντρώσεις των Zn, Cu, Cr, Pb, Cd στις ομάδες υποστρωμάτων.

3.1.5. ΕΠΙΠΕΔΑ ΜΕΤΑΛΛΩΝ ΣΥΝΑΡΤΗΣΕΙ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΝΕΞΑΡΤΗΤΩΣ ΧΡΟΝΟΥ ΣΥΛΛΟΓΗΣ ΚΑΙ pH

α) ΠΟΙΚΙΛΙΑ Ι

Στην ποικιλία Ι, ανεξάρτητα από συνθήκες pH υποστρώματος, από την ανάλυση διακύμανσης προέκυψαν μερικές στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p \leq 0,002$), για όλα τα μέταλλα εκτός του Pb, μεταξύ των διαφόρων ομάδων υποστρώματος.

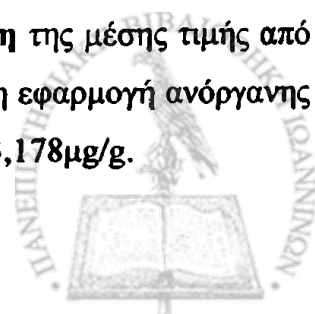
Στα αποτελέσματα μας (εικ.3.31), παρατηρούμε ότι ο Cu μειώνεται σημαντικά ($p=0,000$) από την ομάδα 0% στην ομάδα 10% (από 20,824μg/g σε 10,805μg/g). Η συγκέντρωση του Cu διατηρείται **σχεδόν σταθερή** από την ομάδα 10% στην ομάδα 40% με την αύξηση της αναλογίας της οργανικής ουσίας. Η εφαρμογή ανόργανης λίπανσης (ομάδα ΑΛ) δεν προκαλεί στατιστικά σημαντική διαφορά στην συγκέντρωση του Cu σε σχέση με την ομάδα 40% ($p > 0,05$).

Όσον αφορά το Cr, στην ομάδα 0% παρατηρείται αυξημένη στατιστικά σημαντικά συσσώρευση σε σχέση με όλες τις υπόλοιπες ομάδες.

Αύξηση της αναλογίας λάσπης προκαλεί **ελαφρά μείωση** στην συγκέντρωση Cr, από 5,295μg/g στην ομάδα 10% σε 4,236μg/g στην ομάδα 40%. Η μέση τιμή του Cr στην ομάδα ΑΛ (=3,455 μg/g) είναι στατιστικά σημαντικά μικρότερη ($p=0,000$) από την ομάδα 10%, ενώ δεν διαφέρει από τις ομάδες 20% και 40%.

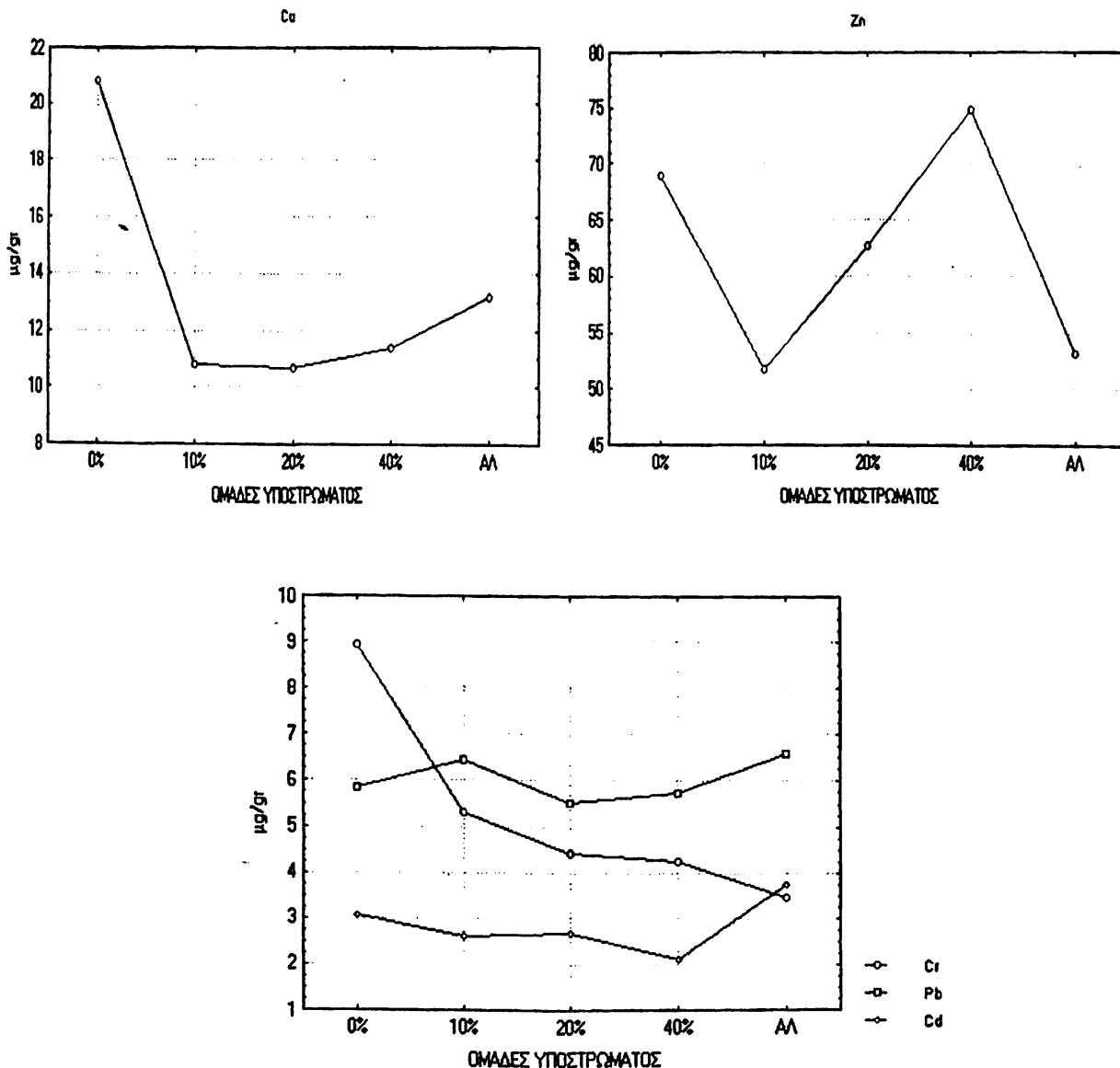
Στην ομάδα 0% το Cd εμφανίζεται με μέση τιμή 3,070μg/g. Η εφαρμογή οργανικής ουσίας σε αναλογίες 10% και 20% έχει ως αποτέλεσμα τη **μείωση** της συγκέντρωσης σε 2,612μg/g και 2,665μg/g αντίστοιχα, σε μη στατιστικά σημαντικό επίπεδο ($p > 0,05$), ενώ περαιτέρω αύξηση της αναλογίας λάσπης (ομάδα 40%), προκαλεί **μείωση** στατιστικά σημαντική ($p=0,004$) της συγκέντρωσης σε 2,096μg/g. Στην ομάδα ΑΛ τα επίπεδα Cd είναι στατιστικά σημαντικά αυξημένα ($p=0,000$) σε σχέση με την ομάδα 40%, και θα πρέπει να σημειωθεί ότι στην ομάδα αυτή παρατηρείται η μέγιστη συσσώρευση (μέση τιμή = 3,744 μg/g).

Όσον αφορά τον Zn, η συγκέντρωση του στην ομάδα 0% εμφανίζεται αυξημένη (μέση τιμή = 68,933 μg/g), παρόλο που δεν διαφέρει στατιστικά σημαντικά με τις υπόλοιπες ομάδες. Αύξηση της αναλογίας λάσπης προκαλεί **αύξηση** της μέσης τιμής από 51,732μg/g στην ομάδα 10% σε 74,787μg/g στην ομάδα 40%, ενώ η εφαρμογή ανόργανης λίπανσης (ομάδα ΑΛ) προκαλεί στατιστικά σημαντική μείωση σε 53,178μg/g.



Τέλος ο **Pb** μπορούμε να θεωρήσουμε ότι διατηρείται **σταθερός** στις 5 ομάδες, με ελάχιστη μέση τιμή ($=5,513 \mu\text{g/g}$) στην ομάδα 20% και μέγιστη συγκέντρωση ($=6,585 \mu\text{g/g}$) στην ομάδα ΑΛ. Η ομάδα 0% δεν διαφέρει στατιστικά σημαντικά από καμία άλλη ομάδα υποστρώματος, ενώ η ομάδα ΑΛ δεν διαφέρει στατιστικά σημαντικά από καμία ομάδα.

Από τα αποτελέσματα αυτά μπορούμε να πούμε με επιφύλαξη ότι στην Ποικιλία Ι η εδαφική συγκέντρωση επηρεάζεται κυρίως τα **Cu** και **Cr**.



Εικ. 3.31. Ποικ. Ι: Συγκεντρώσεις των Zn, Cu, Cr, Pb, Cd στις ομάδες υποστρωμάτων.

β) ΠΟΙΚΙΛΙΑ II

Στην ποικιλία II, ανεξάρτητα από συνθήκες εδαφικού pH, από την ανάλυση διακύμανσης διαπιστώθηκε ότι υπάρχουν ισχυρά στατιστικές διαφορές στις συγκεντρώσεις όλων των μετάλλων μεταξύ των διαφόρων ομάδων υποστρώματος. Μικρότερη διακύμανση προέκυψε για τα Cd και Pb.

Από τα αποτελέσματα μας (εικ.3.32) παρατηρούμε ότι ο Cu μειώνεται σημαντικά ($p=0,000$) από την ομάδα 0% στην ομάδα 10% (από 14,997μg/g σε 8,477μg/g), ενώ διατηρείται σχεδόν σταθερός με την αύξηση της αναλογίας της οργανικής ουσίας, από την ομάδα 10% στην ομάδα 40%.

Η εφαρμογή ανόργανης λίπανσης (ομάδα ΑΛ) φαίνεται ότι προκαλεί στατιστικά σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης Cu σε σχέση με τις ομάδες 10%, 20% και 40% (μέση τιμή ομάδας ΑΛ = 10,428μg/g).

Όσον αφορά το Cr, παρατηρείται αυξημένη συσσώρευση στην ομάδα 0% (μέση τιμή = 6,750μg/g) η οποία διαφέρει στατιστικά σημαντικά με όλες τις ομάδες.

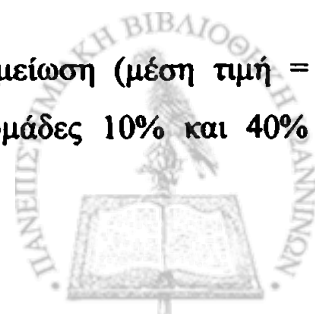
Αύξηση της αναλογίας λάσπης προκαλεί ελαφρά μείωση στην συγκέντρωση Cr, από 4,876μg/g στην ομάδα 10% σε 4,153μg/g στην ομάδα 40%. Η ελάχιστη τιμή Cr παρατηρείται στην ομάδα ΑΛ (μέση τιμή = 3,618μg/g) και δεν διαφέρει στατιστικά σημαντικά από τα επίπεδα των άλλων ομάδων.

Το Cd παρουσιάζει μέγιστη συσσώρευση στην ομάδα 0% (μέση τιμή = 2,614μg/g) που όμως διαφέρει στατιστικά σημαντικά ($p=0,04$) μόνο με την ομάδα 40%, όπου εμφανίζεται η ελάχιστη συγκέντρωση (μέση τιμή = 1,516μg/g). Αύξηση της αναλογίας λάσπης από την ομάδα 10% στην ομάδα 40% προκαλεί μείωση της τιμής από 2,100μg/g σε 1,561μg/g. Στην ομάδα ΑΛ, η συγκέντρωση Cd αυξάνεται σε 2,537μg/g που διαφέρει όμως στατιστικά σημαντικά μόνο με τις ομάδες 20% και 40% ($p=0,02$ και 0,000 αντίστοιχα).

Όσον αφορά τον Zn, η συγκέντρωση του στην ομάδα 0% εμφανίζεται αυξημένη στατιστικά σημαντικά σε σχέση με τις ομάδες 10% και 20%, ενώ διαφορά παρατηρείται και με την ομάδα 40% όπου εμφανίζεται η μέγιστη συσσώρευση (μέση τιμή = 80,042μg/g).

Αύξηση της αναλογίας οργανικής ουσίας προκαλεί αύξηση της συγκέντρωσης Zn (από 52,557μg/g στην ομάδα 10% σε 80,042μg/g στην ομάδα 40%).

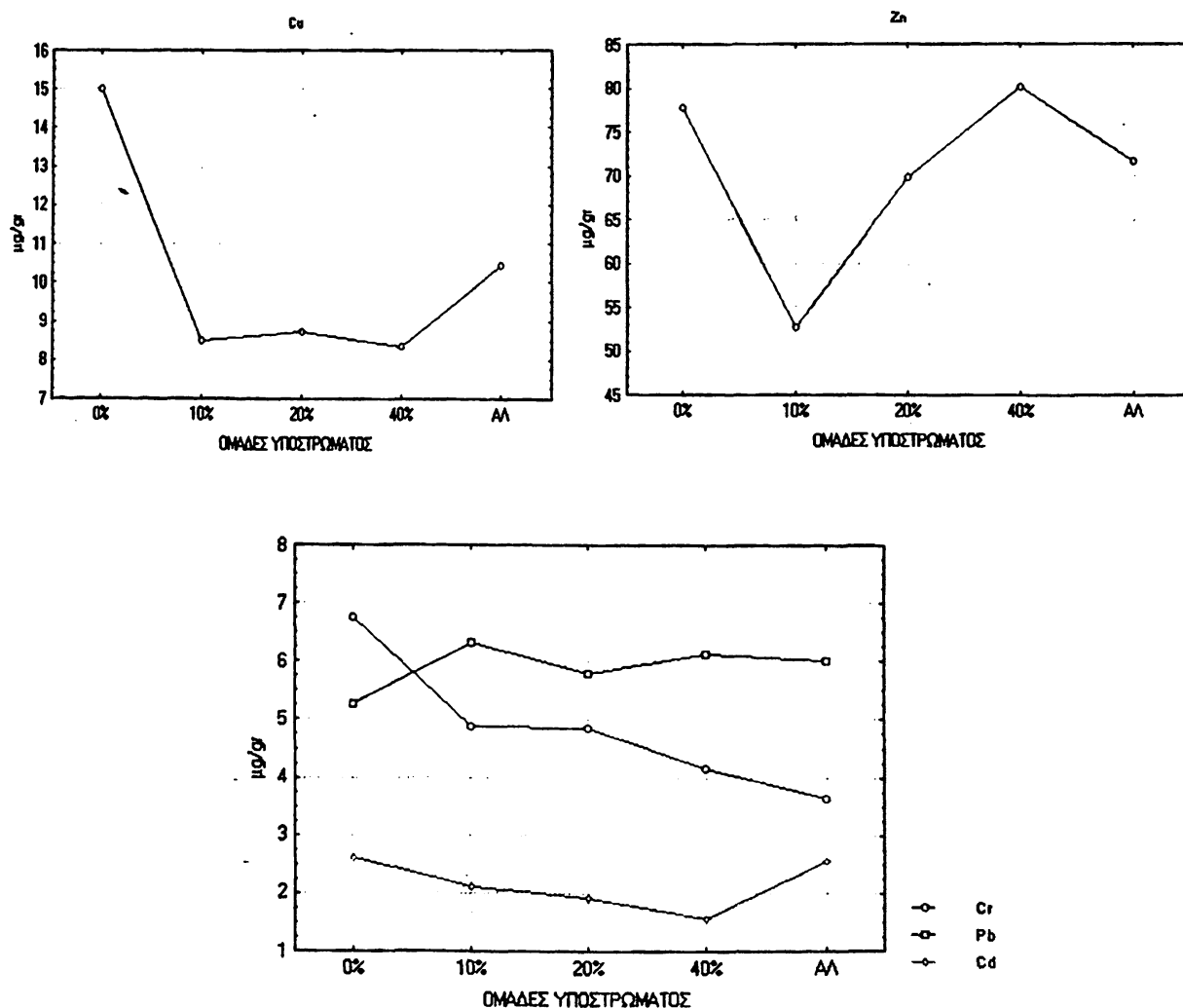
Η εφαρμογή ανόργανης λίπανσης (ομάδα ΑΛ) προκαλεί μείωση (μέση τιμή = 71,665μg/g) που διαφέρει στατιστικά σημαντικά μόνο με τις ομάδες 10% και 40% ($p=0,002$ και $p=0,04$ αντίστοιχα).



Τέλος ο **Pb** παρουσιάζει ελάχιστη συσσώρευση στην ομάδα 0% (μέση τιμή = 5,257μg/g) που διαφέρει στατιστικά σημαντικά μόνο με την ομάδα 10% ($p=0,01$) και οριακά με τις ομάδες 40% και ΑΛ ($p=0,05$).

Εφαρμογή οργανικής λίπανσης έχει ως αποτέλεσμα την ελαφρά αύξηση στα επίπεδα **Pb**, που όμως διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε σχέση με την 0% μόνο στην ομάδα 10% ($p=0,01$) και οριακά στις ομάδες 40% και ΑΛ ($p=0,05$).

Η ομάδα ΑΛ όπου εφαρμόστηκε ανόργανη λίπανση δεν διαφέρει σημαντικά στην συγκέντρωση **Pb** με καμία ομάδα όπου εφαρμόστηκε οργανική λίπανση.



Εικ. 3.32. Ποικ. Π-ρΗ : Συγκεντρώσεις των Zn, Cu, Cr, Pb, Cd στις ομάδες υποστρωμάτων.

3.1.6. ΕΠΙΠΕΔΑ ΜΕΤΑΛΛΩΝ ΣΥΝΑΡΤΗΣΕΙ pH

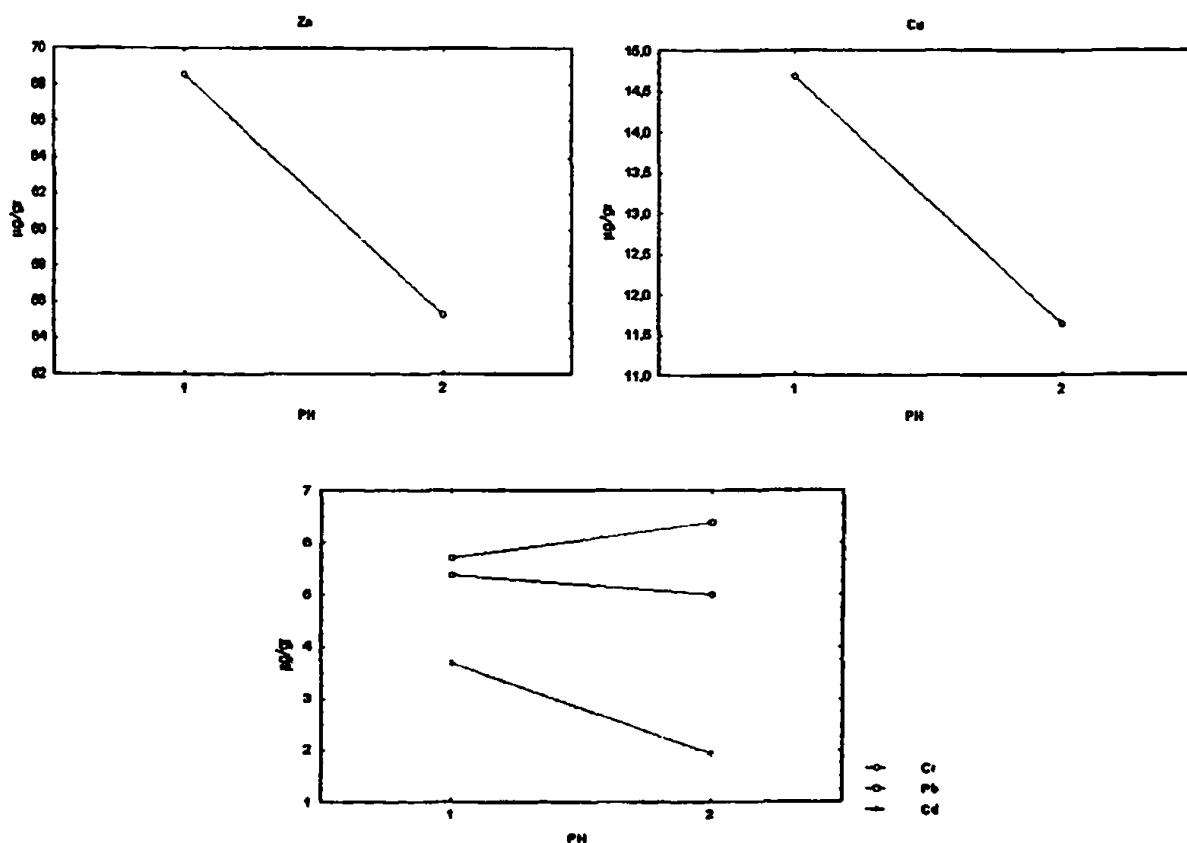
α) ΠΟΙΚΙΛΙΑ Ι

Από την σύγκριση τιμών προέκυψε ότι στην ποικιλία Ι μεταξύ του pH 1 και του pH 2 υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις συγκεντρώσεις όλων των μετάλλων, εκτός από το Cr. Από τα αποτελέσματα του κεφαλαίου 3.1.2 διαπιστώσαμε ήδη ότι τα αρχικά επίπεδα των μετάλλων επηρεάζονται από το pH και ότι οι αρχικές συγκεντρώσεις των Cd, Zn, Cr και εν μέρει του Cu είναι μεγαλύτερες σε συνθήκες όξινου pH, ενώ οι αρχικές συγκεντρώσεις του Pb είναι μεγαλύτερες σε συνθήκες αλκαλικού pH.

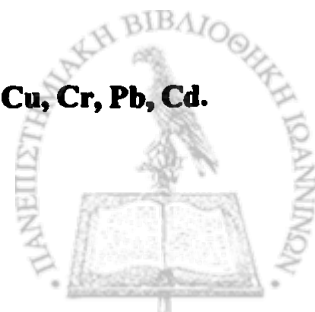
Η επισήμανση αυτή επιβεβαιώθηκε και κατά τον υπολογισμό της διαφοράς συγκεντρώσεως των μετάλλων μεταξύ των δύο pH (εικ.3.33).

Έτσι, στο διάγραμμα φαίνεται ότι ο Pb είναι αυξημένος ($p=0,014$) και ο Cu και το Cd είναι μειωμένα ($p=0,003$ και $p=0,000$ αντίστοιχα) στο pH 2 σε σχέση με το pH 1.

Ο Zn είναι επίσης στατιστικά σημαντικά μειωμένος σε συνθήκες εδαφικού pH 2 σε σχέση με το pH 1 ($p=0,002$).



Εικ. 3.33. Ποικ. Ι- pH 1 και pH 2 : Συγκεντρώσεις των Zn, Cu, Cr, Pb, Cd.

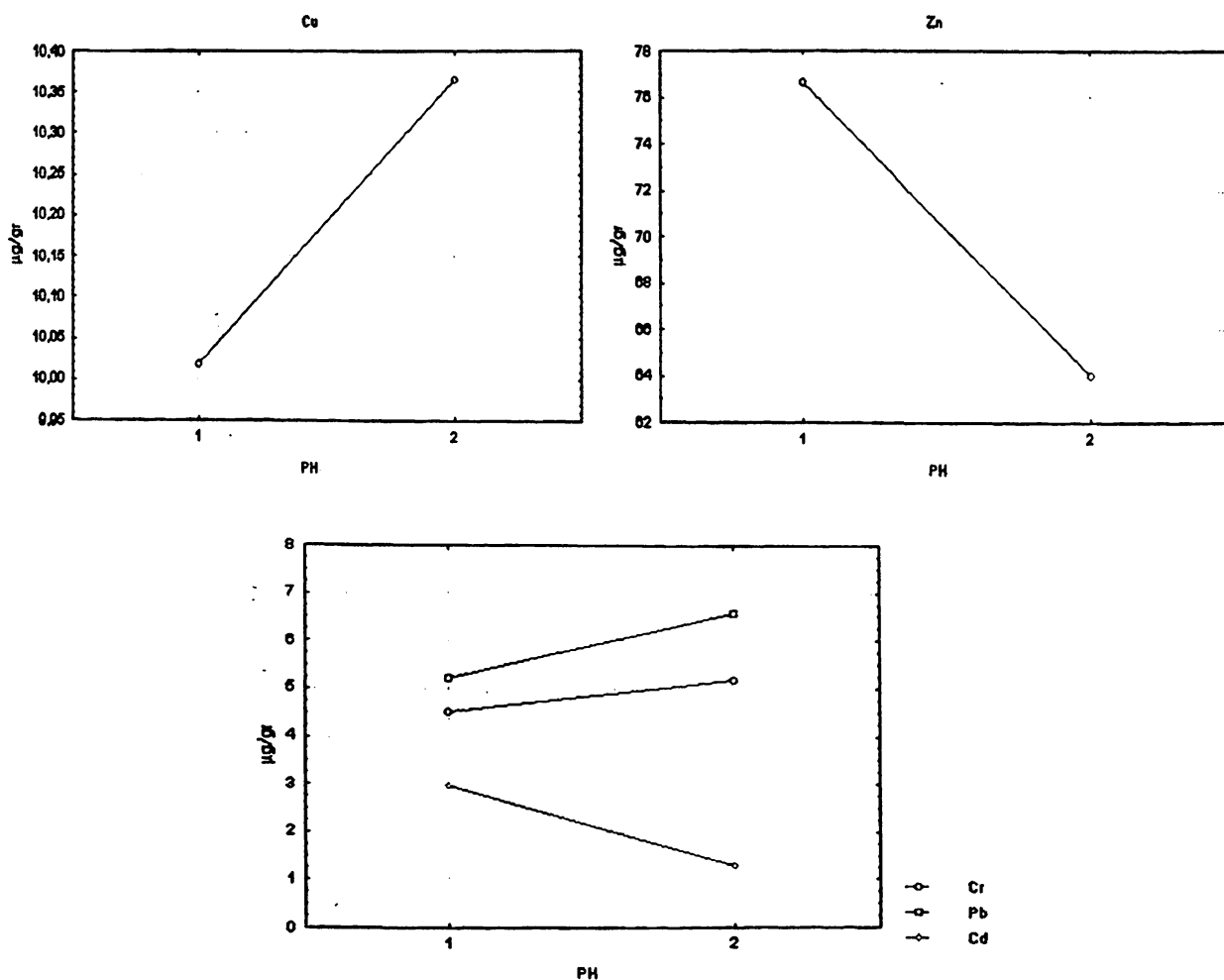


β) ΠΟΙΚΙΛΙΑ ΙΙ

Από την σύγκριση τιμών προέκυψε ότι στην ποικιλία ΙΙ υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις συγκεντρώσεις των Cd, Zn και Pb μεταξύ των ομάδων εδαφικού pH 1 και των ομάδων εδαφικού pH 2, ενώ τα Cu και Cr δεν βρέθηκαν ότι διαφέρουν στατιστικά σημαντικά στα δύο pH. Όπως επισημάνθηκε και στο κεφάλαιο 3.1.2, τα αρχικά επίπεδα των Cr, Pb, και Cd φαίνεται ότι επηρεάζονται από το pH στην Ποικιλία ΙΙ, με τον τρόπο που αναφέρθηκε ήδη για την Ποικιλία Ι.

Στα διαγράμματα (εικ.3.34) φαίνεται ότι ο Pb είναι σημαντικά αυξημένος ($p=0,000$) και ότι το Cd είναι σημαντικά μειωμένο ($p=0,000$) στο pH 2 σε σχέση με το pH 1.

Ο Zn και στην ποικιλία ΙΙ είναι στατιστικά σημαντικά μειωμένος σε συνθήκες εδαφικού pH 2 σε σχέση με το pH 1 ($p=0,01$).



Εικ. 3.34. Ποικ. ΙΙ- pH 1 και pH 2 : Συγκεντρώσεις των Zn, Cu, Cr, Pb, Cd.



3.1.7. ΕΠΙΠΕΔΑ ΜΕΤΑΛΛΩΝ ΣΥΝΑΡΤΗΣΕΙ ΠΟΙΚΙΛΙΑΣ

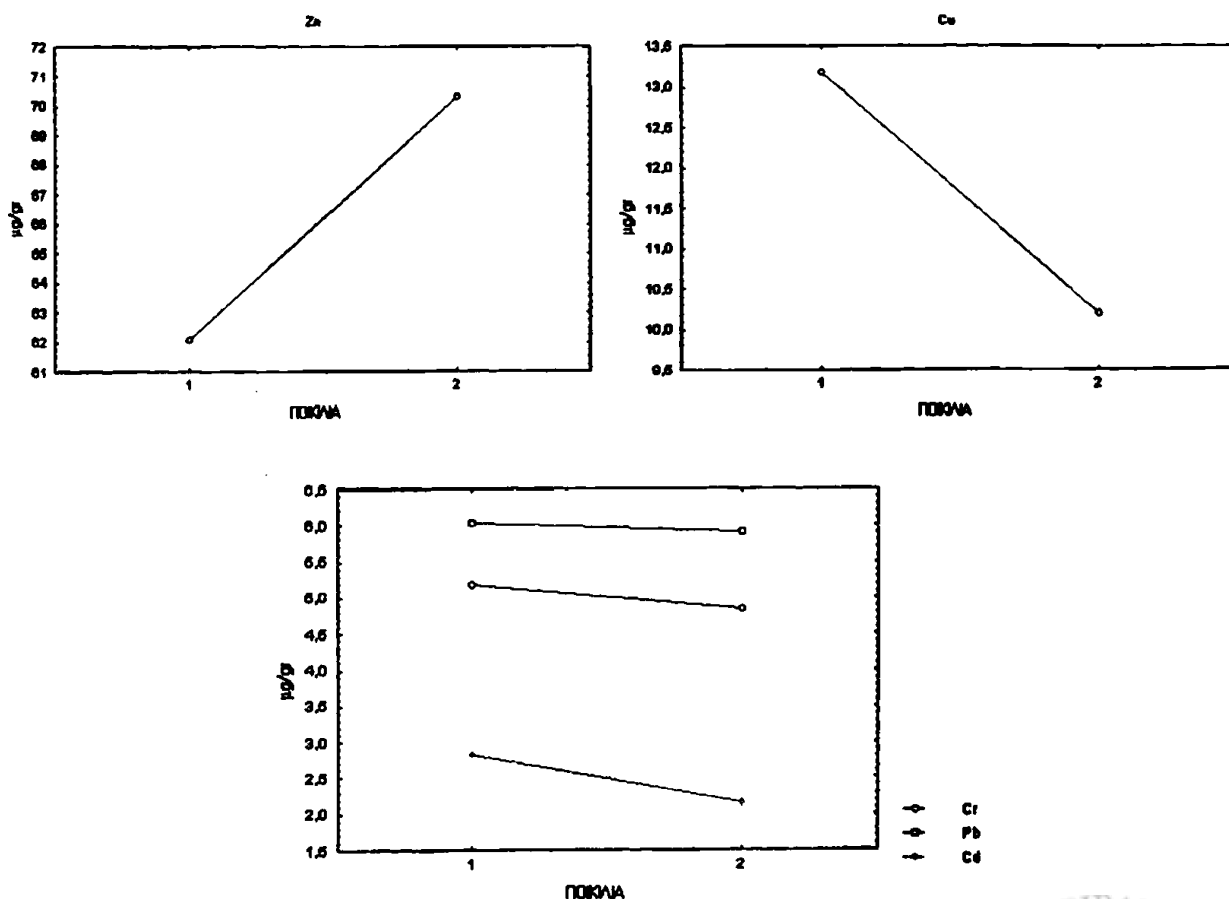
Από την σύγκριση τιμών διαπιστώθηκε ότι ανεξαρτήτως pH υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0,000$) στις συγκεντρώσεις των Cu και Cd μεταξύ της ποικιλίας I και της ποικιλίας II. Όσον αφορά τα Zn, Cr και Pb δεν προέκυψαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ποικιλιών.

Από τα αποτελέσματα μας (εικ.3.35) παρατηρούμε ότι η συγκέντρωση του Cd στην ποικιλία II είναι μικρότερη (μέση τιμή = 2,144μg/g) από την συγκέντρωση στην ποικιλία I (μέση τιμή = 2,832μg/g).

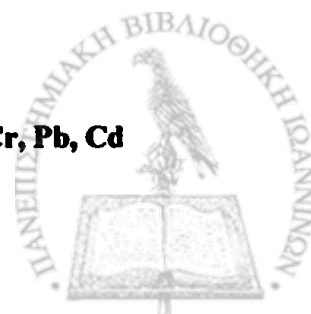
Επίσης, ο Cu με συγκέντρωση 13,186μg/g είναι αυξημένος στην ποικιλία I σε σχέση με τον Cu στην ποικιλία II (μέση τιμή = 10,192μg/g).

Ο Pb και το Cr παρουσιάζουν μικρή διαφορά συγκεντρώσεων στις δύο ποικιλίες (Pb I: 6,029μg/g, Pb II: 5,901μg/g. Cr I: 5,174μg/g, Cr II: 4,848μg/g).

Όσον αφορά τον Zn, παρόλο που η συγκέντρωση του στην ποικιλία II είναι μεγαλύτερη από την συγκέντρωση στην ποικιλία I, η διαφορά δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική (μέση τιμή Zn I = 62,078μg/g και μέση τιμή Zn II = 70,328μg/g).



Εικ. 3.35. Ποικ. I και II: Συγκεντρώσεις των Zn, Cu, Cr, Pb, Cd



3.1.8. ΕΠΙΠΕΔΑ ΜΕΤΑΛΛΩΝ ΣΥΝΑΡΤΗΣΕΙ ΠΟΙΚΙΛΙΑΣ ΚΑΙ pH

Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι όταν λαμβάνονται υπόψιν οι διαφορετικές συνθήκες εδαφικού pH, διατηρούνται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές που προαναφέρθηκαν στην προηγούμενη παράγραφο.

Έτσι, σε συνθήκες όξινου pH οι συγκεντρώσεις των Cu και Cd είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερες ($p=0,0002$ και $p=0,0003$ αντίστοιχα) στην ποικιλία I σε σχέση με την ποικιλία II.

Τα επίπεδα συσσώρευσης των Cr και Pb στις ίδιες συνθήκες pH (όξινο) είναι αυξημένα, ενώ οι τιμές του Zn είναι μειωμένες στην ποικιλία I σε σχέση με την ποικιλία II, αλλά όχι με στατιστική σημαντικότητα.

Σε συνθήκες αλκαλικού εδαφικού pH παρατηρούμε επίσης ότι οι συγκεντρώσεις των Cu και Cd είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερες ($p = 0,003$ και $p= 0,02$ αντίστοιχα) στην ποικιλία I σε σχέση με την ποικιλία II.

Στις συνθήκες αυτές (pH αλκαλικό) παρατηρούμε ότι το Cr είναι στατιστικά σημαντικά μειωμένο ($p=0,03$) στην ποικιλία I σε σχέση με την ποικιλία II, γεγονός που αφορά μόνο το αλκαλικό pH και δεν παρατηρείται όταν δεν λαμβάνονται υπόψιν οι συνθήκες οξύτητας του εδάφους (προηγούμενη παράγραφος), ή όταν το pH είναι όξινο.

Όσον αφορά τα υπόλοιπα μέταλλα διαπιστώνουμε ότι σε συνθήκες αλκαλικού pH τα επίπεδα του Pb είναι αυξημένα και τα επίπεδα του Zn μειωμένα στην ποικιλία I σε σχέση με την ποικιλία II, αλλά όχι με στατιστική σημαντικότητα, αποτελέσματα που είναι κοινά σε σχέση με το όξινο εδαφικό pH καθώς και όταν δεν λαμβάνεται υπόψιν η οξύτητα στην στατιστική ανάλυση.

Φαίνεται λοιπόν ότι, με εξαίρεση το Cr το pH δεν επηρεάζει τις διαφορές συγκεντρώσεων των διαφόρων μετάλλων μεταξύ των δύο ποικιλιών.

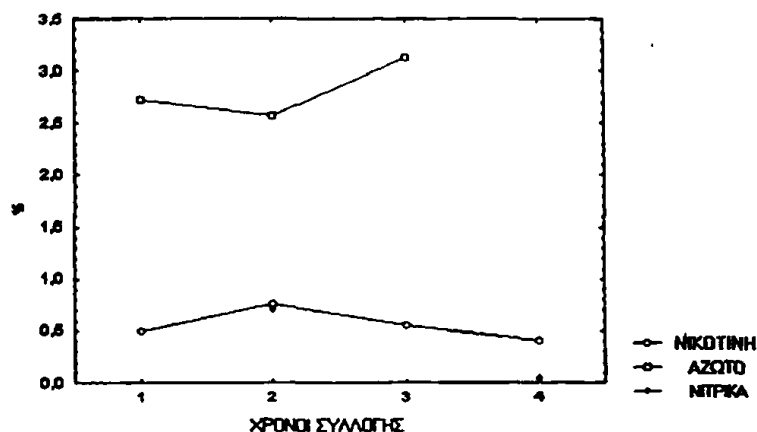


3.2. Αζωτούχες Ενώσεις

3.2.1. ΕΠΙΠΕΔΑ ΑΖΩΤΟΥΧΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΥΝΑΡΤΗΣΕΙ ΧΡΟΝΟΥ ΣΥΛΛΟΓΗΣ ΚΑΙ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ

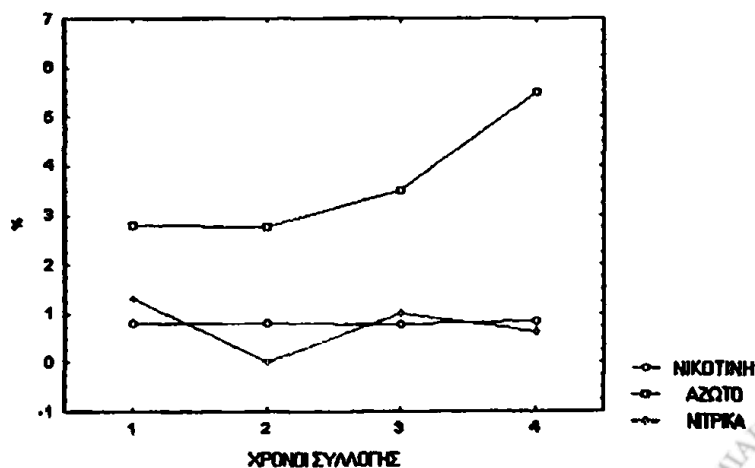
α) ΠΟΙΚΙΛΙΑ Ι – pH 1

Στην ποικιλία Ι σε συνθήκες εδαφικού pH 1 παρατηρούνται διαφορές στην περιεκτικότητα όλων των αζωτούχων ενώσεων (ολικού αζώτου, νικοτίνης και νιτρικών) μεταξύ των διαφόρων χρόνων συλλογής των φύλλων στις ομάδες υποστρώματος.



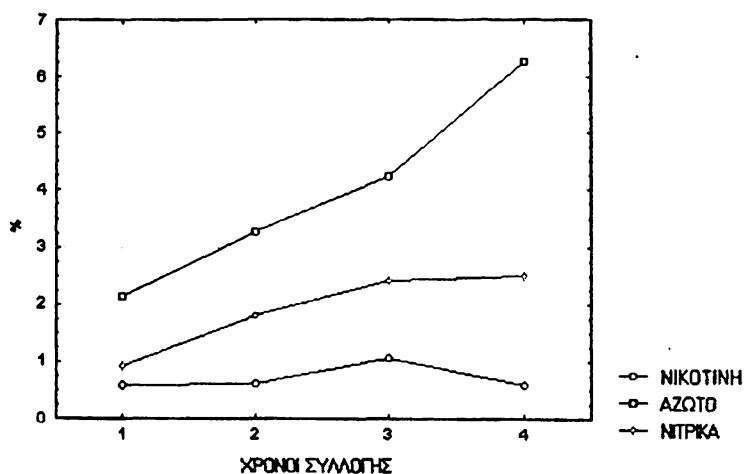
Εικ. 3.36. Ποικ. Ι-pH 1-ομάδα 0%: Μεταβολές συγκέντρωσης νικοτίνης, ολ. N και NO_3^- συναρτήσει του χρόνου συλλογής των φύλλων.

Από τα αποτελέσματά μας (εικ.3.36) φαίνεται ότι στην ομάδα με αναλογία λάσπης 0%, η νικοτίνη εμφανίζει μέγιστη περιεκτικότητα 0,76% στον χρόνο 2 και ελάχιστη περιεκτικότητά 0,4% στον χρόνο 4, ενώ το ολικό άζωτο αυξάνεται προοδευτικά από τον χρόνο 1 στον χρόνο 3 (από 2,730% έως 3,130%). Όσον αφορά τα NO_3^- παρατηρούμε μείωση από τον χρόνο 2 στον χρόνο 4 από 0,70% σε 0,04%.



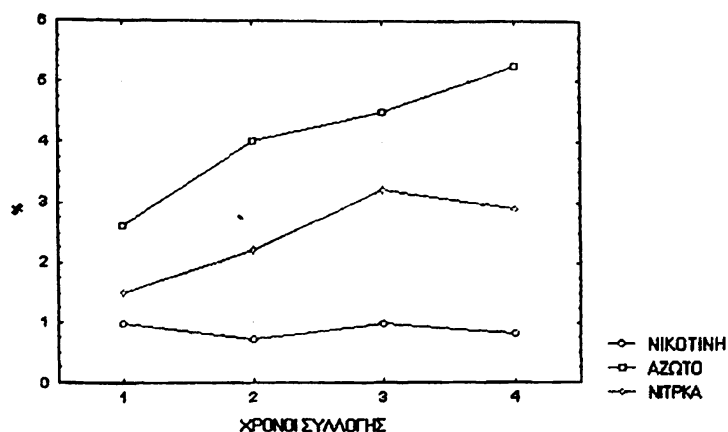
Εικ. 3.37. Ποικ. Ι-pH 1-ομάδα 10%: Μεταβολές συγκέντρωσης νικοτίνης, ολ. N και NO_3^- συναρτήσει του χρόνου συλλογής των φύλλων.

Στην ομάδα φυτών που μεγάλωσαν σε έδαφος με αναλογία λάσπης 10% (εικ.3.37), η νικοτίνη εμφανίζεται να έχει μικρή διακύμανση (από 0,76% έως 0,82%) με μέγιστη περιεκτικότητα στα νεώτερα φύλλα (χρόνος 4). Όσον αφορά το ολικό άζωτο, η περιεκτικότητα αυξάνεται σημαντικά από τα γηραιότερα στα νεώτερα φύλλα (από 2,780% στον χρόνο 1 σε 5,470% στον χρόνο 4), ενώ τα NO_3^- παρουσιάζουν αυξομειώσεις στους διάφορους χρόνους, παρόλο που μειώνονται από 1,300% στον χρόνο 1 σε 0,600% στον χρόνο 4.



Εικ. 3.38. Ποικ. I-pH 1-ομάδα 20%: Μεταβολές συγκέντρωσης νικοτίνης, ολ. N και NO_3^- συναρτήσει του χρόνου συλλογής των φύλλων.

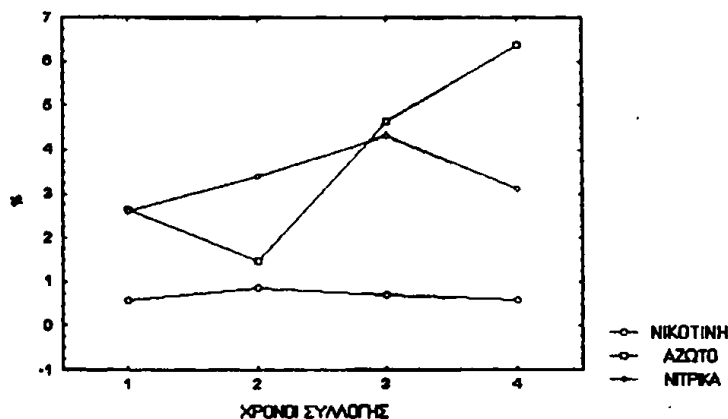
Στην ομάδα υποστρώματος 20% (εικ.3.38), η νικοτίνη κυμαίνεται από 0,57% (χρόνος 1) έως 1,050% (χρόνος 3), ενώ στα νεώτερα φύλλα (χρόνος 4) μειώνεται σε 0,58%. Η περιεκτικότητα του ολικού αζώτου αυξάνεται σημαντικά από τον χρόνο 1 στον χρόνο 4 (από 2,140% σε 6,240%) και το ίδιο παρατηρείται και για τα NO_3^- , που αυξάνονται από 0,90% στον χρόνο 1 σε 2,40% στον χρόνο 3, ενώ η συγκέντρωση σταθεροποιείται σε 2,50% στον χρόνο 4.



Εικ. 3.39. Ποικ. I- pH 1- ομάδα 40%: Μεταβολές συγκέντρωσης νικοτίνης, ολ. N και NO_3^- συναρτήσει του χρόνου συλλογής των φύλλων.



Στην ομάδα με αναλογία λάσπης 40% (εικ.3.39), η νικοτίνη εμφανίζεται σχεδόν σταθερή (από 0,71% έως 0,98%), με μέγιστη συγκέντρωση στον χρόνο 3. Όσον αφορά το ολικό άζωτο παρατηρείται προοδευτική αύξηση περιεκτικότητας από τα γηραιότερα στα νεώτερα φύλλα (από 2,620% σε 5,250%). Για τα NO_3^- εμφανίζεται αύξηση συγκέντρωσης από 1,50% στον χρόνο 1 σε 3,20% στον χρόνο 3 που ακολουθείται από μικρή μείωση σε 2,90% στον χρόνο 4.

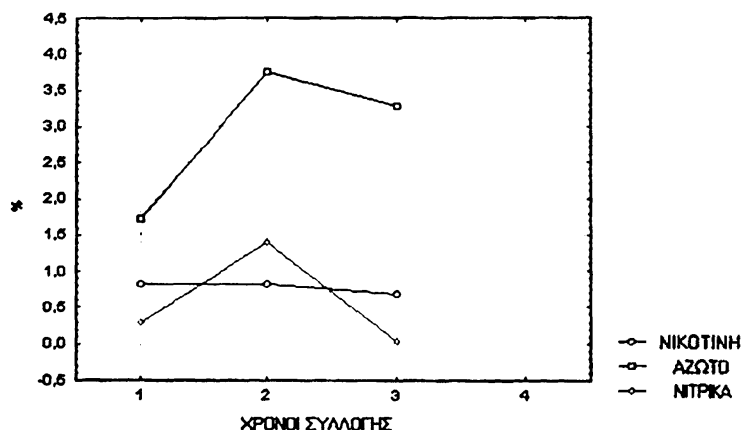


Εικ. 3.40. Ποικ. I- pH 1-ομάδα ΑΛ: Μεταβολές συγκέντρωσης νικοτίνης, ολ. N και NO_3^- συναρτήσει του χρόνου συλλογής των φύλλων.

Από τα αποτελέσματα μας (εικ.3.40) παρατηρούμε ότι στα φυτά που μεταφυτεύτηκαν σε έδαφος με εφαρμογή ανόργανης λίπανσης (ομάδα ΑΛ), η νικοτίνη παρουσιάζει μέγιστη συγκέντρωση 0,86% στον χρόνο 2 και ελάχιστη συγκέντρωση 0,57% στα αμέσως γηραιότερα φύλλα. Και σε αυτή την ομάδα υποστρώματος το ολικό άζωτο αυξάνεται σημαντικά από τον χρόνο 1 στον χρόνο 4 (από 2,630% σε 6,380%) παρόλο που η ελάχιστη μέση τιμή παρατηρείται στον χρόνο 2 (=1,470%). Όσον αφορά τα NO_3^- τα επίπεδα συγκέντρωσης αυξάνονται από 2,600% στον χρόνο 1 σε 4,30% στον χρόνο 3 και ακολουθεί μείωση σε 3,10% στον χρόνο 4.

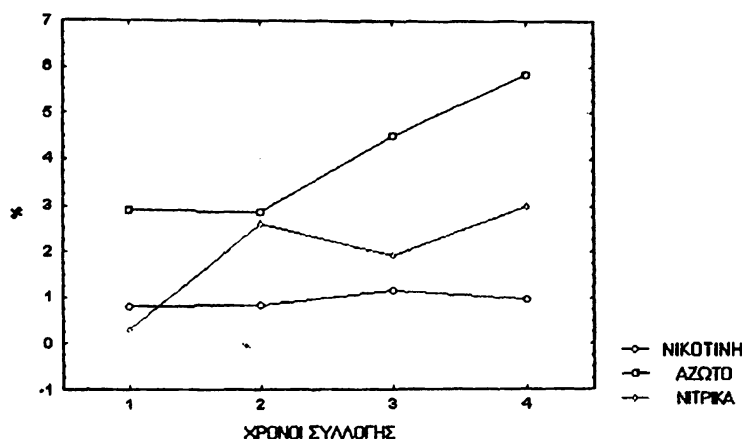
β) ΠΟΙΚΙΛΙΑ Ι – pH 2

Στην ποικιλία Ι σε συνθήκες pH 2 διαπιστώνονται σημαντικές διαφορές στα επίπεδα των αζωτούχων ενώσεων μεταξύ των διαφόρων συλλογής των φύλλων σε όλες τις ομάδες υποστρώματος. Επίσης γενικότερα θα μπορούσαμε να πούμε ότι, με εξαίρεση την ομάδα 0%, παρατηρείται αύξηση στην συγκέντρωση νικοτίνης, ολικού αζώτου και NO_3^- από τα γηραιότερα στα νεώτερα φύλλα σε όλες τις ομάδες μεταφύτευσης.



Εικ. 3.41. Ποικ. Ι-pH 2- ομάδα 0%: Μεταβολές συγκέντρωσης νικοτίνης, ολ. N και NO_3^- συναρτήσει του χρόνου συλλογής των φύλλων.

Από τα αποτελέσματά μας (εικ.3.41) παρατηρούμε ότι η νικοτίνη στην ομάδα 0% εμφανίζει μέγιστη περιεκτικότητα 0,82% στους χρόνους 1 και 2 και ελάχιστη περιεκτικότητα 0,68% στον χρόνο 3. Όσον αφορά το ολικό άζωτο και τα NO_3^- η μέγιστη συγκέντρωση παρουσιάζεται στον χρόνο 2 (3,740% και 1,400% αντίστοιχα), ενώ η ελάχιστη μέση τιμή εμφανίζεται στους χρόνους 1 για το ολικό άζωτο και 3 για τα NO_3^- .

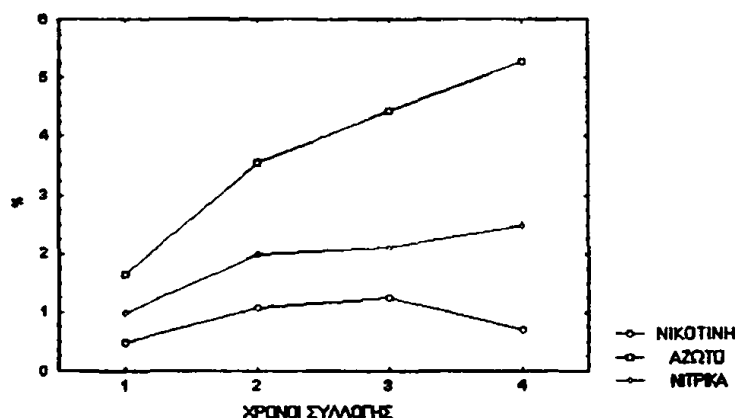


Εικ. 3.42. Ποικ. Ι-pH 2- ομάδα 10%: Μεταβολές συγκέντρωσης νικοτίνης, ολ. N και NO_3^- συναρτήσει του χρόνου συλλογής των φύλλων.



Στην ομάδα με αναλογία λάσπης 10% (εικ.3.42) η νικοτίνη αυξάνεται από τον χρόνο 1 στον χρόνο 4 (από 0,79% σε 0,96%) με μέγιστη συγκέντρωση 1,16% στον χρόνο 3.

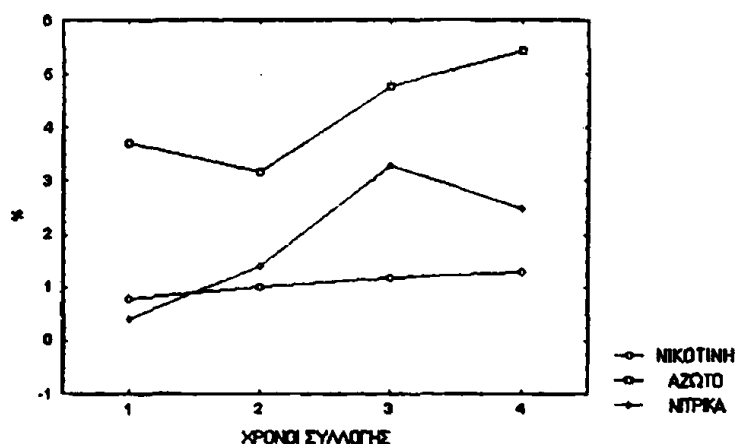
Τόσο το ολικό άζωτο όσο και τα NO_3^- παρουσιάζουν σημαντική αύξηση (από 2,89% σε 5,840% και από 0,30% σε 3,00% αντίστοιχα) από τα φύλλα πρώτης στα φύλλα τελευταίας συλλογής.



Εικ. 3.43. Ποικ. Ι- pH 2-ομάδα 20%: Μεταβολές συγκέντρωσης νικοτίνης, ολ. N και NO_3^- συναρτήσει του χρόνου συλλογής των φύλλων.

Όσον αφορά την ομάδα φυτών που αναπτύχθηκαν σε αναλογία λάσπης 20% (εικ.3.43), η περιεκτικότητα νικοτίνης αυξάνεται από 0,51% στον χρόνο 1 σε 1,260% στον χρόνο 3 και ακολουθεί μείωση σε 0,70% στον χρόνο 4.

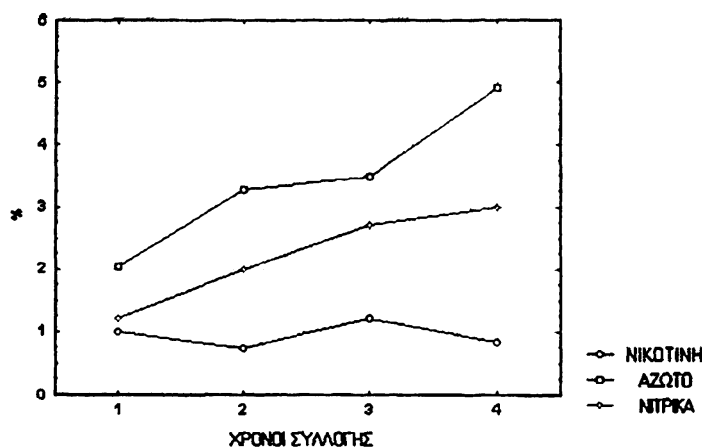
Για το ολικό άζωτο και τα NO_3^- παρατηρούμε σημαντική αύξηση από τον χρόνο 1 στον χρόνο 4 και σε αυτή την ομάδα εδαφικής συγκέντρωσης (από 1,670% σε 5,280% και από 1,00% σε 2,50% αντίστοιχα).



Εικ. 3.44. Ποικ. Ι- pH 2-ομάδα 40%: Μεταβολές συγκέντρωσης νικοτίνης, ολ. N και NO_3^- συναρτήσει του χρόνου συλλογής των φύλλων.



Στην ομάδα με εφαρμογή λάσπης 40% (εικ.3.44), τα επίπεδα νικοτίνης και ολικού αζώτου αυξάνονται σημαντικά από τον χρόνο 1 στον χρόνο 4 (από 0,80% σε 1,290% και από 3,740% σε 5,450% αντίστοιχα), ενώ τα NO_3^- παρόλο που αυξάνονται από 0,40% στον χρόνο 1 σε 2,50% στον χρόνο 4, παρουσιάζουν μέγιστη συσσώρευση 3,30% στα αμέσως γηραιότερα φύλλα (χρόνος 3).



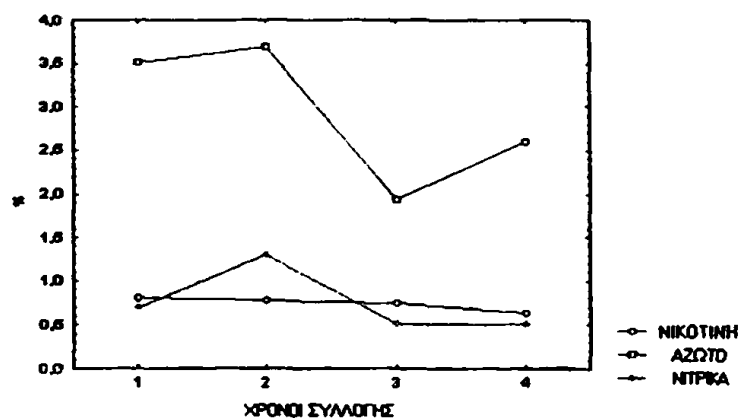
Εικ. 3.45. Ποικ. I-pH 2-ομάδα ΑΛ: Μεταβολές συγκέντρωσης νικοτίνης, ολ. N και NO_3^- συναρτήσει του χρόνου συλλογής των φύλλων.

Όσον αφορά την ομάδα όπου χρησιμοποιήθηκε ανόργανη λίπανση (ΑΛ), παρατηρούμε (εικ.3.45) ότι η νικοτίνη παρουσιάζει αύξηση από τον χρόνο 1 στον χρόνο 3, όπου παρατηρείται η μέγιστη συγκέντρωση (μέση τιμή = 1,20%), και το ολικό άζωτο και τα NO_3^- αυξάνονται σημαντικά από τα γηραιότερα στα νεώτερα φύλλα (από 2,040% σε 4,920% και από 1,20% σε 3,00% αντίστοιχα).

γ) ΠΟΙΚΙΛΙΑ II – pH 1

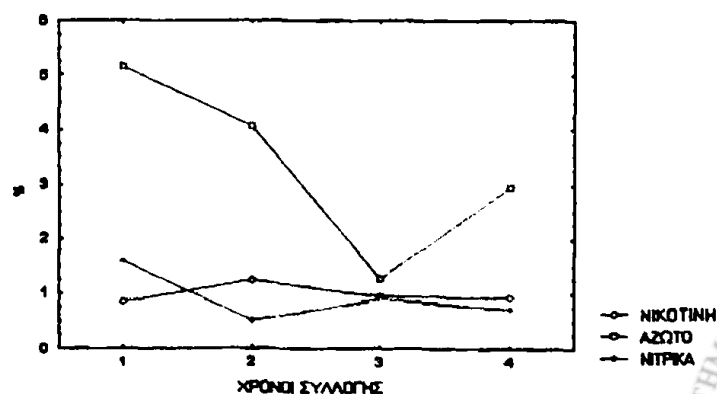
Στην ποικιλία II σε συνθήκες pH 1 διαπιστώνουμε ότι στις περισσότερες ομάδες εδαφικής συγκέντρωσης παρατηρούνται διαφορές στα επίπεδα των αζωτούχων ενώσεων μεταξύ των διαφόρων χρόνων συλλογής. Επίσης θα μπορούσαμε να πούμε ότι η νικοτίνη παρουσιάζει μικρή διακύμανση τιμών.

Όσον αφορά το ολικό άζωτο παρατηρούμε ότι σε όλες τις ομάδες η συγκέντρωση μειώνεται από τα γηραιότερα στα νεώτερα φύλλα και ότι η ελάχιστη μέση τιμή εμφανίζεται στον τρίτο χρόνο συλλογής. Για τα NO_3^- διαπιστώνουμε ότι υπάρχει επίσης σημαντική μείωση στην συγκέντρωση από τον χρόνο 1 στον χρόνο 4.



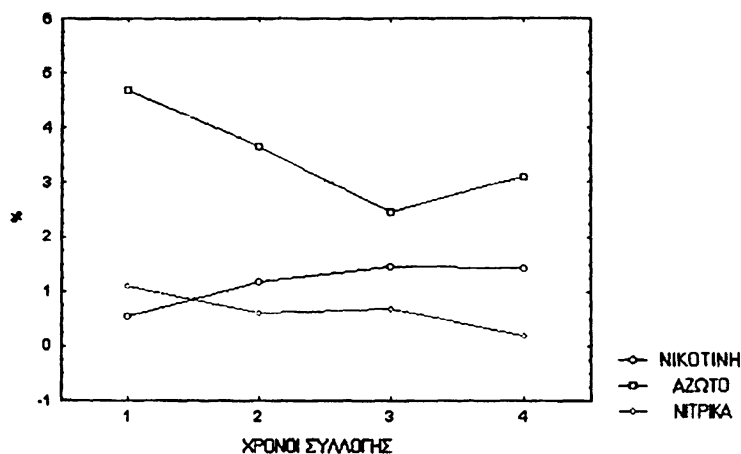
Εικ. 3.46. Ποικ. II-pH 1-ομάδα 0%: Μεταβολές συγκέντρωσης νικοτίνης, ολ. N και NO_3^- συναρτήσει του χρόνου συλλογής των φύλλων.

Από τα αποτελέσματά μας (εικ.3.46), παρατηρούμε ότι στην ομάδα με αναλογία λάσπης 0% τα επίπεδα νικοτίνης μειώνονται από 0,81% στον χρόνο 1 σε 0,64% στον χρόνο 4 και η συγκέντρωση ολικού αζώτου μειώνεται από 3,51% στον χρόνο 1 σε 2,59% στον χρόνο 4, με ελάχιστη περιεκτικότητα 1,93% στον χρόνο 3. Όσον αφορά τα NO_3^- στην ομάδα 0% παρατηρείται μείωση από 0,70% στον χρόνο 1 σε 0,50% στον χρόνο 4, με μέγιστη συσσώρευση (1,30%) στον χρόνο 2.



Εικ. 3.47. Ποικ. II-pH 1-ομάδα 10%: Μεταβολές συγκέντρωσης νικοτίνης, ολ. N και NO_3^- συναρτήσει του χρόνου συλλογής των φύλλων.

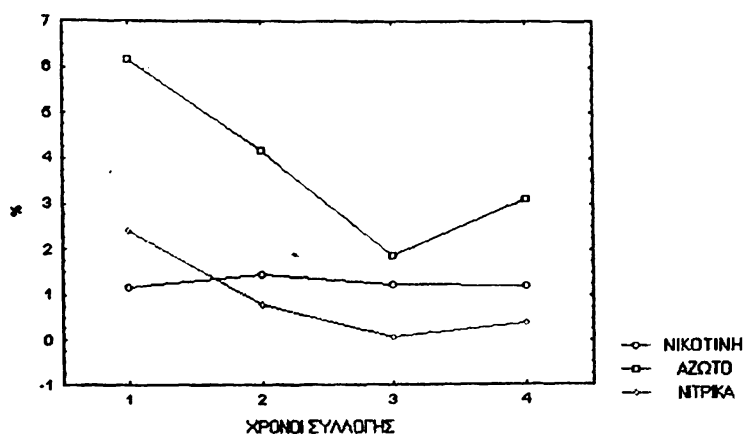
Στην ομάδα με εφαρμογή λάσπης 10% (εικ.3.47), η περιεκτικότητα νικοτίνης μειώνεται από 1,240% στον χρόνο 2 σε 0,93% στον χρόνο 4 και η συγκέντρωση NO_3^- μειώνεται από 1,60% στον χρόνο 1 σε 0,70% στον χρόνο 4 με ελάχιστη συγκέντρωση 0,5% στον χρόνο 2. Το ολικό άζωτο μειώνεται σημαντικά από τον χρόνο 1 στον χρόνο 4 (από 5,15% σε 2,94%) και εμφανίζει ελάχιστη συσσώρευση (1,260%) στον χρόνο 3.



Εικ. 3.48. Ποικ. Π-ρΗ 1- ομάδα 20% :Μεταβολές συγκέντρωσης νικοτίνης, ολ. N και NO_3^- συναρτήσει του χρόνου συλλογής των φύλλων.

Όσον αφορά την ομάδα φυτών που αναπτύχθηκαν σε έδαφος με αναλογία λάσπης 20% (εικ.3.48), τα επίπεδα νικοτίνης αυξάνονται από 0,55% στον χρόνο 1 σε 1,47% στον χρόνο 3 και υπάρχει σταθεροποίηση συγκέντρωσης στον χρόνο 4.

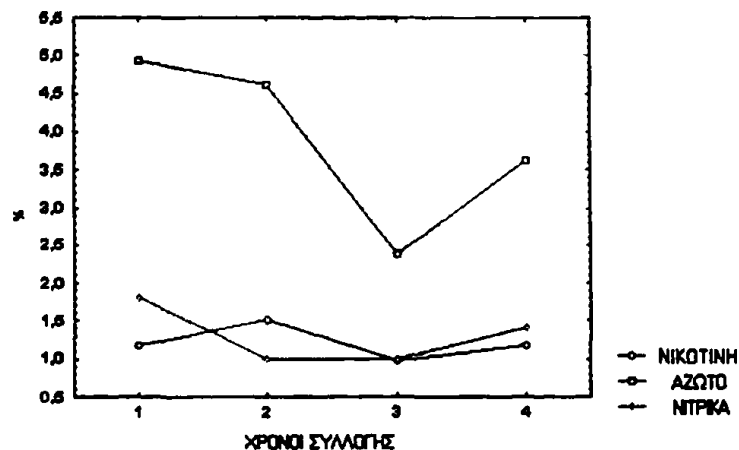
Η μέση τιμή του ολικού αζώτου μειώνεται σημαντικά από τον χρόνο 1 στον χρόνο 4 και η ελάχιστη συγκέντρωση εμφανίζεται στον χρόνο 3 (μέση τιμή = 2,47%). Τα επίπεδα των NO_3^- επίσης μειώνονται από τον χρόνο 1 στον χρόνο 4 από 1,100% σε 0,200%.



Εικ. 3.49. Ποικ. Π-ρΗ 1-ομάδα 40% : Μεταβολές συγκέντρωσης νικοτίνης, ολ. N και NO_3^- συναρτήσει του χρόνου συλλογής των φύλλων.



Στην ομάδα 40% από τα αποτελέσματά μας (εικ.3.49), παρατηρούμε ότι η νικοτίνη παρουσιάζει μικρή διακύμανση στους διάφορους χρόνους συλλογής και ότι μειώνεται ελαφρά από τα γηραιότερα στα νεότερα φύλλα. Τόσο το ολικό άζωτο όσο και τα NO_3^- μειώνονται σημαντικά από τον χρόνο 1 στον χρόνο 4 (από 6,170% σε 3,11% και από 2,400% σε 0,400% αντίστοιχα) και εμφανίζουν ελάχιστη συσσώρευση (1,870% και 0,080% αντίστοιχα) στον χρόνο 3.



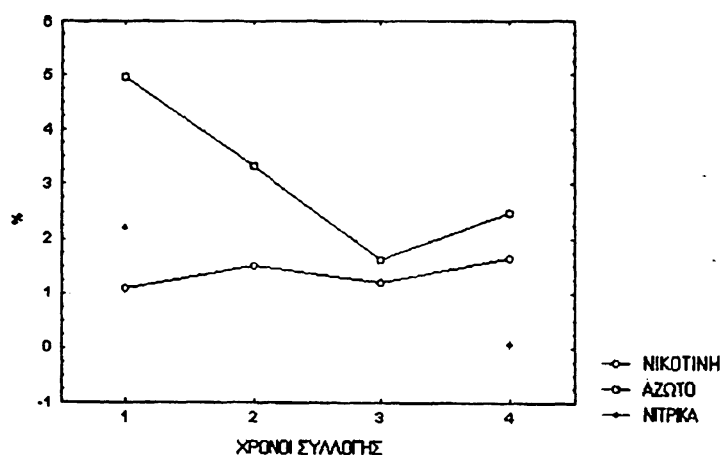
Εικ. 3.50. Ποικ. Π-ρΗ 1- ομάδα ΑΛ : Μεταβολές συγκέντρωσης νικοτίνης, ολ. N και NO_3^- συναρτήσει του χρόνου συλλογής των φύλλων.

Από τα αποτελέσματά μας (εικ.3.50), διαπιστώνουμε ότι στην ομάδα με εφαρμογή ανόργανης λίπανσης (ΑΛ) δεν παρατηρείται διαφορά στην περιεκτικότητα νικοτίνης μεταξύ των φύλλων πρώτης και τελευταίας συλλογής και ότι η ελάχιστη μέση τιμή εμφανίζεται στον χρόνο 3 (μέση τιμή = 0,98%). Όσον αφορά το ολικό άζωτο και τα NO_3^- παρατηρείται σημαντική μείωση συγκέντρωσης από τα γηραιότερα στα νεώτερα φύλλα και η ελάχιστη συσσώρευση (2,380% και 1,00% αντίστοιχα) εμφανίζεται στον χρόνο 3.

δ) ΠΟΙΚΙΛΙΑ Π – pH 2

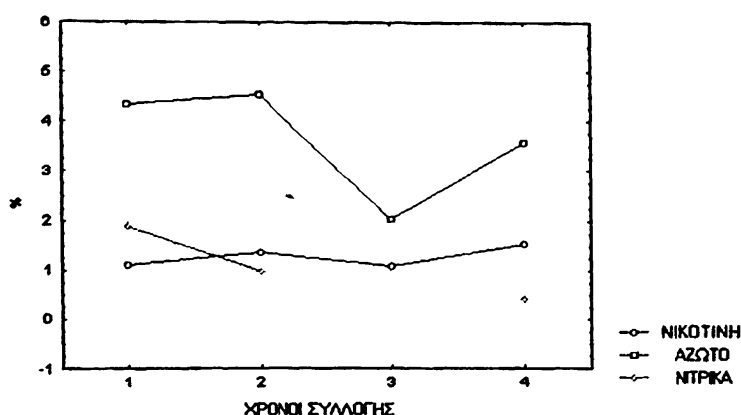
Στην ποικιλία Π σε συνθήκες pH 2 παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στα επίπεδα των αζωτούχων ενώσεων μεταξύ των διαφόρων χρόνων συλλογής σε όλες τις ομάδες υποστρώματος.

Επίσης, από τα αποτελέσματά μας διαπιστώνουμε ότι στις περισσότερες ομάδες παρατηρείται αύξηση στην περιεκτικότητα νικοτίνης και μείωση στην συγκέντρωση του ολικού αζώτου και των νιτρικών από τα γηραιότερα στα νεώτερα φύλλα.



Εικ. 3.51. Ποικ. Π-pH 2-ομάδα 0%: Μεταβολές συγκέντρωσης νικοτίνης, ολ. N και NO_3^- συναρτήσει του χρόνου συλλογής των φύλλων.

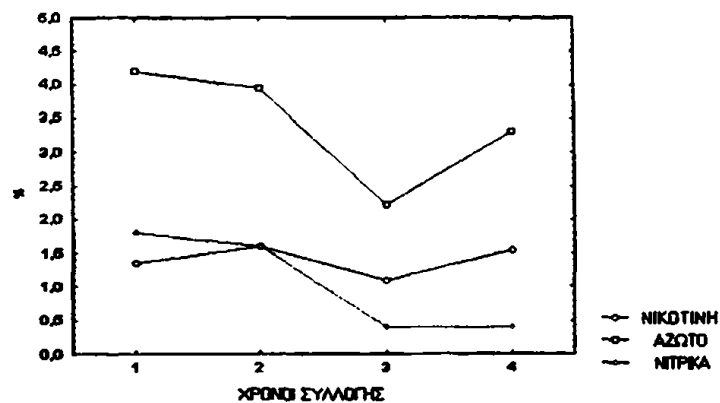
Στην ομάδα με αναλογία λάσπης 0% (εικ.3.51), τα επίπεδα νικοτίνης αυξάνονται από 1,10% στον χρόνο 1 σε 1,65% στον χρόνο 4 ενώ στους ίδιους χρόνους η συγκέντρωση του ολικού αζώτου μειώνεται από 4,99% σε 2,49% και η περιεκτικότητα των NO_3^- μειώνεται από 2,20% σε 0,080%. Επίσης παρατηρείται η μικρότερη μέση τιμή ολικού αζώτου εμφανίζεται στον χρόνο 3 (1,63%).



Εικ. 3.52. Ποικ. Π-pH 2-ομάδα 10% : Μεταβολές συγκέντρωσης νικοτίνης, ολ. N και NO_3^- συναρτήσει του χρόνου συλλογής των φύλλων.



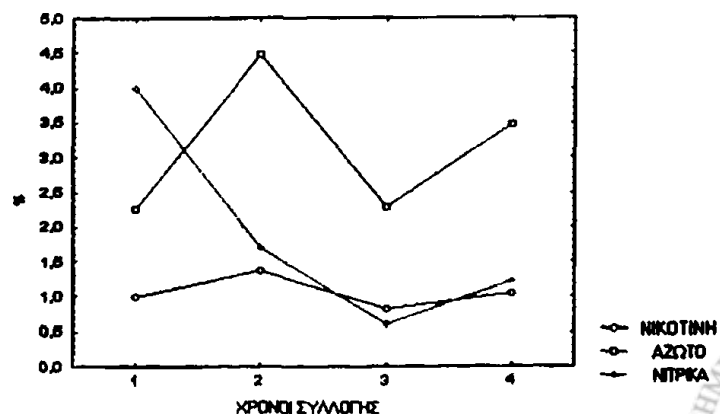
Στην ομάδα όπου το έδαφος εμπλουτίστηκε με λάσπη σε αναλογία 10% (εικ.3.52), η συγκέντρωση νικοτίνης αυξάνεται από 1,13% στον χρόνο 1 σε 1,54% στον χρόνο 4 και τα νιτρικά μειώνονται από 1,90% σε 0,40% στους ίδιους χρόνους. Όσον αφορά το ολικό άζωτο, παρατηρούμε ότι ενώ εμφανίζει μικρή αύξηση από τον χρόνο 1 στον χρόνο 2 (από 4,36% σε 4,56%), στους επόμενους χρόνους μειώνεται σημαντικά με ελάχιστη συγκέντρωση 2,040% στον χρόνο 3.



Εικ. 3.53. Ποικ. Π-ρΗ 2- ομάδα 20%: Μεταβολές συγκέντρωσης νικοτίνης, ολ. N και NO_3^- συναρτήσει του χρόνου συλλογής των φύλλων.

Από τα αποτελέσματά μας παρατηρούμε ότι στην ομάδα με αναλογία λάσπης 20% (εικ.3.53), η νικοτίνη αυξάνεται από 1,35% στον χρόνο 1 σε 1,55% στον χρόνο 4, παρόλο που η μέγιστη και η ελάχιστη περιεκτικότητα (1,60% και 1,08% αντίστοιχα) σημειώνονται στους χρόνους 2 και 3 αντίστοιχα.

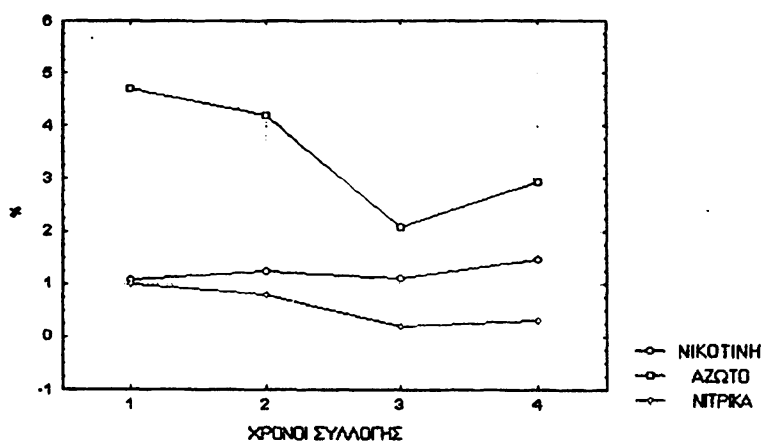
Όσον αφορά το ολικό άζωτο και τα NO_3^- παρατηρούμε ότι η συγκέντρωση μειώνεται από τα γηραιότερα στα νεώτερα φύλλα (από 4,15% σε 3,31% και από 1,8% σε 0,40% αντίστοιχα), ενώ και σε αυτή την ομάδα η μικρότερη μέση τιμή ολικού αζώτου εμφανίζεται στον χρόνο 3.



Εικ. 3.54. Ποικ. Π- ρΗ 2-ομάδα 40%: Μεταβολές συγκέντρωσης νικοτίνης, ολ. N και NO_3^- συναρτήσει του χρόνου συλλογής των φύλλων.

Στην ομάδα με τη μεγαλύτερη αναλογία λάσπης (ομάδα 40%) (εικ.3.54), η περιεκτικότητα της νικοτίνης μεταβάλλεται από 0,98% στον χρόνο 1 σε 1,03% στον χρόνο 4, ενώ η μέγιστη και η ελάχιστη συγκέντρωση εμφανίζονται στους χρόνους 2 και 3 αντίστοιχα (1,36% και 0,81%). Η μέση τιμή του ολικού αζώτου παρουσιάζει αυξομειώσεις στους 4 χρόνους συλλογής παρόλο που μειώνεται από 4,46% στον χρόνο 2 σε 3,45% στον χρόνο 4 και εμφανίζει ελάχιστη συγκέντρωση στους χρόνους 1 και 3.

Όσον αφορά τα επίπεδα NO_3^- παρατηρούμε ότι από τον χρόνο 1 στον χρόνο 3 μειώνονται σημαντικά (από 4,00% σε 0,600%) και ακολουθεί μικρή αύξηση σε 1,2% στον χρόνο 4.



Εικ. 3.55. Ποικ. Π-ρΗ 2-ομάδα ΑΛ : Μεταβολές συγκέντρωσης νικοτίνης, ολ. Ν και NO_3^- συναρτήσει του χρόνου συλλογής των φύλλων.

Στην ομάδα όπου εφαρμόστηκε ανόργανη λίπανση (ομάδα ΑΛ) παρατηρούμε (εικ.3.55) ότι η συγκέντρωση νικοτίνης αυξάνεται από 1,08% στον χρόνο 1 σε 1,45% στον χρόνο 4, ενώ μικρή μείωση εμφανίζεται από τον χρόνο 2 στον χρόνο 3. Στην ομάδα ΑΛ εμφανίζεται επίσης μείωση του ολικού αζώτου και των NO_3^- από τον χρόνο 1 στον χρόνο 3 (από 4,70% σε 2,08% και από 1,00% σε 0,20% αντίστοιχα) που ακολουθείται από μικρή αύξηση (σε 2,93% και σε 0,30% αντίστοιχα) στον χρόνο 4.

3.2.2. ΕΠΙΠΕΔΑ ΑΖΩΤΟΥΧΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΥΝΑΡΤΗΣΕΙ ΧΡΟΝΟΥ ΣΥΛΛΟΓΗΣ ΚΑΙ pH ΚΑΙ ΑΝΕΞΑΡΤΗΤΩΣ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ

α) ΠΟΙΚΙΛΙΑ Ι-pH1, pH2

Από τα διαγράμματα (εικ.3.56 & 3.57), παρατηρούμε ότι στις 5 ομάδες υποστρώματος με pH όξινο(1) η μέση τιμή της περιεκτικότητας της νικοτίνης αυξάνεται από 0,682% στον χρόνο 1 (γρηραιότερα φύλλα) σε 0,806% στον χρόνο 3 και ακολουθεί μείωση σε 0,638% στα νεώτερα φύλλα (χρόνος 4). Οι διαφορές στα επίπεδα βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές ($p=0,007$).

Σε συνθήκες αλκαλικού pH, η συσσώρευση νικοτίνης ακολουθεί την ίδια κινητική με αύξηση από 0,782% στον χρόνο 1 σε 1,100% στον χρόνο 3 και μείωση σε 0,947% στον χρόνο 4. Οι διαφορές στην περιεκτικότητα νικοτίνης στους διαφόρους χρόνους βρέθηκαν και σε αυτές τις συνθήκες εδαφικού pH στατιστικά σημαντικές ($p=0,000$).

Όσον αφορά τη μέση τιμή του ολικού αζώτου στις ομάδες φυτών που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες όξινες (pH 1), διαπιστώνουμε ότι αυξάνεται σημαντικά ($p=0,000$) από 2,580% στον χρόνο 1 σε 5,835% στον χρόνο 4.

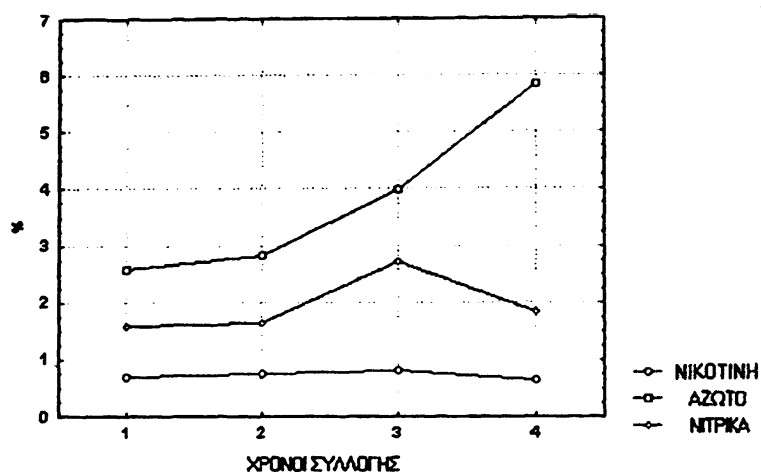
Σε αλκαλικό pH παρατηρείται ανάλογη αύξηση με στατιστική σημαντικότητα ($p=0,000$), από 2,410% στον χρόνο 1 σε 5,372% στον χρόνο 4.

Η συσσώρευση των νιτρικών παρουσιάζει μια μικρή διαφοροποίηση στις δύο συνθήκες εδαφικού pH. Έτσι, σε όξινο pH η μέση τιμή αυξάνεται από 1,575% στον πρώτο χρόνο συλλογής σε 2,725% στον τρίτο χρόνο συλλογής και ακολουθεί μείωση σε 1,828 στα νεώτερα φύλλα.

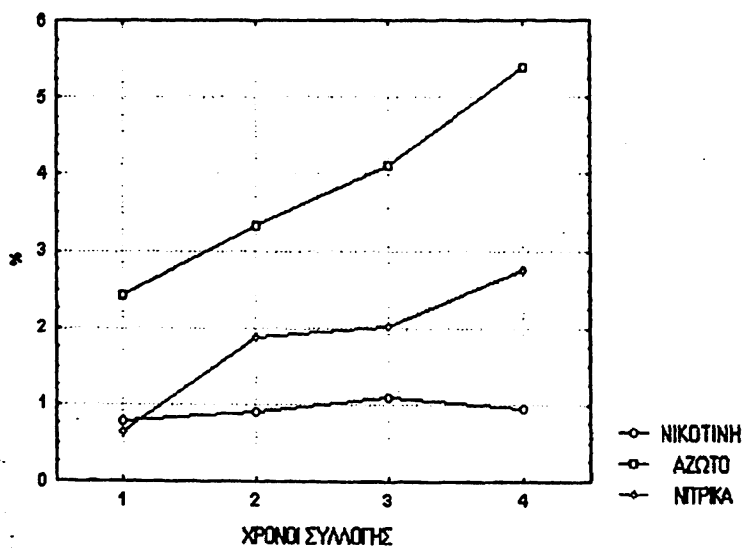
Σε αλκαλικό pH τα επίπεδα των νιτρικών αυξάνονται από 0,640% στον χρόνο 1 σε 2,750% στον χρόνο 4. Τόσο σε όξινο όσο και σε αλκαλικό pH οι διαφορές στις συγκεντρώσεις νιτρικών μεταξύ των διαφορετικών χρόνων συλλογής των φύλλων βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές ($p=0,017$ και $p=0,000$ αντίστοιχα).

Επίσης θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι μέγιστες τιμές νικοτίνης είναι αυξημένες σε συνθήκες αλκαλικού pH, ενώ οι μέγιστες τιμές ολικού αζώτου και νιτρικών δεν φαίνεται να διαφέρουν στα δύο pH του υποστρώματος.





Εικ. 3.56. Ποικ. I-pH1: Μεταβολές συγκέντρωσης νικοτίνης, ολ. N και NO_3^- συναρτήσει του χρόνου συλλογής των φύλλων.



Εικ. 3.57. Ποικ. I: pH2: Μεταβολές συγκέντρωσης νικοτίνης, ολ. N και NO_3^- συναρτήσει του χρόνου συλλογής των φύλλων.

β) ΠΟΙΚΙΛΙΑ Π-pH 1, pH2

Από τα διαγράμματα (εικ.3.58 & 3.59) και την ανάλυση διακύμανσης τιμών διαπιστώνουμε ότι υπάρχει σημαντική διαφορά ($p=0,032$) στις μέσες τιμές της νικοτίνης που περιέχουν τα φύλλα διαφορετικών χρόνων συλλογής προερχόμενα από φυτά που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες όξινου pH.

Η περιεκτικότητα αυξάνεται από 0,912% στον χρόνο 1 σε 1,234% στον χρόνο 2 και στην συνέχεια μειώνεται σε 1,076% στον χρόνο 3 χωρίς άλλη μείωση στα νεώτερα φύλλα (χρόνος 4).

Όσον αφορά την συγκέντρωση νικοτίνης σε συνθήκες αλκαλικού pH παρατηρούμε ότι αυξάνεται από 1,128% στον χρόνο 1 σε 1,444% στον χρόνο 4, παρόλο που η ελάχιστη τιμή (1,058%) σημειώνεται στον χρόνο 3, και οι διαφορές βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές ($p=0,000$).

Οι μέσες τιμές του ολικού αζώτου σε όξινο pH μειώνονται από 4,890% στον χρόνο 1 σε 1,982% στον χρόνο 3 και στην συνέχεια παρατηρείται αύξηση σε 3,076% στον τέταρτο χρόνο, ενώ οι διαφορές βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές ($p=0,000$).

Σε αλκαλικό pH, οι μέσες τιμές μειώνονται με ανάλογο τρόπο 4,100% στον πρώτο χρόνο συλλογής σε 2,046% στον τρίτο χρόνο συλλογής και ακολουθεί επίσης αύξηση στα νεώτερα φύλλα σε 3,154%.

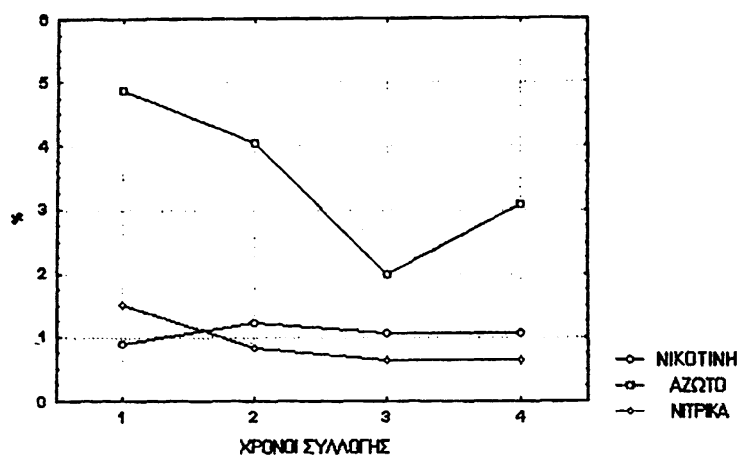
Όσον αφορά την συγκέντρωση των νιτρικών διαπιστώνουμε ότι ακολουθούν ανάλογη κινητική στα δύο εδαφικά pH, στους 4 χρόνους.

Έτσι σε όξινο pH παρατηρείται μείωση της συγκέντρωσης από 1,520% στα γηραιότερα φύλλα σε 0,636% στα φύλλα τρίτου χρόνου και σε αλκαλικό pH παρατηρείται μείωση της συγκέντρωσης από 2,180% στα γηραιότερα φύλλα σε 0,400% στα φύλλα χρόνου 3.

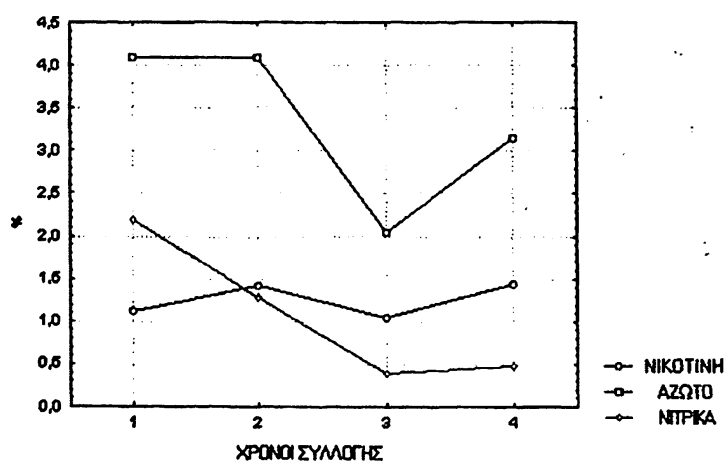
Στον τέταρτο χρόνο συλλογής ακολουθεί τόσο στο όξινο όσο και στο αλκαλικό pH μικρή αύξηση (σε 0,640% και 0,476% αντίστοιχα) στις συγκεντρώσεις των νιτρικών.

Εδώ θα πρέπει να σημειωθεί ότι η μέγιστη τιμή της νικοτίνης και η μέγιστη και ελάχιστη τιμή νιτρικών βρέθηκαν σε φύλλα που προερχόταν από φυτά που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες αλκαλικού pH.





Εικ. 3.58. Ποικ. Π-ρΗ 1: Μεταβολές συγκέντρωσης νικοτίνης, ολ. Ν και NO_3^- συναρτήσει του χρόνου συλλογής των φύλλων.

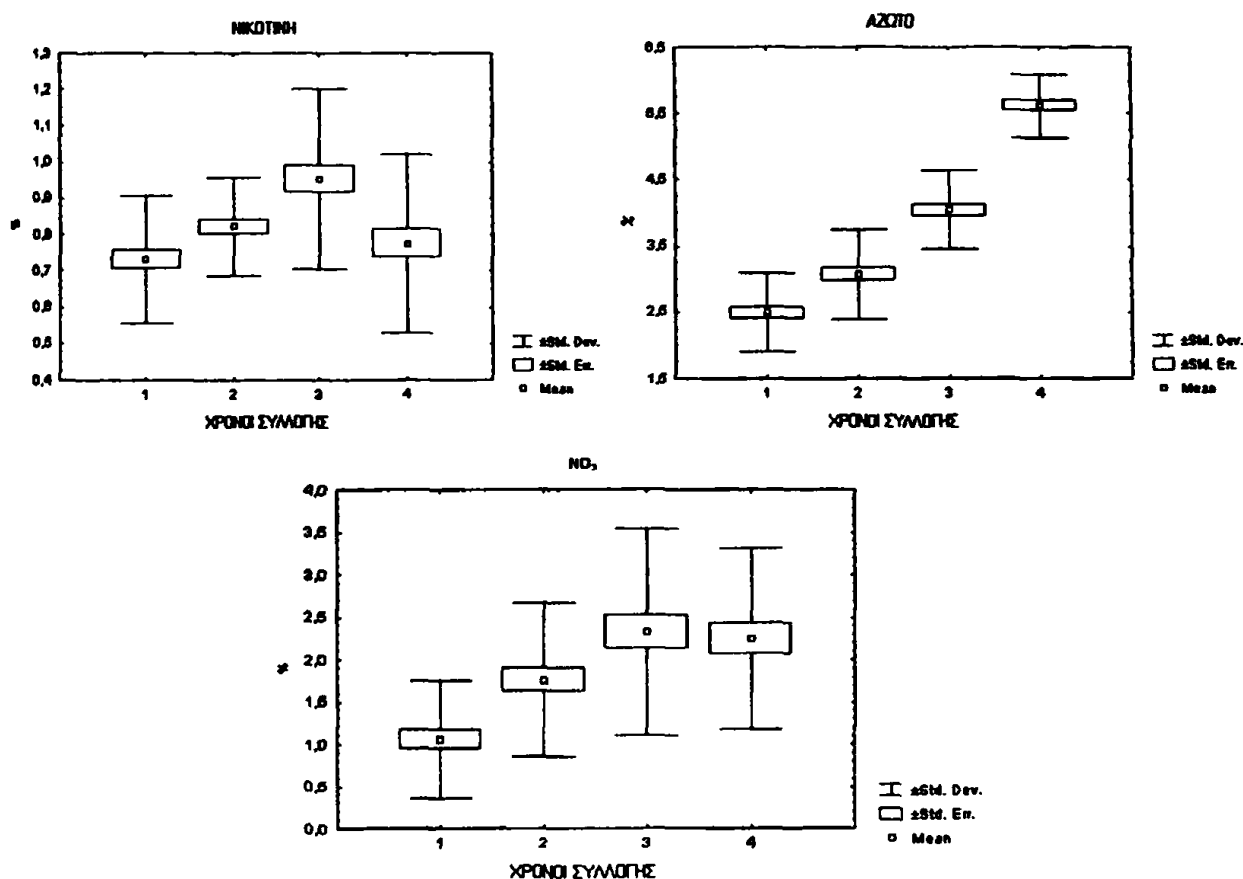


Εικ. 3.59. Ποικ. Π-ρΗ 2: Μεταβολές συγκέντρωσης νικοτίνης, ολ. Ν και NO_3^- συναρτήσει του χρόνου συλλογής των φύλλων.

3.2.3. ΕΠΙΠΕΔΑ ΑΖΩΤΟΥΧΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΥΝΑΡΤΗΣΕΙ ΧΡΟΝΟΥ ΣΥΛΛΟΓΗΣ ΚΑΙ ΑΝΕΞΑΡΤΗΤΩΣ pH ΚΑΙ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ

α) ΠΟΙΚΙΛΙΑ Ι

Στην ποικιλία Ι από την ανάλυση διακύμανσης διαπιστώθηκε ότι η περιεκτικότητα των φύλλων σε NO_3^- και ολικό N διαφέρει στατιστικά σημαντικά ($p=0,000$) στους διαφόρους χρόνους συλλογής των φύλλων, ανεξαρτήτως pH και σύστασης υποστρώματος, ενώ η περιεκτικότητα σε νικοτίνη διαφέρει οριακά ($p=0,05$).



Εικ. 3.60. Ποικ. Ι: Μεταβολές συγκέντρωσης νικοτίνης, ολ. N και NO_3^- συναρτήσει του χρόνου συλλογής των φύλλων.

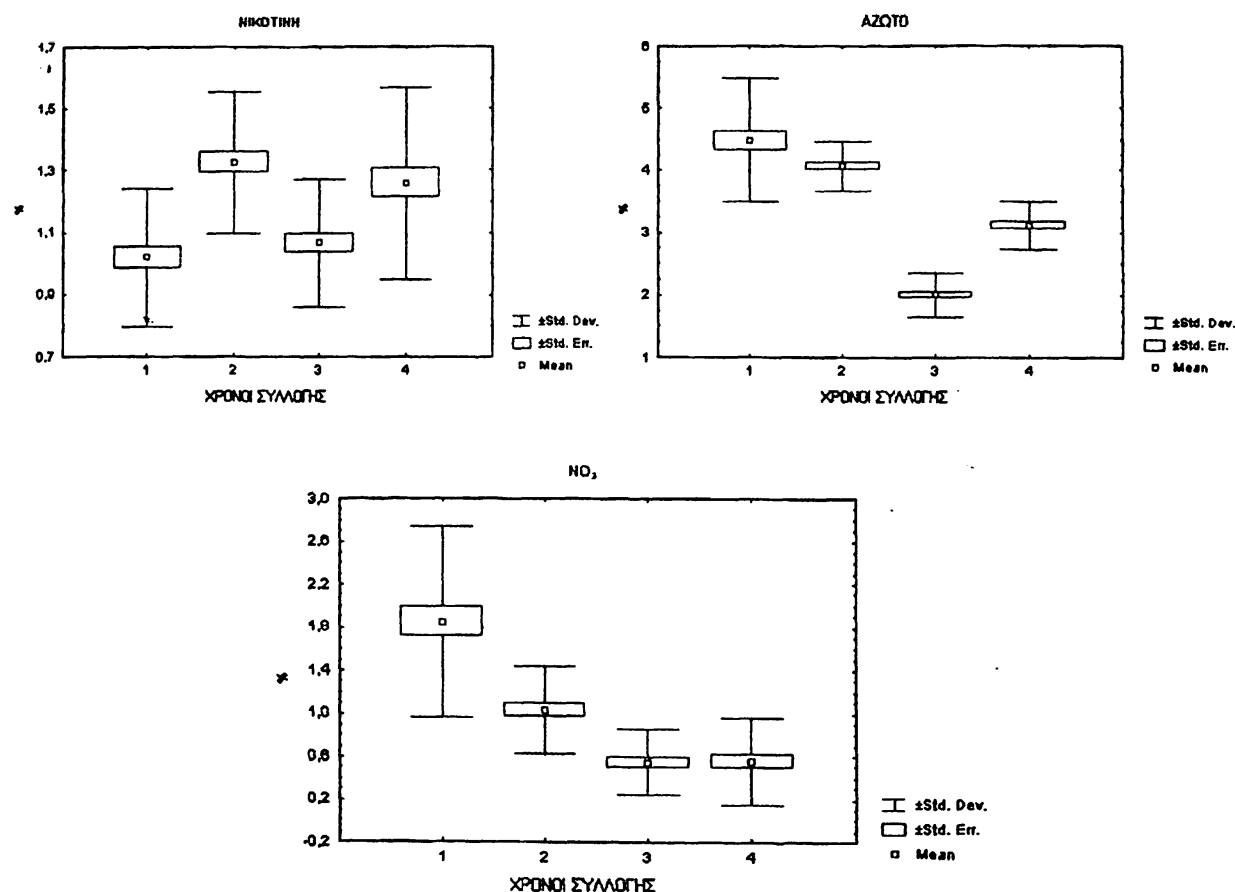
Από τα αποτελέσματά μας (εικ.3.60) παρατηρούμε ότι η περιεκτικότητα νικοτίνης αυξάνεται από 0,732% στον χρόνο 1 σε 0,953% στον χρόνο 3 και στην συνέχεια μειώνεται σε 0,775% στον χρόνο 4.

Για το ολικό άζωτο παρατηρείται σημαντική αύξηση από τον χρόνο 1 στον χρόνο 4, δηλαδή από τα γηραιότερα στα νεώτερα φύλλα (από 2,495% σε 5,603%).

Όσον αφορά τα NO_3^- , παρατηρείται αύξηση περιεκτικότητας από 1,055% στον χρόνο 1 σε 2,325% στον χρόνο 3, ενώ στον χρόνο 4 εμφανίζεται ελαφρά μείωση της περιεκτικότητας σε 2,237%.

β) ΠΟΙΚΙΛΙΑ II

Στην ποικιλία II, από την ανάλυση διακύμανσης προέκυψαν ισχυρά στατιστικές διαφορές ($p=0,000$) στην περιεκτικότητα όλων των αζωτούχων ενώσεων που μετρήθηκαν μεταξύ των **διαφόρων χρόνων συλλογής των φύλλων**, ανεξαρτήτως pH και υποστρώματος.



Εικ. 3.61. Ποικ. II: Μεταβολές συγκέντρωσης νικοτίνης, ολ. N και NO₃⁻ συναρτήσει του χρόνου συλλογής των φύλλων.

Από τα αποτελέσματά μας (εικ.3.61) διαπιστώνουμε ότι η **νικοτίνη αυξάνεται** από τον χρόνο 1 στον χρόνο 2 (από 1,020% σε 1,320%) και στην συνέχεια **μειώνεται** σε 1,067% στον χρόνο 3. Ακολουθεί αύξηση σε 1,26% στον χρόνο 4.

Όσον αφορά το **ολικό άζωτο**, παρατηρούμε ότι **μειώνεται** από τον χρόνο 1 (γηραιότερα φύλλα) στον χρόνο 4 (νεώτερα φύλλα) (από 4,49% σε 3,11%), ενώ η ελάχιστη συγκέντρωση (2,014%) εμφανίζεται στον χρόνο 3.

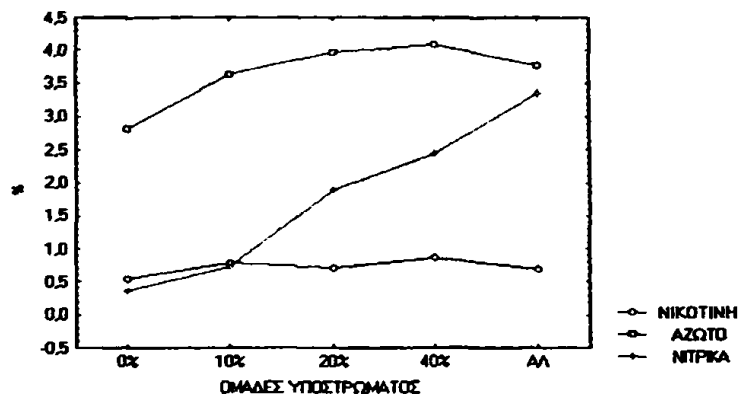
Για τα **NO₃⁻** παρατηρείται επίσης σημαντική **μείωση** περιεκτικότητας από 1,085% στον χρόνο 1 σε 0,54% και 0,56% στους χρόνους 3 και 4.



3.2.4. ΕΠΙΠΕΔΑ ΑΖΩΤΟΥΧΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΥΝΑΡΤΗΣΕΙ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΝΕΞΑΡΤΗΤΩΣ ΧΡΟΝΟΥ ΣΥΛΛΟΓΗΣ

α) ΠΟΙΚΙΛΙΑ Ι – pH 1

Στην ποικιλία Ι σε συνθήκες όξινου pH από την ανάλυση διακύμανσης παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές στην περιεκτικότητα νικοτίνης ($p=0,000$), ολικού αζώτου ($p=0,03$) και νιτρικών ($p=0,000$) μεταξύ των διαφορετικών ομάδων υποστρώματος.



Εικ. 3.62. Ποικ. Ι-pH1: Συγκεντρώσεις νικοτίνης, ολ. N και NO_3^- στις ομάδες υποστρωμάτων.

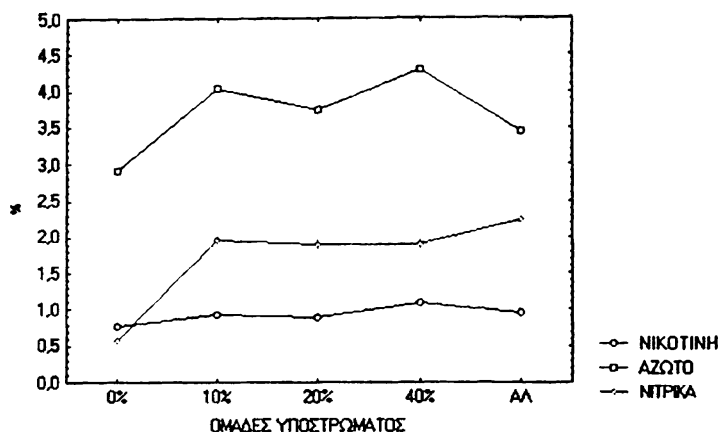
Από τα αποτελέσματά μας (εικ.3.62), παρατηρείται ότι η συγκέντρωση της νικοτίνης είναι μειωμένη (μέση τιμή = 0,552%) στην ομάδα με αναλογία λάσπης 0% σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες και με εφαρμογή λάσπης σε αναλογία 10% προκαλείται αύξηση στα επίπεδα νικοτίνης σε 0,79% ($p=0,000$). Είναι χαρακτηριστικό ότι περαιτέρω αύξηση της λάσπης σε 20% αναλογία, προκαλεί μείωση στην νικοτίνη σε 0,702% που ακολουθείται από αύξηση στην μεγαλύτερη προσθήκη οργανικής ουσίας (ομάδα 40%), όπου εμφανίζεται μέγιστη τιμή (0,865%). Στην ομάδα ΑΛ όπου εφαρμόστηκε ανόργανη λίπανση η μέση τιμή νικοτίνης (0,680%) είναι μικρότερη από όλες τις ομάδες που αναπτύχθηκαν σε λάσπη βιολογικού καθαρισμού.

Όσον αφορά το ολικό άζωτο διαπιστώνουμε ότι αύξηση της αναλογίας λάσπης προκαλεί συνεχή αύξηση της συγκέντρωσης από 2,813% στην ομάδα 0% σε 4,090 στην ομάδα 40%, ενώ στην ομάδα ΑΛ που εφαρμόστηκε ανόργανη λίπανση η συσσώρευση ολικού αζώτου (μέση τιμή = 3,777%) προσεγγίζει τα επίπεδα της ομάδας που η αναλογία της λάσπης ήταν 20%.

Η συγκέντρωση των νιτρικών αυξάνεται σημαντικά από την ομάδα 0% (0,370%) στην ομάδα 40% (μέση τιμή = 2,450%), ενώ αξίζει να σημειωθεί ότι η μέγιστη μέση τιμή παρατηρείται στην ομάδα που εφαρμόστηκε ανόργανη λίπανση (μέση τιμή = 3,350%).

β) ΠΟΙΚΙΛΙΑ Ι – pH 2

Σε συνθήκες αλκαλικού pH, οι διαφορές στα επίπεδα νικοτίνης, ολικού αζώτου και νιτρικών βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά μεταξύ των διαφορετικών ομάδων υποστρώματος.



Εικ. 3.63. Ποικ. Ι- pH2: Συγκεντρώσεις νικοτίνης, ολ. N και NO_3^- στις ομάδες υποστρωμάτων.

Αύξηση στην αναλογία λάσπης προκαλεί αύξηση στην περιεκτικότητα **νικοτίνης**, από 0,773% στην ομάδα 0% σε 1,080% στην ομάδα 40%, παρόλο που όπως και σε όξινο pH η μέση τιμή (0,887%) στην ομάδα 20% είναι χαμηλότερη από τη μέση τιμή (0,932%) στην ομάδα με 10% αναλογία λάσπης.

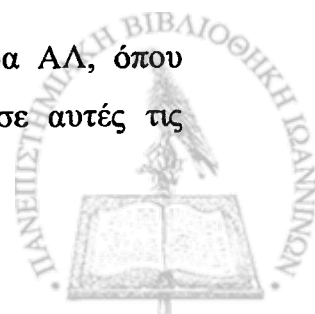
Η συσσώρευση νικοτίνης στα φυτά που αναπτύχθηκαν σε ανόργανη λίπανση (μέση τιμή = 0,940%) προσεγγίζει τα επίπεδα της ομάδας 10%.

Όσον αφορά το **ολικό άζωτο** παρατηρούμε ότι η εφαρμογή της οργανικής ουσίας προκαλεί αύξηση στην συγκέντρωση από 2,910% στην ομάδα με 0% έως 4,285% στην ομάδα με 40% αναλογία λάσπης, παρόλο που στην ομάδα 20% η μέση τιμή ολικού αζώτου είναι μικρότερη από τις 10% και 40% (μέση τιμή = 3,735%).

Στην ομάδα ΑΛ που εφαρμόστηκε ανόργανη λίπανση τα επίπεδα του ολικού αζώτου (μέση τιμή = 3,430%) είναι μειωμένα σε σχέση με τις ομάδες που αναπτύχθηκαν σε οργανική ουσία.

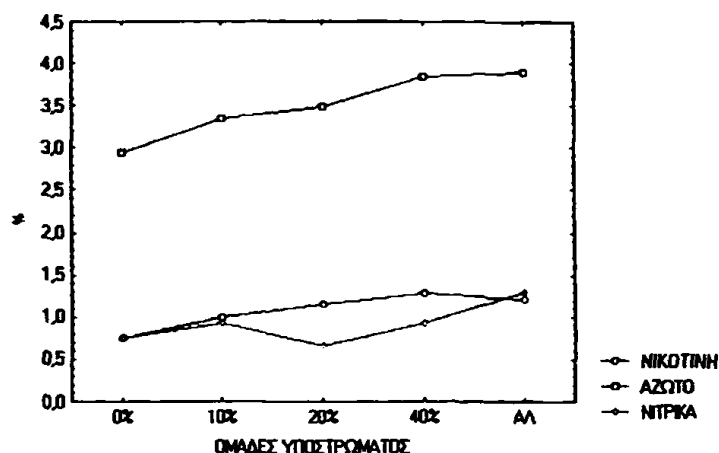
Η συγκέντρωση των **νιτρικών** αυξάνεται σημαντικά με την εφαρμογή της λάσπης. Στην ομάδα 0% η μέση τιμή βρέθηκε 0,576%, ενώ μεταξύ των ομάδων 10%, 20% και 40% δεν παρατηρείται σημαντική διαφοροποίηση (από 1,900% έως 1,905%).

Τα επίπεδα των νιτρικών είναι μη σημαντικά αυξημένα στην ομάδα ΑΛ, όπου εφαρμόστηκε ανόργανη λίπανση (μέση τιμή = 2,225%) (εικ.3.63) και σε αυτές τις συνθήκες εδαφικού pH.



γ) ΠΟΙΚΙΛΙΑ II – pH1

Στην ποικιλία II σε συνθήκες όξινου pH από την ανάλυση διακύμανσης παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές στην περιεκτικότητα νικοτίνης και νιτρικών μεταξύ των διαφόρων ομάδων υποστρώματος. Τα επίπεδα του ολικού αζώτου δεν βρέθηκαν να διαφέρουν σημαντικά.



Εικ. 3.64. Ποικ. II-pH1: Συγκεντρώσεις νικοτίνης, ολ. N και NO_3^- στις ομάδες υποστρωμάτων.

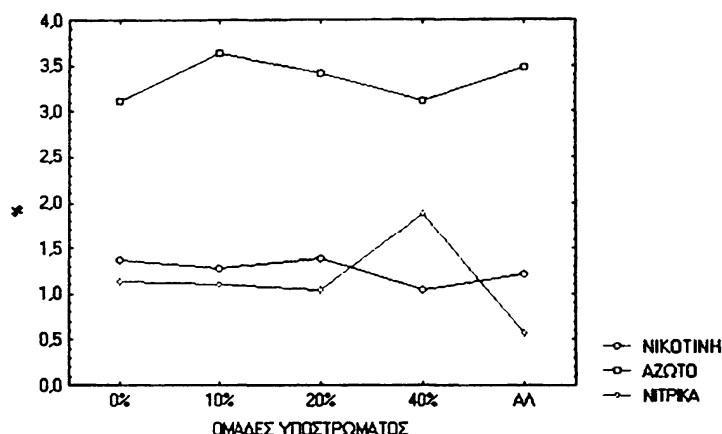
Από τα αποτελέσματά μας (εικ.3.64) διαπιστώνουμε ότι στην ομάδα 0% (έδαφος μόνο) παράγεται η μικρότερη συγκέντρωση νικοτίνης (μέση τιμή = 0,740%). Εφαρμογή λάσπης σε αναλογίες 10%, 20% και 40% προκαλεί ανάλογη αύξηση στα επίπεδα νικοτίνης (σε 0,992%, 1,157% και 1,277% αντίστοιχα). Στην ομάδα όπου εφαρμόστηκε ανόργανη λίπανση η μέση τιμή της νικοτίνης (1,205%) βρέθηκε μικρότερη από την ομάδα με τη μεγαλύτερη προσθήκη λάσπης (ομάδα 40%), αλλά μεγαλύτερη από τις άλλες ομάδες οργανικής λίπανσης.

Όσον αφορά το ολικό άζωτο παρατηρούμε ότι αύξηση της αναλογίας της λάσπης από 0% σε 40% προκαλεί αύξηση της συγκέντρωσης από 2,927% σε 3,835%, ενώ σε συνθήκες ανόργανης λίπανσης (ομάδα ΑΛ) η μέση τιμή μεγιστοποιείται (3,887%).

Τέλος, για τα νιτρικά διαπιστώνουμε ότι η ελάχιστη μέση τιμή εμφανίζεται (0,750%) σε έδαφος χωρίς οργανική ή ανόργανη λίπανση (ομάδα 0%), ενώ εφαρμογή λάσπης βιολογικού καθαρισμού προκαλεί αύξηση στην συγκέντρωση. Σε αναλογία 10% λάσπης, τα επίπεδα νιτρικών είναι 0,925%, ενώ παρατηρούμε ότι αύξηση της περιεκτικότητας οργανικής ουσίας σε 20% προκαλεί μείωση στη μέση τιμή σε 0,650%. Αυξάνοντας περαιτέρω την αναλογία λάσπης (ομάδα 40%), παρατηρούμε αύξηση της συγκέντρωσης νιτρικών, που προσεγγίζουν τα επίπεδα της ομάδας 10%. Στην ομάδα ΑΛ με ανόργανη λίπανση είναι χαρακτηριστικό ότι εμφανίζεται η μέγιστη συσσώρευση (μέση τιμή = 1,300%) νιτρικών.

δ) ΠΟΙΚΙΛΙΑ II – pH 2

Στην ποικιλία II σε συνθήκες αλκαλικού pH από την ανάλυση διακύμανσης βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην συγκέντρωση νικοτίνης και νιτρικών μεταξύ των διαφορετικών ομάδων υποστρώματος, ενώ τα επίπεδα του ολικού αζώτου δεν βρέθηκαν να διαφέρουν σημαντικά.



Εικ. 3.65. Ποικ. II-pH 2: Συγκεντρώσεις νικοτίνης, ολ. N και NO_3^- στις ομάδες υποστρωμάτων.

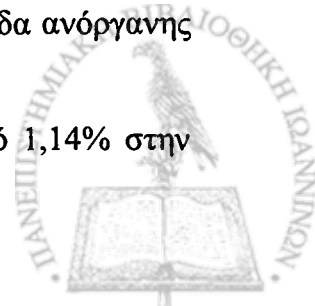
Από τα αποτελέσματά μας (εικ.3.65), διαπιστώνουμε ότι η εφαρμογή λάσπης σε αναλογία 10% προκαλεί μείωση στη μέση τιμή της **νικοτίνης** σε σχέση με την ομάδα 0% (μόνο έδαφος) από 1,37% σε 1,28%. Η προσθήκη οργανικής ουσίας σε αναλογία 20% επαναφέρει την παραγωγή νικοτίνης στα επίπεδα του μάρτυρα (μέση τιμή = 1,39%), ενώ περαιτέρω αύξηση στην ποσότητα λάσπης (ομάδα 40%) προκαλεί σημαντική μείωση στην συγκέντρωση (μέση τιμή = 1,04%).

Στην ομάδα ΑΛ όπου εφαρμόστηκε ανόργανη λίπανση η μέση τιμή της νικοτίνης (1,21%) είναι μικρότερη από όλες τις άλλες ομάδες, εκτός της ομάδας 40% όπου παρατηρείται η μικρότερη συγκέντρωση.

Όσον αφορά το **ολικό άζωτο**, διαπιστώνουμε ότι η εφαρμογή της λάσπης σε αναλογία 10% προκαλεί αύξηση στα επίπεδα, από 3,01% στην ομάδα 0% σε 3,6% στην ομάδα 10%. Με την αύξηση της ποσότητας λάσπης παρατηρείται μείωση στο ολικό άζωτο, από 3,6% στην ομάδα 10% σε 3,1% στην ομάδα 40%. Στην ομάδα ανόργανης λίπανσης η μέση τιμή του ολικού αζώτου είναι 3,5%.

Για τα **νιτρικά** διαπιστώνουμε ότι στην ομάδα με εφαρμογή οργανικής ουσίας σε αναλογία 40% εμφανίζεται η μέγιστη συγκέντρωση (1,87%), ενώ στην ομάδα ανόργανης λίπανσης η ελάχιστη συγκέντρωση (0,6%).

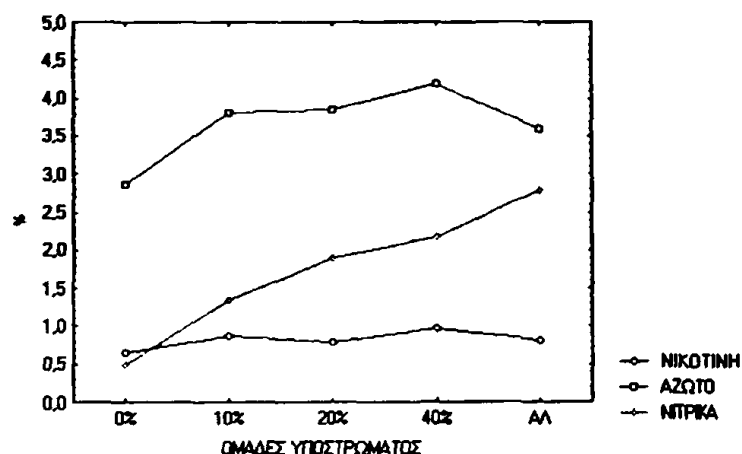
Η προσθήκη λάσπης σε μικρότερες αναλογίες προκαλεί μείωση, από 1,14% στην ομάδα 0% σε 1,05% στην ομάδα 20%



3.2.5. ΕΠΙΠΕΔΑ ΑΖΩΤΟΥΧΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΥΝΑΡΤΗΣΕΙ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΝΕΞΑΡΤΗΤΩΣ ΧΡΟΝΟΥ ΣΥΛΛΟΓΗΣ ΚΑΙ pH

α) ΠΟΙΚΙΛΙΑ Ι

Στην ποικιλία Ι, από την ανάλυση διακύμανσης προέκυψαν ισχυρά στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p=0,000$) στην περιεκτικότητα ολικού αζώτου και NO_3^- , μεταξύ των ομάδων διαφορετικών υποστρωμάτων, ανεξαρτήτως pH και χρόνου συλλογής. Αντιθέτως, για την περιεκτικότητα νικοτίνης δεν διαπιστώθηκαν στατιστικές διαφορές ($p=0,08$) στις διάφορες ομάδες εδαφικής συγκέντρωσης.



Εικ. 3.66. Ποικ. Ι: Συγκεντρώσεις νικοτίνης, ολ. N και NO_3^- στις ομάδες υποστρωμάτων.

Από τα αποτελέσματά μας (εικ.3.66) παρατηρούμε ότι η εφαρμογή οργανικής ουσίας σε αναλογία 10% αυξάνει την παραγωγή νικοτίνης ($p = 0,000$) από 0,647% στην ομάδα 0% σε 0,862% στην ομάδα 10%.

Από το διάγραμμα φαίνεται ότι, αυξανόμενης της αναλογίας της οργανικής ουσίας από την ομάδα 10% στην ομάδα 20%, παρατηρείται μείωση της περιεκτικότητας νικοτίνης από 0,862% σε 0,795%, συγκέντρωση που δεν διαφέρει στατιστικά ($p>0,05$) από την ομάδα 0% (ελέγχου). Με περαιτέρω αύξηση της αναλογίας οργανικής ουσίας (ομάδα 40%) παρατηρείται αύξηση της περιεκτικότητας νικοτίνης σε 0,972% που διαφέρει σημαντικά ($p=0,000$) από την ομάδα 0%. Στην ομάδα ΑΛ (έδαφος με ανόργανη λίπανση) η περιεκτικότητα νικοτίνης είναι 0,810%, σημαντικά ($p=0,000$) μικρότερη από την ομάδα 40% και χωρίς σημαντική ($p>0,05$) διαφορά από τις ομάδες εφαρμογής της λάσπης.

Όσον αφορά το ολικό άζωτο, διαπιστώνεται ότι η εφαρμογή οργανικής λίπανσης στο έδαφος αυξάνει την περιεκτικότητα σημαντικά σε σχέση με την ομάδα 0%. Έτσι, η περιεκτικότητα ολικού αζώτου αυξάνεται από 2,861% στην ομάδα 0% σε 3,822% στην

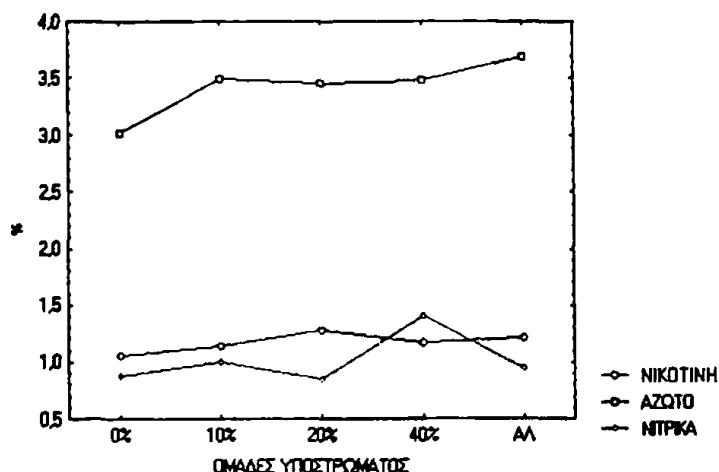
ομάδα 10% ($p=0,01$), σε 3,851% στην ομάδα 20% ($p=0,000$) και σε 4,187% στην ομάδα 40% ($p=0,000$). Στην ομάδα ΑΛ όπου έγινε εφαρμογή ανόργανης λίπανσης το ολικό άζωτο εμφανίζεται μη σημαντικά ($p>0,05$) μειωμένο σε σχέση με τις ομάδες 10%, 20% και 40% και οριακά ($p=0,08$) αυξημένο σε σχέση με την ομάδα 0%.

Η εφαρμογή οργανικής ή ανόργανης λίπανσης φαίνεται ότι προκαλεί σημαντική αύξηση και στην περιεκτικότητα NO_3^- . Έτσι, η συγκέντρωση νιτρικών **αυξάνεται** από 0,494% στην ομάδα 0% σε 2,175% στην ομάδα 40% και οι ομάδες 10%, 20% και 40% διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ($p=0,01$, $p = 0,000$ και $p=0,000$ αντίστοιχα) από την ομάδα ελέγχου (ομάδα 0%). Στην ομάδα ΑΛ, εμφανίζεται η μέγιστη περιεκτικότητα NO_3^- (μέση τιμή = 2,787%) που είναι στατιστικά σημαντικά αυξημένη σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες, ακόμα και από την 40% ($p=0,03$).



β) ΠΟΙΚΙΛΙΑ II

Στην ποικιλία II από την ανάλυση διακύμανσης προέκυψαν ισχυρά στατιστικές διαφορές ($p=0,003$) μόνο ως προς την περιεκτικότητα νικοτίνης μεταξύ των διαφόρων ομάδων υποστρώματος, ανεξαρτήτως pH και χρόνου συλλογής. Όσον αφορά την περιεκτικότητα ολικού αζώτου και NO_3^- στην ποικιλία II δεν διαπιστώθηκαν στατιστικές διαφορές ($p>0,05$).



Εικ. 3.67. Ποικ. II : Συγκεντρώσεις νικοτίνης, ολ. N και NO_3^- στις ομάδες υποστρωμάτων.

Από τα αποτελέσματά (εικ.3.67) μας παρατηρούμε ότι η εφαρμογή οργανικής ουσίας ή ανόργανης λίπανσης αυξάνει την παραγωγή νικοτίνης σε σχέση με την ομάδα 0%, (όπου η περιεκτικότητα είναι 1,056%). Έτσι, η νικοτίνη αυξάνεται από 1,056% στην ομάδα 0% σε 1,138% στην ομάδα 10%, σε μη στατιστικά σημαντικό όμως επίπεδο ($p>0,05$).

Στο διάγραμμα φαίνεται επίσης ότι, αυξανόμενης της οργανικής ουσίας από την ομάδα 10% στην ομάδα 20% υπάρχει αύξηση της περιεκτικότητας νικοτίνης από 1,138% σε 1,276%. Αυξάνοντας την αναλογία οργανικής ουσίας (ομάδα 40%) παρατηρείται μείωση της περιεκτικότητας νικοτίνης σε 1,161% που δεν διαφέρει στατιστικά από την ομάδα 0%. Στην ομάδα ΑΛ η νικοτίνη είναι μη σημαντικά μεγαλύτερη (μέση τιμή = 1,211%) από την ομάδα 40% και την ομάδα 10%, ενώ είναι οριακά ($p=0,04$) μικρότερη από την ομάδα 20% και οριακά ($p=0,04$) μεγαλύτερη από την ομάδα 0%.

Όσον αφορά το ολικό άζωτο, διαπιστώνεται ότι η εφαρμογή οργανικής λίπανσης στο έδαφος αυξάνει μη σημαντικά την περιεκτικότητα σε σχέση με την ομάδα 0%. Έτσι, η περιεκτικότητα ολικού αζώτου αυξάνεται μη σημαντικά ($p=0,09$), από 3,021% στην ομάδα 0% σε 3,495% στην ομάδα 10%. Από την ομάδα 10% στην ομάδα 40% η

περιεκτικότητα ολικού αζώτου διατηρείται σχεδόν σταθερή. Στην ομάδα ΑΛ όπου έγινε εφαρμογή ανόργανης λίπανσης, το ολικό άζωτο εμφανίζεται μη στατιστικά σημαντικά ή οριακά αυξημένο σε σχέση με τις ομάδες 10% ($p > 0,05$), 20% ($p = 0,04$) και 40% ($p > 0,05$) και σημαντικά αυξημένο ($p = 0,03$) σε σχέση με την ομάδα 0%.

Η εφαρμογή οργανικής ή ανόργανης λίπανσης φαίνεται ότι προκαλεί μικρή μεταβολή στην περιεκτικότητα NO_3^- .

Η εφαρμογή οργανικής ουσίας σε αναλογία 10% αυξάνει μη σημαντικά την περιεκτικότητα ($p > 0,05$) από 0,880% στην ομάδα 0% σε 1,00% στην ομάδα 10%, ενώ η εφαρμογή οργανικής ουσίας σε αναλογία 20% μειώνει την περιεκτικότητα σε 0,85% στην ομάδα 20%. Μεγαλύτερη αύξηση στην αναλογία λάσπης (ομάδα 40%) εμφανίζει σημαντική αύξηση της περιεκτικότητας NO_3^- (μέση τιμή = 1,397%). Στην ομάδα 40% παρατηρούμε τη μέγιστη συγκέντρωση NO_3^- .

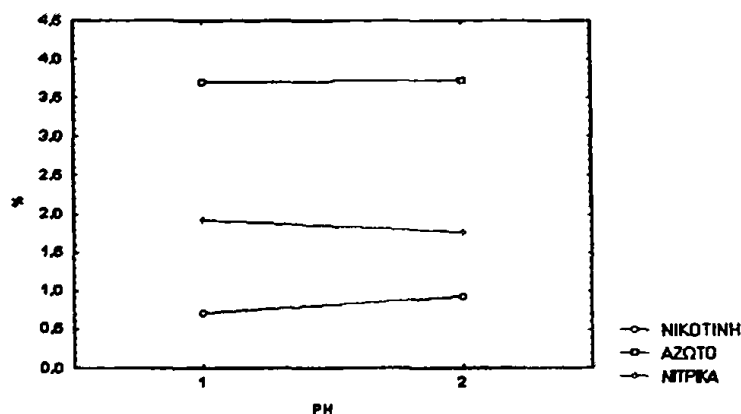
Όσον αφορά την εφαρμογή ανόργανης λίπανσης (ομάδα ΑΛ), παρατηρούμε ότι η περιεκτικότητα NO_3^- είναι στατιστικά σημαντικά μικρότερη ($p < 0,05$) σε σχέση με την ομάδα 40% και δεν διαφέρει από τις υπόλοιπες ομάδες.



3.2.6. ΕΠΙΠΕΔΑ ΑΖΩΤΟΥΧΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΥΝΑΡΤΗΣΕΙ pH

α) ΠΟΙΚΙΛΙΑ Ι

Από την σύγκριση τιμών προέκυψε ότι στην ποικιλία Ι υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p=0,000$) στην περιεκτικότητα νικοτίνης μεταξύ του pH 1 και του pH 2.



Εικ. 3.68. Ποικ. Ι- pH 1 και pH 2 : Συγκεντρώσεις νικοτίνης, ολ. N και NO_3^- .

Στο διάγραμμα (εικ.3.68) φαίνεται ότι η μέση τιμή της περιεκτικότητας νικοτίνης σε συνθήκες pH 2 είναι αυξημένη σε σχέση με τη μέση τιμή της περιεκτικότητας νικοτίνης σε συνθήκες pH 1. Σε συνθήκες αλκαλικού pH η μέση τιμή περιεκτικότητας είναι 0,930%, ενώ σε όξινο pH η μέση τιμή περιεκτικότητας βρέθηκε 0,718%.

Όσον αφορά το ολικό άζωτο διαπιστώθηκε ότι η διαφορά μεταξύ pH 1 και pH 2 δεν είναι στατιστικά σημαντική ($p = 0,08$). Από το διάγραμμα φαίνεται ότι η μέση τιμή της περιεκτικότητας ολικού αζώτου στα φυτά που μεταφυτεύτηκαν σε αλκαλικές συνθήκες εδαφικού pH είναι σχεδόν ίση με τη μέση τιμή της περιεκτικότητας του ολικού αζώτου των φυτών που μεταφυτεύτηκαν σε όξινες συνθήκες εδαφικού pH. Από αυτό συμπεραίνουμε ότι στην ποικιλία Ι το pH δεν επηρεάζει την συγκέντρωση ολικού αζώτου.

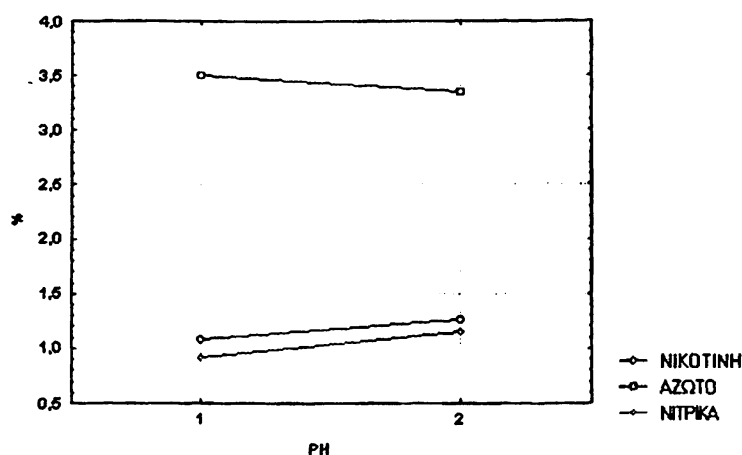
Από την σύγκριση τιμών διαπιστώθηκε επίσης ότι στην ποικιλία Ι οι συγκεντρώσεις των NO_3^- δεν διαφέρουν στα 2 εδαφικά pH, οπότε συμπεραίνουμε ότι το pH δεν επηρεάζει την περιεκτικότητα NO_3^- .

Η μέση τιμή NO_3^- σε pH 1 βρέθηκε 1,914% και η μέση τιμή NO_3^- σε pH 2 βρέθηκε 1,770%.



β) ΠΟΙΚΙΛΙΑ II

Στην ποικιλία II από την σύγκριση τιμών προέκυψε ότι η περιεκτικότητα νικοτίνης διαφέρει στατιστικά σημαντικά ($p=0,0001$) στα δύο pH.



Εικ. 3.69. Ποικ. II- pH 1 και pH 2 : Συγκεντρώσεις νικοτίνης, ολ. N και NO_3^- .

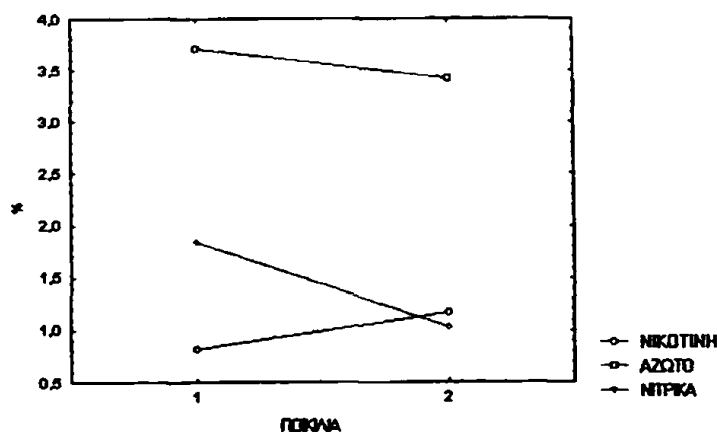
Στο διάγραμμα (εικ.3.69) φαίνεται ότι η μέση τιμή της νικοτίνης στο pH 2 είναι αυξημένη σε σχέση με το pH 1 (μέση τιμή σε pH 1 = 1,074% και μέση τιμή pH 2 = 1,263%). Από τα αποτελέσματα αυτά συμπεραίνουμε ότι στην ποικιλία II το εδαφικό pH επηρεάζει την παραγωγή νικοτίνης.

Όσον αφορά το ολικό άζωτο και τα NO_3^- δεν διαπιστώθηκε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στα δύο pH ($p > 0,05$).

Η μέση τιμή του ολικού αζώτου σε pH 1 βρέθηκε 3,498% ενώ σε pH 2 βρέθηκε 3,349% και η μέση τιμή των NO_3^- σε pH 1 βρέθηκε 0,909% και σε pH 2 βρέθηκε 1,151%.

3.2.7. ΕΠΙΠΕΔΑ ΑΖΩΤΟΥΧΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΥΝΑΡΤΗΣΕΙ ΠΟΙΚΙΛΙΑΣ

Από την σύγκριση τιμών διαπιστώθηκε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0,000$) στην περιεκτικότητα νικοτίνης μεταξύ της ποικιλίας I και της ποικιλίας II.



Εικ. 3.70. Ποικ. I και Ποικ. II: Συγκεντρώσεις νικοτίνης, ολ. N και NO_3^- .

Στο διάγραμμα (εικ.3.70) φαίνεται ότι η μέση τιμή νικοτίνης στην ποικιλία II εμφανίζεται σημαντικά αυξημένη σε σχέση με τη μέση τιμή στην ποικιλία I.

Όσον αφορά το ολικό άζωτο δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0,08$) μεταξύ των δύο ποικιλιών.

Για την περιεκτικότητα NO_3^- διαπιστώθηκε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p = 0,000$) στις δύο ποικιλίες. Η μέση τιμή της περιεκτικότητας NO_3^- στην ποικιλία II είναι σημαντικά μειωμένη (μέση τιμή = 1,020%) σε σχέση με την ποικιλία I (μέση τιμή = 1,840%).

3.2.8. ΕΠΙΠΕΔΑ ΑΖΩΤΟΥΧΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΥΝΑΡΤΗΣΕΙ ΠΟΙΚΙΛΙΑΣ ΚΑΙ pH

Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι όταν λαμβάνονται υπόψη οι διαφορετικές συνθήκες εδαφικού pH, διατηρούνται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές που προαναφέρθηκαν στην προηγούμενη παράγραφο.

Έτσι, σε συνθήκες όξινου pH η περιεκτικότητα της νικοτίνης είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη ($p=0,0014$) στην ποικιλία II σε σχέση με την ποικιλία I. Το ίδιο παρατηρείται και σε αλκαλικό pH ($p=0,000$). Φαίνεται λοιπόν ότι το pH δεν επηρεάζει τις διαφορές περιεκτικότητας νικοτίνης μεταξύ των δύο ποικιλιών.

Η περιεκτικότητα του ολικού αζώτου δεν διαφέρει στατιστικά σημαντικά ($p>0,5$) τόσο σε όξινο όσο και σε αλκαλικό pH μεταξύ των δύο ποικιλιών.

Η περιεκτικότητα των NO_3^- μειώνεται σημαντικά σε όξινο pH ($p=0,000$) στην ποικιλία II. Το ίδιο ισχύει και για το αλκαλικό pH ($p=0,025$).

Από τα παραπάνω μπορούμε να ισχυριστούμε ότι το pH του υποστρώματος ανάπτυξης δεν φαίνεται να επηρεάζει την συμπεριφορά των δύο ποικιλιών στην βιοσύνθεση των αζωτούχων ενώσεων.



3.3. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΝΙΚΟΤΙΝΗΣ ΚΑΙ ΒΑΡΕΩΝ ΜΕΤΑΛΛΩΝ

3.3.1. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΝΙΚΟΤΙΝΗΣ ΚΑΙ ΒΑΡΕΩΝ ΜΕΤΑΛΛΩΝ ΣΤΙΣ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΟΜΑΔΕΣ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ

α) ΠΟΙΚΙΛΙΑ Ι

Στην ομάδα φυτών που αναπτύχθηκαν σε 0% αναλογία λάσπης βιολογικού καθαρισμού βρέθηκε ισχυρή θετική συσχέτιση ($r=0,841$ και στατιστική σημαντικότητα $p=0,000$) μεταξύ νικοτίνης και Pb.

Αντιθέτως στην ομάδα που εφαρμόστηκε 10% αναλογία λάσπης βρέθηκαν ισχυρά αρνητικές συσχετίσεις μεταξύ νικοτίνης και Cr ($r=-0,744$ και $p=0,000$) όπως και μεταξύ νικοτίνης και Cd ($r=-0,633$ και $p=0,000$).

Ισχυρές αρνητικές συσχετίσεις νικοτίνης – Cr και νικοτίνης – Cd βρέθηκαν και στην ομάδα με αναλογία λάσπης 20% ($r=-0,669$ και $r=-0,732$ και $p=0,000$ και $p=0,000$). Στην ίδια ομάδα φυτών βρέθηκε ότι η νικοτίνη και ο Zn συσχετίζονται αρνητικά ($r=-0,851$ και $p=0,000$). Αρνητική συσχέτιση στην ομάδα 20% βρέθηκε και μεταξύ νικοτίνης και Pb ($r=-0,663$ και $p=0,000$). Το μόνο μέταλλο για το οποίο δεν παρατηρείται συσχέτιση τιμών με τις τιμές της νικοτίνης στην ομάδα 20% είναι ο Cu.

Στην ομάδα όπου εφαρμόστηκε η μεγαλύτερη αναλογία λάσπης βιολογικού καθαρισμού 40% (ομάδα 40%) βρέθηκε θετική συσχέτιση ($r=0,546$ και $p=0,011$) μεταξύ των τιμών της νικοτίνης και του Cr ενώ τα υπόλοιπα μέταλλα δεν βρέθηκαν να συσχετίζονται με τη νικοτίνη.

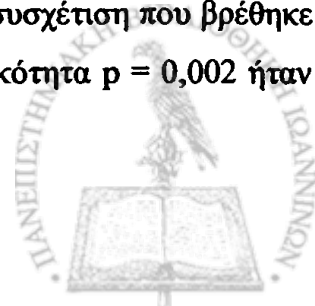
Στην ομάδα ΑΛ όπου εφαρμόστηκε ανόργανη λίπανση δεν βρέθηκαν συσχετίσεις νικοτίνης και βαρέων μετάλλων (πιν.3.1).

β) ΠΟΙΚΙΛΙΑ ΙΙ

Στην ποικιλία ΙΙ δεν διαπιστώθηκαν ανάλογες σχέσεις τιμών νικοτίνης και βαρέων μετάλλων με την ποικιλία Ι, στις διάφορες ομάδες υποστρώματος.

Έτσι, συσχέτιση βρέθηκε στην ομάδα 0% και στην ομάδα 10% μόνο μεταξύ της νικοτίνης και Cd. Η συσχέτιση νικοτίνης – Cd ήταν αρνητική τόσο στην ομάδα 0% ($r=-0,615$ και $p=0,001$) όσο και στην ομάδα 10% ($r=-0,606$ και $p=0,002$).

Στην ομάδα φυτών που αναπτύχθηκαν σε έδαφος με αναλογία λάσπης 20% δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση τιμών μεταξύ νικοτίνης και Cd. Η μόνη συσχέτιση που βρέθηκε με οριακό αρνητικό συντελεστή $r=-0,521$ και στατιστική σημαντικότητα $p=0,002$ ήταν μεταξύ της νικοτίνης και του Cu στην ομάδα 20%.



Στην ομάδα 40% όπου εφαρμόστηκε η μέγιστη αναλογία λάσπης βιολογικού καθαρισμού δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση νικοτίνης και **Cd** ενώ βρέθηκε ότι η νικοτίνη συσχετίζεται αρνητικά με συντελεστή $r=-0,655$ και $p=0,000$ με τις τιμές του **Pb**.

Τέλος στην ομάδα όπου εφαρμόστηκε ανόργανη λίπανση (ομάδα ΑΛ) δεν διαπιστώθηκαν συσχετίσεις νικοτίνης και βαρέων μετάλλων (πιν.3.2).

3.3.2. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΝΙΚΟΤΙΝΗΣ ΚΑΙ ΒΑΡΕΩΝ ΜΕΤΑΛΛΩΝ ΣΤΟΥΣ ΔΙΑΦΟΡΟΥΣ ΧΡΟΝΟΥΣ ΣΥΛΛΟΓΗΣ.

α) ΠΟΙΚΙΛΙΑ Ι

Στα γηραιότερα φύλλα (χρόνος 1) της ποικιλίας Ι η νικοτίνη και το **Cd** συσχετίζονται αρνητικά ($r=-0,643$) με στατιστική σημαντικότητα ($p=0,000$). Συσχέτιση διαπιστώθηκε και μεταξύ των τιμών της νικοτίνης και του **Pb** με οριακό θετικό συντελεστή ($r=0,5$) και ($p=0,01$) στον ίδιο χρόνο.

Στα αμέσως νεώτερα φύλλα (χρόνος 2) δεν βρέθηκαν συσχετίσεις νικοτίνης και βαρέων μετάλλων. Στα φύλλα τρίτου χρόνου συλλογής (χρόνος 3) σημειώθηκαν ισχυρά αρνητικές συσχετίσεις μεταξύ της νικοτίνης και όλων των βαρέων μετάλλων εκτός του **Pb**. Έτσι, οι συντελεστές μεταξύ νικοτίνης και **Zn**, **Cr**, **Cu** και **Cd** ήταν αντίστοιχα $r=-0,603$, $r=-0,514$, $r=-0,621$ και $r=-0,630$ και τα επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας ήταν $p=0,000$, $p=0,006$, $p=0,000$ και $p=0,000$ αντίστοιχα.

Στα πλέον νεαρά φύλλα (χρόνος 4) βρέθηκαν θετικές συσχετίσεις νικοτίνης και **Cr** (με $r=0,572$ και $p=0,002$) και νικοτίνης και **Pb** (με $r=0,636$ και $p=0,000$) (πιν.3.3).

β) ΠΟΙΚΙΛΙΑ ΙΙ

Στην ποικιλία ΙΙ δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ νικοτίνης και βαρέων μετάλλων στους διάφορους χρόνους συλλογής των φυτών .

Στα φύλλα τρίτου χρόνου συλλογής (χρόνος 3) σημειώθηκε μια οριακή αρνητική συσχέτιση νικοτίνης και **Zn** με ($r=-0,508$ και $p=0,008$).

Στα νεαρότερα φύλλα της ποικιλίας ΙΙ (χρόνος 4) οι τιμές της νικοτίνης και του **Cd** συσχετίζονται επίσης οριακά αρνητικά ($r=-0,562$ και $p=0,001$) (πιν.3.4).



3.3.3. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΝΙΚΟΤΙΝΗΣ ΚΑΙ ΒΑΡΕΩΝ ΜΕΤΑΛΛΩΝ ΣΤΑ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΑ pH.

α) ΠΟΙΚΙΛΙΑ Ι

Σε συνθήκες όξινου pH στην ποικιλία Ι δεν εμφανίζονται συσχετίσεις μεταξύ νικοτίνης και βαρέων μετάλλων.

Αντίθετα σε συνθήκες αλκαλικού pH οι συγκεντρώσεις νικοτίνης και Cd εμφανίζουν αρνητική συσχέτιση ($r=-0,592$) με στατιστική σημαντικότητα ($p=0,000$). Οριακή αρνητική συσχέτιση ($r=-0,500$ και $p=0,000$) διαπιστώθηκε επίσης μεταξύ νικοτίνης και Pb στις αλκαλικές συνθήκες (πιν.3.5).

β) ΠΟΙΚΙΛΙΑ ΙΙ

Στην ποικιλία ΙΙ βρέθηκε αρνητική συσχέτιση νικοτίνης και Cd μόνο σε συνθήκες όξινου pH με συντελεστή $r=-0,592$ και $p=0,000$. Στις ίδιες συνθήκες pH διαπιστώθηκε αρνητική συσχέτιση ($r=-0,500$ και $p=0,000$) νικοτίνης και Pb. Αντιθέτως, σε αλκαλικό εδαφικό pH διαπιστώθηκε θετική συσχέτιση μόνο μεταξύ νικοτίνης και Cr στην ποικιλία ΙΙ, ($r=0,520$ και $p=0,000$) (πιν.3.6).

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.1: Συσχέτιση νικοτίνης-μετάλλων στην ποικιλία Ι στις 5 ομάδες υποστρωμάτων

<i>R_{NIC}</i> (I ποικιλία)					
	0%	10%	20%	40%	Α1
<i>Zn</i>			-0,85		
<i>Cr</i>		-0,77	-0,66	0,54	
<i>Pb</i>	0,84		-0,66		
<i>Cd</i>		-0,63	-0,73		
<i>Cu</i>					

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.2: Συσχέτιση νικοτίνης-μετάλλων στην ποικιλία ΙΙ στις 5 ομάδες υποστρωμάτων

<i>R_{NIC}</i> (II ποικιλία)					
	0%	10%	20%	40%	Α1
<i>Zn</i>					
<i>Cr</i>	0,47				
<i>Pb</i>				-0,65	
<i>Cd</i>	-0,61	-0,60			
<i>Cu</i>			-0,52		



ΠΙΝΑΚΑΣ 3.3: Συσχέτιση νικοτίνης-μετάλλων στους χρόνους συλλογής της ποικιλίας I

<i>R_{NIC}</i> (I ποικιλία)				
	1	2	3	4
<i>Zn</i>			-0,603	
<i>Cr</i>			-0,514	0,572
<i>Pb</i>	0,500			0,636
<i>Cd</i>	-0,643		-0,630	
<i>Cu</i>			-0,621	

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.4: Συσχέτιση νικοτίνης-μετάλλων στους χρόνους συλλογής της ποικιλίας II

<i>R_{NIC}</i> (II ποικιλία)				
	1	2	3	4
<i>Zn</i>			-0,508	
<i>Cr</i>				
<i>Pb</i>				
<i>Cd</i>				-0,562
<i>Cu</i>				

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.5: Συσχέτιση νικοτίνης-μετάλλων στην ποικιλία I σε όξινο και αλκαλικό pH

<i>R_{NIC}</i> (I ποικιλία)		
	<i>pH₁</i>	<i>pH₂</i>
<i>Pb</i>		-0,50
<i>Cd</i>		-0,59

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.6: Συσχέτιση νικοτίνης-μετάλλων στην ποικιλία II σε όξινο και αλκαλικό pH

<i>R_{NIC}</i> (II ποικιλία)		
	<i>pH₁</i>	<i>pH₂</i>
<i>Pb</i>	-0,50	
<i>Cd</i>	-0,59	
<i>Cr</i>		0,52



3.4. ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΒΑΡΕΩΝ ΜΕΤΑΛΛΩΝ

3.4.1. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕΤΑΛΛΩΝ ΣΤΟΥΣ ΔΙΑΦΟΡΟΥΣ ΧΡΟΝΟΥΣ ΣΥΛΛΟΓΗΣ

Στην ποικιλία I παρατηρούνται σημαντικές θετικές συσχετίσεις στους χρόνους 3 και 4. Στον χρόνο 3 ο Zn παρουσιάζει στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση με τα Pb, Cu και Cd, ο Pb εμφανίζει θετική συσχέτιση με τα Cu και Cd και ο Cu με το Cd.

Στον χρόνο 4 ο Zn βρέθηκε να συσχετίζεται θετικά με τα Pb, Cu και Cd, το Cd έχει θετική συσχέτιση με τα Pb και Cu και το Cr έχει θετική συσχέτιση με το Pb (πίνακας 3.7).

Στην ποικιλία II βρέθηκαν περιορισμένες συσχετίσεις βαρέων μετάλλων στους χρόνους 3 και 4.

Στον χρόνο 3 διαπιστώθηκαν αρνητικές συσχετίσεις με στατιστική σημαντικότητα μεταξύ των Zn και Pb όπως και μεταξύ των Cd και Pb, και θετική συσχέτιση μεταξύ των Zn και Cd.

Στον χρόνο 4 βρέθηκε ότι ο Zn και το Cr συσχετίζονται αρνητικά σε οριακό επίπεδο, ενώ ο Pb και ο Cu συσχετίζονται θετικά (πίνακας 3.8).

Στους χρόνους 1 και 2 δεν διαπιστώθηκαν σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ βαρέων μετάλλων στις ποικιλίες I και II.

3.4.2. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕΤΑΛΛΩΝ ΣΤΙΣ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΟΜΑΔΕΣ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ

Στην ποικιλία I διαπιστώθηκαν θετικές συσχετίσεις μεταξύ των βαρέων μετάλλων σε όλες τις ομάδες υποστρώματος.

Στις ομάδες 0%, 20% και 40% εμφανίζονται οι περισσότερες συσχετίσεις και στις ομάδες 10% και ΑΛ οι λιγότερες (πίνακας 3.9).

Στην ποικιλία II οι συσχετίσεις μεταξύ των βαρέων μετάλλων και στις 5 ομάδες υποστρώματος, σε σχέση με την ποικιλία I είναι περιορισμένες.

Οι περισσότερες εμφανίζονται στην 0% και οι λιγότερες στην ομάδα 40%.

Στις ομάδες με αναλογία λάσπης 10% και 20% διαπιστώθηκαν και αρνητικές συσχετίσεις (πίνακας 3.10).



3.4.3. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕΤΑΛΛΩΝ ΣΤΑ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΑ pH

Στην ποικιλία I δεν βρέθηκαν συσχετίσεις μετάλλων σε όξινο pH, ενώ διαπιστώθηκαν στατιστικά σημαντικές θετικές συσχετίσεις σε συνθήκες αλκαλικού pH.

Στην ποικιλία II δεν εντοπίστηκαν πολλές συσχετίσεις μετάλλων, τόσο σε συνθήκες όξινου όσο και σε συνθήκες αλκαλικού pH.

Στα δύο pH, η μόνη συσχέτιση που διαπιστώθηκε για την ποικιλία II ήταν μεταξύ των Pb και Cd με συντελεστές $r=0,551$ και $r=0,650$ αντίστοιχα (πίνακας 3.11).

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.7 :Συσχετίσεις μετάλλων στους χρόνους συλλογής της ποικιλίας I

$R_{\text{Μετάλλων}} (I \text{ ποικιλία})$				
	1	2	3	4
$Zn - Cr$				
$Zn - Pb$			0,797	0,611
$Zn - Cu$			0,842	0,640
$Zn - Cd$			0,832	0,531
$Cr - Pb$				0,755
$Cr - Cu$				
$Cr - Cd$				
$Pb - Cu$			0,715	
$Pb - Cd$			0,697	0,631
$Cu - Cd$			0,655	0,586

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.8: Συσχετίσεις μετάλλων στους χρόνους συλλογής της ποικιλίας II

$R_{\text{Μετάλλων}} (II \text{ ποικιλία})$				
	1	2	3	4
$Zn - Cr$				-0,536
$Zn - Pb$			-0,636	
$Zn - Cu$				
$Zn - Cd$			0,669	
$Cr - Pb$				
$Cr - Cu$				
$Cr - Cd$				
$Pb - Cu$				0,672
$Pb - Cd$			-0,673	
$Cu - Cd$				



ΠΙΝΑΚΑΣ 3.9: Συσχετίσεις μετάλλων στην ποικιλία Ι, στις 5 ομάδες υποστρωμάτων

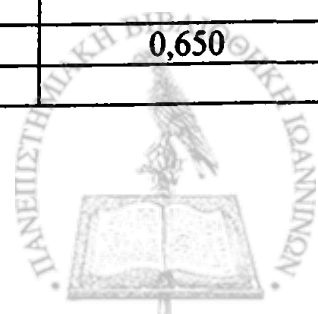
<i>R</i> _{Μετάλλων} (Ι ποικιλία)					
	0%	10%	20%	40%	ΑΑ
<i>Zn – Cr</i>	0,675		0,861		
<i>Zn – Pb</i>			0,861	0,930	
<i>Zn – Cu</i>	0,636	0,681		0,765	
<i>Zn – Cd</i>	0,699		0,894	0,887	0,672
<i>Cr – Pb</i>		0,586	0,764		0,669
<i>Cr – Cu</i>	0,710				
<i>Cr – Cd</i>	0,809		0,790		
<i>Pb – Cu</i>				0,857	
<i>Pb – Cd</i>			0,795	0,784	
<i>Cu – Cd</i>	0,947		0,517	0,657	

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.10: Συσχετίσεις μετάλλων στην ποικιλία ΙΙ, στις 5 ομάδες υποστρωμάτων

<i>R</i> _{Μετάλλων} (ΙΙ ποικιλία)					
	0%	10%	20%	40%	ΑΑ
<i>Zn – Cr</i>					
<i>Zn – Pb</i>				0,770	
<i>Zn – Cu</i>	0,593				
<i>Zn – Cd</i>	0,788	0,670			
<i>Cr – Pb</i>	0,713				0,537
<i>Cr – Cu</i>					
<i>Cr – Cd</i>			-0,529		
<i>Pb – Cu</i>	0,556	-0,806			
<i>Pb – Cd</i>					
<i>Cu – Cd</i>	0,518		-0,564		0,629

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.11: Συσχετίσεις μετάλλων στις ποικιλίες Ι και ΙΙ σε όξινο και αλκαλικό pH

	<i>R</i> ^I _{Μετάλλων} (pH)		<i>R</i> ^{II} _{Μετάλλων} (pH)	
	pH ₁	pH ₂	pH ₁	pH ₂
<i>Zn – Cr</i>				
<i>Zn – Pb</i>		0,559		
<i>Zn – Cu</i>				
<i>Zn – Cd</i>		0,584		
<i>Cr – Pb</i>		0,572		
<i>Cr – Cu</i>				
<i>Cr – Cd</i>		0,606		
<i>Pb – Cu</i>		0,650		
<i>Pb – Cd</i>		0,928	0,551	0,650
<i>Cu – Cd</i>		0,686		



4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι σοβαρές επιπτώσεις στην υγεία των διαφόρων συστατικών του καπνού όπως του CO, της νικοτίνης και της πίσσας (Total Particulate Matter), καθώς και των καρκινογόνων παραγόντων που περιέχονται στο αέριο προϊόν του όπως των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων (PAH: polycyclic aromatic hydrocarbons), των αρωματικών αμινών και των ειδικών νιτροζαμινών του καπνού (TSNA:Tobacco-Specific Nitrosamines) αναφέρονται εκτεταμένα στην διεθνή βιβλιογραφία (Hoffmann D. et al.1997 b).

Τα τελευταία χρόνια, οι ερευνητές άρχισαν να προσανατολίζονται στην μελέτη της συγκέντρωσης των βαρέων μετάλλων και των άλλων ιχνοστοιχείων στο αέριο προϊόν του καπνού καθώς και των πιθανών επιπτώσεών τους στην βιοχημεία και μεταβολισμό του ανθρώπινου σώματος (Smith CJ. et al,1997, Wu DE.,1994).

Επίσης δεδομένου ότι, κατά την διάρκεια του καπνίσματος και μετά την εισπνοή τους, τα μέταλλα έχουν μεγάλο βιολογικό χρόνο ημισείας ζωής, η παρατεταμένη πρόσληψή τους μπορεί να προκαλέσει χρόνιες δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία και πιθανόν καρκινογένεση λόγω της καρκινογόνου δράσης ορισμένων από αυτά (π.χ. Cr, Cd, Pb) (Chiba M.et al,1992).

Εξάλλου, η συσσώρευση των βαρέων μετάλλων στον οργανισμό αυξάνεται και από διατροφικούς ή περιβαλλοντικούς παράγοντες, οπότε το κάπνισμα ενισχύει την δυσμενή δράση τους. Ο Schenker υπολόγισε π.χ. ότι η εβδομαδιαία πρόσληψη Cd από τις τροφές και το νερό είναι 286μg, ενώ το κάπνισμα 40 τσιγάρων την ημέρα επιβαρύνει τον καπνιστή στα διπλάσια επίπεδα (Schenker D.,1984).

Ανάλογα με το είδος του μετάλλου, παρατηρείται αυξημένη συσσώρευση σε διαφορετικά όργανα και ιστούς, παρόλο που δεν απορροφώνται όλες οι εισπνεόμενες ποσότητες που περιέχονται στο κύριο ρεύμα καπνού.

Στους καπνιστές, εντοπίζονται αυξημένες συγκεντρώσεις Cd στο αίμα, στον λιπώδη ιστό, στον προστάτη, στο νεφρό και στους μύες όπου μπορεί να προκληθεί μεταλλαξογένεση και πιθανόν καρκινογένεση είτε μέσω άμεσης οξειδωτικής βλάβης ή/και παρεμπόδισης της επιδιορθωτικής διαδικασίας των ενδογενών βλαβών του DNA που επάγουν άλλοι μεταλλαξόνοι παράγοντες, είτε μέσω μηχανισμών έμμεσης τοξικότητας (Yang JL. et al,1996, Hartwig A.,1998, Gong Q. et al,1997, Ferraroni M.et al,1999).



Όσον αφορά το Cr, αναφέρεται ότι συσσωρεύεται σε υψηλές συγκεντρώσεις κυρίως στον πνεύμονα των ενεργών καπνιστών, ενώ τα επίπεδά του δεν μεταβάλλονται στους πρώην καπνιστές, με αποτέλεσμα την συμμετοχή του ανάλογα με το σθένος του στην παραγωγή, μέσω ενδοκυτταρικής αναγωγής, δραστικών μορφών οξυγόνου που μπορούν να προκαλέσουν προμεταλλακτικές βλάβες (Liu S. et al, 1999, Casadevall M. et al, 1999).

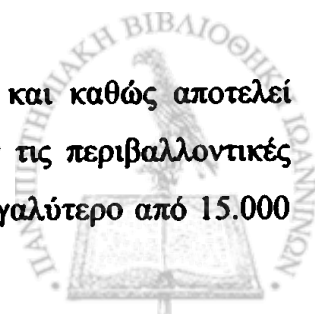
Επίσης, στους καπνιστές αναφέρονται υψηλές συγκεντρώσεις Pb στο αίμα, οπότε είναι αναμενόμενη η ανάμιξή του σε έμμεσους μηχανισμούς οξειδωτικού stress, όπως η ενίσχυση της υπεροξειδωσης των λιπιδίων στα ερυθρά αιμοσφαίρια, η αναστολή μηχανισμών άμυνας και η διέγερση φλεγμονώδους αντίδρασης (Gurer H. et al, 1998, Kasprzak K.S., 1995).

Όσον αφορά τον Cu, παρόλο ότι δεν βρέθηκαν διαφορές στις συγκεντρώσεις του σε όργανα καπνιστών όπως ο νεφρός που να σχετίζονται με το κάπνισμα και παρόλο που συμμετέχει στην ενζυμική δράση ορισμένων μεταλλοενζύμων όπως η CuZnSOD, βρέθηκε ότι είναι αυξημένος στο πλάσμα των καπνιστών και σχετίζεται τόσο με την τροποποίηση γονιδίων μέσω παραγωγής οξειδωτικών ριζών, όσο και με την επαγωγή οξειδωτικού stress, καθώς και με την αναστολή ενζυμικών συστημάτων νουκλεοτιδικής επιδιόρθωσης ή αντιγραφής (Porter DW. et al, 1997, Calsou P. et al, 1996).

Για τον Zn, παρά την υψηλή συγκέντρωσή του στα φυτά του καπνού και δεδομένης της συμμετοχής του στην αντιοξειδωτική προστασία και γονιδιακή ρύθμιση, οι αναφορές που υπάρχουν δείχνουν ότι τα επίπεδά του δεν φαίνεται να επηρεάζονται από το κάπνισμα, με μόνη εξαίρεση τον νεφρό όπου βρέθηκαν αυξημένα και όπου αναμένεται να ενισχύει τον ρόλο των αντιοξειδωτικών ενζύμων και των ενζυματικών μεταγραφικών συστημάτων (Merplan C. et al, 1999, Palmiter RD., 1994, Vallee BL. et al, 1995).

Έχοντας υπόψη τα παραπάνω δεδομένα, ενισχύεται η άποψη ότι στις σύγχρονες καλλιέργειες του καπνού θα πρέπει να δίνεται μεγαλύτερη προσοχή στην επιλογή υποστρωμάτων ανάπτυξης και καλλιεργητικών συνθηκών όπως και στην κατάλληλη επιλογή γονοτύπων και φυτικών τμημάτων των καλλιεργούμενων ποικιλιών καπνού, ώστε να ελαχιστοποιηθεί η συγκέντρωση επιβλαβών βαρέων μετάλλων στο αέριο προϊόν του καπνού και κατά συνέπεια στον καπνιστή.

Σύμφωνα με την οδηγία 271/91 της Ευρωπαϊκής Ένωσης και καθώς αποτελεί κοινωνική πλέον ανάγκη η εφαρμογή μέτρων που θα βελτιώσουν τις περιβαλλοντικές συνθήκες και την δημόσια υγεία, όλοι οι οικισμοί με πληθυσμό μεγαλύτερο από 15.000



κατοίκους θα πρέπει μέχρι το 2001 να διαθέτουν αποχετευτικό δίκτυο και να υποβάλλουν τα λύματά τους σε δευτεροβάθμια ή ισοδύναμη επεξεργασία.

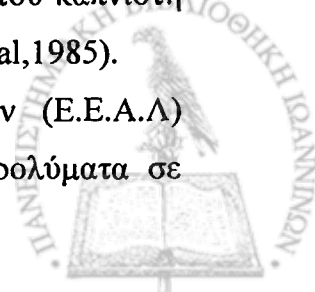
Με την πλήρη εφαρμογή της παραπάνω οδηγίας αναμένεται αύξηση της τάξης του 70% στην συνολικά παραγόμενη ιλύ, που θα συγκεντρώνει το μεγαλύτερο ποσοστό του ρυπαντικού φορτίου των ανεπεξέργαστων λυμάτων. Στην ΚΥΑ 80568/4225 προβλέπεται η χρησιμοποίηση της επεξεργασμένης ιλύος, δηλαδή «η διασπορά της επί του εδάφους ή οποιαδήποτε άλλη χρησιμοποίηση της πάνω και μέσα στο έδαφος», με την προϋπόθεση ότι θα εξετάζονται πρώτα οι σχετικές παράμετροι και οι συγκεντρώσεις των περιεχόμενων βαρέων μετάλλων και οργανικών ρυπαντών δεν θα υπερβαίνουν τα επιτρεπτά όρια (Τσατήρης Β. και συν., 1994). Δεδομένης της ενδεχόμενης χρήσης της ιλύος για γεωργικούς σκοπούς, υπάρχει έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον, τουλάχιστον σε ευρωπαϊκό επίπεδο, στη μελέτη των περιβαλλοντικών επιπτώσεων και στην υγεία του ανθρώπου κατά τη μακροχρόνια χρησιμοποίησή της (Gigliotti G. et al, 1993).

Η χρήση της ιλύος στην γεωργία αποτελεί μια εύκολη και φθηνή λύση διάθεσής της και οι πρώτες εφαρμογές της έδειξαν παλιότερα ότι μπορεί να έχει υψηλή λιπασματική αξία στις διάφορες καλλιέργειες.

Στην συνέχεια όμως οι έρευνες έδειξαν ότι η συχνή και παρατεταμένη χρήση της στο ίδιο έδαφος δημιούργησε σε πολλές περιπτώσεις περιβαλλοντικά προβλήματα και υποβάθμιση των εδαφών όπου χρησιμοποιήθηκε. Η συσσώρευση των βαρέων μετάλλων στα καλλιεργούμενα εδάφη και κατά συνέπεια στα καλλιεργούμενα φυτά, απασχόλησε ιδιαίτερα τους ερευνητές οι οποίοι προσπαθούν τις τελευταίες δεκαετίες να καθορίσουν το πλαίσιο μέσα στο οποίο θα πρέπει να είναι επιτρεπτή ή όχι η γεωργική χρήση της. Οι μελέτες που υπάρχουν διεθνώς είναι αντικρουόμενες. Παρόλα αυτά δεν θα ήταν επιστημονικά ορθό να γίνονται γενικεύσεις διότι τα απόβλητα του κάθε αστικού οικισμού αντιστοιχούν στο μέγεθος και στην βιομηχανική ανάπτυξή του.

Η χρήση της λάσπης στην καλλιέργεια του καπνού αρχικά φάνηκε ως μια καλή εναλλακτική λύση, καθότι ο καπνός χρησιμοποιείται μόνο για την παρασκευή τσιγάρων και δεν προσλαμβάνεται όπως τα διάφορα εδάφιμα φυτικά είδη άμεσα με την διατροφή. Στην συνέχεια όμως, μετά την διαπίστωση ότι τα προσλαμβανόμενα βαρέα μέταλλα στον καπνό συσσωρεύονται, αντίθετα από τα άλλα φυτικά είδη, κυρίως στα φύλλα του, άρχισε να υπάρχει έντονος προβληματισμός σε σχέση με την τελική επιβάρυνση του καπνιστή από τα βαρέα μέταλλα που περιέχονται στο αέριο προϊόν του (Bache CA. et al, 1985).

Στα Ιωάννινα η Εγκατάσταση Επεξεργασίας Αστικών Λυμάτων (Ε.Ε.Α.Λ) λειτουργεί από το 1992 και δέχεται 5000m³ / ημέρα λύματα και βοθρολύματα σε



αναλογία 2,5:1 αντίστοιχα. Κατά τις μετρήσεις της περιεκτικότητας βαρέων μετάλλων σε δείγματα υλός προερχόμενα από την Ε.Ε.Α.Λ φάνηκε ότι οι τιμές δεν υπερβαίνουν τα επιτρεπτά όρια, ενώ σε εδάφη όπου είχε προηγηθεί παρατεταμένη απόθεση υλός οι μετρήσεις έδειξαν ότι τα επίπεδα του Cu βρίσκονται ελαφρώς άνω του ορίου και του Cd υπερβαίνει κατά 1,4 ppm τα επιτρεπτά όρια.

Τα αποτελέσματα αυτά οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι είναι υπαρκτός ο κίνδυνος ρύπανσης και ότι είναι αναγκαίος ο προσδιορισμός της διάθεσής της ή μη, ως λίπασμα στις τοπικές καλλιέργειες.

Επίσης, έχοντας υπόψη ότι εκτός από τα βαρέα μέταλλα το αέριο προϊόν του καπνού περιέχει και άλλες καρκινογόνες ουσίες όπως οι ειδικές νιτροζαμίνες του καπνού (TSNA:Tobacco-Specific Nitrosamines) που είναι μεταβολικά παράγωγα των περιεχόμενων στα φύλλα αλκαλοειδών και νιτρικών (Brunnemann KD.et al, 1996 β), ενδιαφέρον είναι να προσδιορισθεί αν η χρήση της λάσπης επάγει ή παρεμποδίζει τους μηχανισμούς βιοσύνθεσης και συσώρευσής τους στα φύλλα δύο ποικιλιών από τις κύριες της ελληνικής καπνοβιομηχανίας.

Μέταλλα και ανόργανη λίπανση

Οι συγκεντρώσεις των διαφόρων βαρέων μετάλλων στο φυτό του καπνού εξαρτώνται από την ποικιλία και την χώρα προέλευσης του φυτού καθώς και από την αναλυτική μέθοδο του ακολουθείται κατά τον προσδιορισμό τους.

Οι περισσότερες εργασίες αναφέρονται στη μέτρηση των ανιχνεύσιμων βαρέων μετάλλων στα μίγματα καπνού που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή διαφόρων τύπων τσιγάρων (π.χ. με ή χωρίς φίλτρο).

Ανάλογα με την χώρα προέλευσης των τσιγάρων οι συγκεντρώσεις των βαρέων μετάλλων ποικίλουν, ενώ οι καλλιεργητικές πρακτικές και οι χειρισμοί των συλλεγόμενων φύλλων μπορεί να επηρεάσουν τα επίπεδά τους στα παρασκευαζόμενα τσιγάρα.

Μετρήσεις σε 15 εμπορικές μάρκες τσιγάρων που διακινούνταν στην Γερμανία κατά τέλη της δεκαετίας του 1970 έδειξαν ότι οι τιμές του Cd κυμαίνονταν από 1,07 μg/g έως 2,30 μg/g, του Zn από 33 μg/g έως 64 μg/g, του Cu από 10 μg/g έως 34 μg/g, του Pb από 2,4 μg/g έως 4,3 μg/g, και του Cr από 3,4 μg/g έως 6,7 μg/g (Muller VG., 1979).



Στην Φινλανδία, μια δεκαετία αργότερα, οι μέσες τιμές των Cd, Zn, Cu και Pb που περιέχονταν σε 44 διαφορετικές μάρκες τσιγάρων με φίλτρο ήταν αντίστοιχα: 1,4 μg/g, 45 μg/g, 15,6 μg/g και 2,4 μg/g (Mussalo- Rauhamaa H. et al, 1986).

Σε μεταγενέστερες μετρήσεις των Chiba και συνεργατών (1992), αναφέρεται ότι στα αμερικάνικα τσιγάρα οι συγκεντρώσεις Cd κυμαίνονταν από 0,5 μg/g έως 3,5 μg/g, του Zn από 16,8 μg/g έως 30,5 μg/g και του Cr από <0,1 μg/g έως 3,45 μg/g (Chiba M. et al, 1992).

Παρόλα αυτά, σε άλλη εργασία αναφέρεται ότι σε τσιγάρα που παρασκευάζονται στο Μεξικό από καπνά εσωτερικής κατανάλωσης, οι μέσες τιμές του Cd κυμαίνονται σε υψηλότερα επίπεδα (4,41 μg/g) (Saldivar L. et al, 1991).

Στην εργασία μας βρέθηκε ότι στα φυτά της ποικιλίας I που αναπτύχθηκαν σε έδαφος όπου εφαρμόστηκε ανόργανη λίπανση, οι μέσες τιμές των Cu, Zn και Cr βρισκόταν στα όρια ελαχίστου-μεγίστου των γερμανικών τσιγάρων, ενώ η μέση τιμή του Cd (3,744 μg/g) βρέθηκε λίγο υψηλότερη από την αντίστοιχη των γερμανικών και αμερικανικών μιγμάτων και μικρότερη από τη μέση τιμή συγκέντρωσης των μεξικάνικων μιγμάτων.

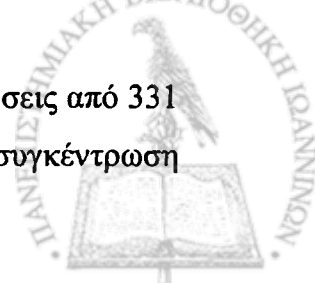
Σημαντικά υψηλότερη βρέθηκε η μέση τιμή συγκέντρωσης του Pb (6,585 μg/g) στις ομάδες φυτών της ποικιλίας I που αναπτύχθηκαν σε έδαφος όπου εφαρμόστηκε ανόργανη λίπανση.

Για την ποικιλία II, τα αποτελέσματα συγκλίνουν με τα ευρήματα της ποικιλίας I, παρόλο που οι μέσες τιμές των Cd, Cu και Pb στις ομάδες ανόργανης λίπανσης βρέθηκαν ελαφρά μειωμένες σε σχέση με τις αντίστοιχες της ποικιλίας I.

Στην ποικιλία II, παρατηρούμε επίσης ότι τα επίπεδα του Pb είναι πολύ αυξημένα (~ 6,020 μg/gr) σε σχέση με τις ανώτατες τιμές των γερμανικών και φινλανδικών μιγμάτων, καθώς και ότι η πρόσληψη του Zn (71,665 μg/gr) είναι αρκετά υψηλότερη.

Παρόλο που δεν είναι δυνατόν να καταλήξουμε σε γενικεύσεις λόγω πιθανών διαφορών στις πειραματικές συνθήκες και στις αναλυτικές μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε περίπτωση, μπορούμε να ισχυριστούμε ότι τα εδάφη που χρησιμοποιούνται για την καλλιέργεια του καπνού (προέλευσης Αγρινίου και Άρτας) έχουν μεγάλες συγκεντρώσεις Pb και Cd ή ότι οι ποικιλίες I και II συσσωρεύουν υψηλότερες τιμές Pb και Cd στα φύλλα τους σε σχέση με άλλες που καλλιεργούνται σε άλλες χώρες.

Οι Watanabe και συνεργάτες σε εργασία τους αναφέρουν ότι οι αναλύσεις από 331 μάρκες τσιγάρων προερχόμενες από 20 διαφορετικές χώρες έδειξαν ότι η συγκέντρωση



Cd κυμαίνεται σε μεγάλο εύρος, ενώ για τον Pb το εύρος διακύμανσης ήταν ακόμα μεγαλύτερο (από 0,46 έως 43,66 $\mu\text{g/gr}$). Οι ίδιοι αναφέρουν ότι οι μέσες τιμές των βαρέων μετάλλων διαφέρουν σημαντικά στις διάφορες καπνοπαραγωγικές περιοχές και ότι δεν υπάρχουν μαρτυρίες που να υποδηλώνουν ότι οι διαφορές στα επίπεδα Pb και Cd σχετίζονται με την περιοχή ή με το βαθμό βιομηχανικής της ανάπτυξης (Watanabe T. et al, 1987).

Σε περιοχές με ρύπανση Cd, οι μέσες τιμές συγκέντρωσής του είναι ακόμα υψηλότερες, οπότε συνιστάται ιδιαίτερη προσοχή στην επιλογή του εδάφους καλλιέργειας του καπνού (Yue L. ,1992).

Οι φυσικές συγκεντρώσεις των μη απαραίτητων για τα φυτά βαρέων μετάλλων όπως το Cd ή το Pb στους διάφορους τύπους εδαφών μεταβάλλονται σημαντικά από τις ανθρωπογενείς επεμβάσεις όπως η εφαρμογή φωσφορικών λιπασμάτων, η ρύπανση του αέρα και οι εναποθέσεις αποβλήτων.

Ο Taylor αναφέρει ότι οι μετρήσεις σε διάφορους τύπους εδαφών έδειξαν ότι οι μέσες τιμές του Cd τα τελευταία 50 χρόνια αυξήθηκαν εξαιτίας του καδμίου που περιέχεται στα λιπάσματα και ότι το Cd αυτό εμφανίζει μεγαλύτερη κινητικότητα από το φυσικό (Taylor MD., 1997).

Μέταλλα και υποστρώματα

Από τα αποτελέσματά μας διαπιστώνουμε ότι στην ποικιλία I όταν εφαρμόζεται λάσπη βιολογικού καθαρισμού με 10%, 20% και 40% αναλογία λάσπης τα επίπεδα Cd είναι σημαντικά χαμηλότερα ($p=0,008$, $p=0,02$ και $p=0,000$ αντίστοιχα) σε σχέση με την ομάδα εφαρμογής ανόργανης λίπανσης (εικ.3.31)

Επίσης, από τα αποτελέσματά μας διαπιστώνεται ότι στην ποικιλία II δεν παρατηρείται διαφορά στην συσσώρευση Cd μεταξύ της ομάδας με αναλογία λάσπης 10% και της ομάδας ανόργανης λίπανσης, ενώ όπως και στην ποικιλία I, στις ομάδες 20% και 40% αναλογίας λάσπης τα επίπεδα είναι στατιστικά σημαντικά χαμηλότερα ($p=0,02$ και $p=0,000$ αντίστοιχα) (εικ.3.32).

Σε εργασία του Petruzzeli και συνεργάτες αναφέρεται ότι όταν χρησιμοποιείται λάσπη χαμηλής συγκέντρωσης σε μέταλλα με αναλογία $\sim 4,5 \text{ t/ha/έτος}$ δεν παρατηρείται αύξηση στη συσσώρευση βαρέων μετάλλων στους φυτικούς ιστούς (Petruzzeli G. et al, 1991).



Παλαιότερες εργασίες αναφέρουν ότι αύξηση της εδαφικής συγκέντρωσης ορισμένων μετάλλων πάνω από ένα επίπεδο, οδηγεί σε σταθεροποίηση ή μείωση του προσλαμβανόμενου μετάλλου πιθανόν γιατί το φυτό, σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις μετάλλων, διαθέτει έναν μηχανισμό «αποκλεισμού» ή γιατί η προκαλούμενη τοξικότητα οδηγεί στην αλλοίωση του φυτού (Fergusson JE.,1990).

Άλλοι ερευνητές αναφέρουν ότι η βιοδιαθεσιμότητα των διαλυτών ανόργανων αλάτων του Cd είναι πολύ μεγαλύτερη στις ρίζες από το Cd που προέρχεται από την οργανική ουσία, η οποία δεσμεύει το μέταλλο μέσω μηχανισμών χηλοποίησης και απορρόφησης. Η ιδιότητα αυτή οφείλεται κυρίως στην κατιοανταλλακτική ικανότητα (CEC) του εδάφους (Bruwaene RV.et al,1984 , Jing J.et al,1992).

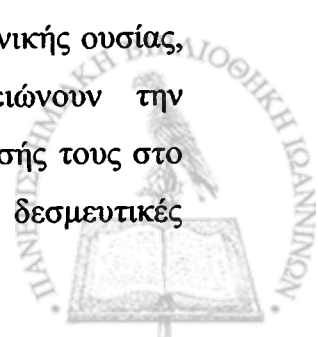
Σε πρόσφατη εργασία μελετήθηκε η σχέση μεταξύ του προσλήψιμου Cd, της αργίλλου, του χούμου, του οργανικού C και του pH σε εδάφη με μακροχρόνια εφαρμογή λάσπης βιολογικού καθαρισμού, όπου είχαν καλλιεργηθεί διαδοχικά τεύτλα και καπνός.

Οι συγκεντρώσεις του Cd στα φύλλα του καπνού μετρήθηκαν αμέσως μετά την άνθιση και βρέθηκε ότι υπάρχει μικρή γραμμική συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης του Cd στο φυτό και του εξαγώγιμου εδαφικού μετάλλου (Miner GS. et al, 1997).

Στην εργασία μας, η παρατηρούμενη αυξημένη συσσώρευση Cd στα φυτά που καλλιεργήθηκαν με ανόργανη λίπανση σε σχέση με τα φυτά που εφαρμόστηκε λάσπη βιολογικού καθαρισμού, υποδεικνύει ότι σε ορισμένες μορφές λιπασμάτων (υπερφωσφορικών) περιέχονται αυξημένα επίπεδα Cd που, ως ρυπαντής μπορεί να μεταφερθεί στα φυτικά τμήματα που χρησιμοποιούνται από τον καπνιστή (Clarke BB. et al, 1983).

Η συσσώρευση Pb δεν φαίνεται να επηρεάζεται σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο από το είδος της λίπανσης (λάσπη βιολογικού καθαρισμού ή ανόργανη λίπανση) και από την αναλογία λάσπης που εφαρμόζεται στο έδαφος. Η διαπίστωση αυτή αφορά τόσο την ποικιλία I όσο και την ποικιλία II.

Η διαθεσιμότητα του εδάφους σε βαρέα μέταλλα ελέγχεται από πολλές εδαφικές παραμέτρους εκτός του pH, όπως η περιεχόμενη άργιλλος, η συγκέντρωση οξειδίων Fe/Mn και οργανικής ουσίας, η κατιοανταλλακτική ικανότητα (CEC), η θερμοκρασία, η υδατική κατάσταση του εδάφους, η συγκέντρωση άλλων βαρέων μετάλλων και ο προστιθέμενος φωσφόρος. Η αύξηση της περιεχόμενης αργίλλου, της οργανικής ουσίας, των οξειδίων Fe/Mn και της κατιοανταλλακτικής ικανότητας μειώνουν την διαθεσιμότητα των βαρέων μετάλλων λόγω των αυξημένων θέσεων σύνδεσής τους στο έδαφος, ενώ η παρουσία άλλων μετάλλων που ανταγωνίζονται τις ίδιες δεσμευτικές



θέσεις προκαλεί ελευθέρωση των βαρέων μετάλλων και αύξηση της πρόσληψής τους από το φυτό (Fergusson JE., 1990, Adamu-Agho C., 1987, Παπαδόπουλος ΓΔ και συν., 1986).

Για το Pb αναφέρεται ότι, αντίθετα από άλλα βαρέα μέταλλα, η πρόσληψή του μειώνεται σε συνθήκες με αυξημένα οξειδωτικά χαρακτηριστικά (π.χ. ξηρασίας), πιθανόν λόγω μειωμένης διαλυτότητας των σχηματιζόμενων αλάτων του (π.χ. $PbSO_4$).

Επίσης όταν μετρήθηκε ο διαχωρισμός και η απόσπαση διαφόρων μετάλλων από δείγματα εδάφους /λάσπης προκειμένου να προβλεφθεί η αποσπασιμότητα των μετάλλων από τις θέσεις δέσμευσης του εδάφους και άρα η κινητικότητά τους, βρέθηκε ότι η αποσπασιμότητα του Pb είναι μικρότερη από άλλων βαρέων μετάλλων, π.χ. Cd ή Ni (Legret M. et al, 1987).

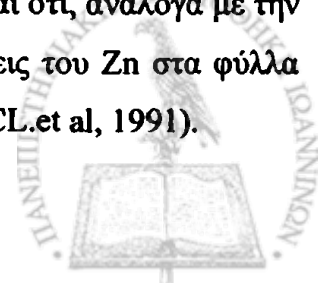
Τα αποτελέσματά μας είναι σε συμφωνία με παλαιότερες εργασίες ανάλογων πειραματικών συνθηκών σε άλλα φυτικά είδη (Dowdy RH. et al, 1991) και στον καπνό (Mulchi CL. et al, 1991). Εξάλλου, ο Gigliotti και συνεργάτες αναφέρουν ότι η εφαρμογή λάσπης βιολογικού καθαρισμού δεν προκαλεί μεταβολές στα επίπεδα Pb των εδαφών (Gigliotti G. et al, 1993).

Από τα αποτελέσματά μας διαπιστώνουμε ότι στην ποικιλία I, τα επίπεδα του Zn ενώ δεν διαφέρουν στις ομάδες με μικρή αναλογία λάσπης (10%, 20%) από τα αντίστοιχα της ομάδας ανόργανης λίπανσης, αυξάνονται σημαντικά ($p=0,000$) όταν η αναλογία λάσπης μεγιστοποιείται (40%).

Αντίστοιχα, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι στην ποικιλία II οι συγκεντρώσεις του Zn είναι σημαντικά μεγαλύτερες ($p=0,04$) από της ομάδας ανόργανης λίπανσης, μόνο όταν η αναλογία λάσπης είναι 40%, ενώ στις ομάδες με χαμηλότερη αναλογία λάσπης είτε είναι σημαντικά ($p=0,002$) μικρότερες (ομάδα 10%), είτε δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά (ομάδα 20%).

Ο Zn στα φυτά λειτουργεί ως συστατικό των ψευδαργυρο-ενζύμων και ως ενεργοποιητής των ενζύμων που σχετίζονται με το μεταβολισμό των υδατανθράκων, των πρωτεϊνών, των αυξινών και του RNA και μετακινείται στους αυξανόμενους ιστούς του καπνού, συμμετέχοντας στην αύξηση του φυτού και στον μεταβολισμό των ολικών αλκαλοειδών (Akehurst BC., 1981).

Οι Mulchi και συνεργάτες αναφέρουν ότι η μακροχρόνια χρήση λάσπης προκαλεί αύξηση της ολικής και προσλήψιμης εδαφικής συγκέντρωσης Zn και ότι, ανάλογα με την πηγή της λάσπης και το τελικό pH κάθε εδάφους, οι συγκεντρώσεις του Zn στα φύλλα του καπνού βρίσκονται αυξημένες, μειωμένες ή σταθερές (Mulchi CL. et al, 1991).



Σε άλλα φυτά αναφέρεται ότι η μακροχρόνια χρήση λάσπης προκαλεί αρχικά αύξηση στην συγκέντρωση Zn που συσσωρεύουν οι φυτικοί ιστοί (Dowdy RH. et al, 1991).

Ανάλογα αποτελέσματα έχουν διατυπωθεί και για τον καπνό από τον Gigliotti και συνεργάτες που ισχυρίζονται ότι η εφαρμογή λάσπης βιολογικού καθαρισμού προκαλεί σημαντική αύξηση τόσο στον εδαφικό Zn όσο και στον Zn των φυτών καπνού που καλλιεργούνται στα εδάφη αυτά σε σχέση με των φυτών που καλλιεργούνται στα υπόλοιπα εδάφη (Gigliotti G. et al, 1993).

Παρόλαυτα οι Miner και συνεργάτες αναφέρουν ότι όταν γίνεται μακροχρόνια χρήση λάσπης βιολογικού καθαρισμού σε περιοχές όπου καλλιεργούνται τεύτλα και καπνός διαδοχικά, δεν παρατηρείται ικανοποιητική γραμμική συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης του Zn και του εξαγωγίμου εδαφικού μετάλλου (Miner GS. et al, 1997).

Στην εξήγηση των αποτελεσμάτων μας υπόψη θα πρέπει να ληφθεί η μεταβολή του εδαφικού pH και των συγκεντρώσεων των άλλων βαρέων μετάλλων (π.χ. Cd) στις διαφορετικές αναλογίες εφαρμογών λάσπης βιολογικού καθαρισμού.

Έτσι η συγκέντρωση Zn στον καπνό αναφέρεται ότι μειώνεται με αύξηση του εδαφικού pH από 5,8 σε 6, ενώ σε μεγαλύτερες τιμές pH δεν μεταβάλλεται (King LD. et al, 1990).

Η συμπαρουσία μετάλλων στα φυτά λαμβάνει είτε ανταγωνιστικό χαρακτήρα δηλ. η συνδυασμένη δράση δύο στοιχείων είναι μικρότερη από το άθροισμα των ατομικών τους δράσεων, είτε συνεργιστικό χαρακτήρα, όπου η συνδυασμένη δράση τους είναι μεγαλύτερη από το άθροισμα των ατομικών δράσεων των δύο στοιχείων. Συνήθως η αλληλεπίδραση είναι ανταγωνιστικού χαρακτήρα (Fergusson JE., 1990).

Ο Maclean αναφέρει ότι η προσθήκη Cd στο έδαφος αύξησε την συγκέντρωση Zn στα διάφορα είδη φυτών, ενώ αντίθετα η προσθήκη ασβέστου ή φωσφόρου μείωσε την συγκέντρωση του Zn στα φυτά (MacLean AJ., 1976).

Αναφέρεται επίσης ότι η άφθονη παρουσία Zn στο έδαφος είναι δυνατόν να μειώσει την πρόσληψη του Cd, εντούτοις η δράση αυτή του Zn εξαρτάται από την συγκέντρωση του Cd στο έδαφος. Χαμηλά επίπεδα Cd εδάφους είχαν σαν αποτέλεσμα υψηλές συγκεντρώσεις Zn στα φύλλα που προκαλούσαν μείωση του Cd, ενώ σε υψηλότερα επίπεδα Cd ο προστιθέμενος Zn ή δεν είχε αποτέλεσμα ή αύξανε την συγκέντρωση του Cd (Bruwaene RV. et al, 1984).



Ο Wen, 1983, αποδίδει τη μειωμένη αύξηση και ποιότητα των φύλλων του καπνού σε ανταγωνιστικά φαινόμενα μεταξύ Cu, Zn και Cd τα οποία εμφανώς ανέστειλαν την απορρόφηση των μετάλλων από το φυτό (Wen TC., 1983).

Για τις συγκεντρώσεις Cu στα φυτά της ποικιλίας I, διαπιστώνεται ότι είναι σημαντικά χαμηλότερες από της ομάδας ανόργανης λίπανσης όταν γίνεται εφαρμογή λάσπης σε αναλογία 10% και 20% ($p=0,02$ και $p=0,01$), και δεν διαφέρουν όταν το ποσοστό λάσπης γίνεται 40%.

Όσον αφορά την συσσώρευση Cu στα φυτά της ποικιλίας II παρατηρείται επίσης ότι όταν γίνεται εφαρμογή λάσπης σε μικρά ή μεγάλα ποσοστά (ομάδες 10%, 20% και 40%) μειώνονται στατιστικά σημαντικά σε σχέση με την αντίστοιχη των φυτών που αναπτύχθηκαν σε έδαφος όπου εφαρμόστηκε ανόργανη λίπανση.

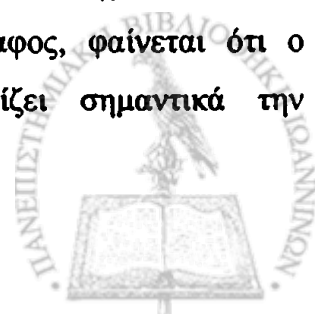
Το γεγονός αυτό είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικό για την χρήση της λάσπης ως υποστρώματος δεδομένου ότι η συγκέντρωση Cu στην συγκεκριμένη λάσπη είναι ελαφρά άνω των επιτρεπτών ορίων και είναι επιθυμητή η περιορισμένη πρόσληψή του, δεδομένης της συμμετοχής του Cu στον σχηματισμό ελευθέρων ριζών ΌΗ κατά την διάρκεια του καπνίσματος.

Τα αποτελέσματά μας δεν βρίσκονται σε συμφωνία με αυτά των Mulchi και συνεργατών που αναφέρουν ότι η αύξηση στην αναλογία λάσπης προκαλεί σημαντική αύξηση στην συγκέντρωση Cu στα φύλλα του καλλιεργούμενου καπνού (Mulchi CL. et al, 1991) όπως και με αυτά των Gigliotti και συνεργατών που ισχυρίζονται ότι η εφαρμογή λάσπης αυξάνει τα επίπεδα Cu στα φύλλα του καπνού που καλλιεργούνται στα εδάφη με εφαρμογή λάσπης σε σχέση με τα υπόλοιπα εδάφη (Gigliotti G. et al, 1993).

Η διαφορά αυτή πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι κατά την ανάλυση των αποτελεσμάτων θα πρέπει να ληφθεί υπόψη το εδαφικό pH κάθε επέμβασης.

Αν μελετήσουμε τα διαγράμματα στις εικόνες 3.27, και 3.29 θα διαπιστώσουμε ότι στην ποικιλία I όταν η εφαρμογή της λάσπης γίνεται σε έδαφος όξινο, η συγκέντρωση του Cu τουλάχιστον για τις ομάδες 20% και 40%, είναι πράγματι αυξημένη αλλά σε μη σημαντικό επίπεδο σε σχέση με την ομάδα της ανόργανης λίπανσης, ενώ στην ποικιλία II όταν η εφαρμογή της λάσπης γίνεται σε έδαφος όξινο, η συγκέντρωση του Cu για όλες τις ομάδες δεν διαφέρει σημαντικά από της ομάδας της ανόργανης λίπανσης.

Όταν η εφαρμογή της λάσπης γίνεται σε αλκαλικό έδαφος, φαίνεται ότι ο συνδυασμός υψηλού pH και οργανικής ουσίας παρεμποδίζει σημαντικά την



διαθεσιμότητα και άρα την πρόσληψη του Cu από τα φυτά και των δύο ποικιλιών (εικ. 3.28 και 3.31).

Συμπτώματα έλλειψης Cu δεν έχουν παρατηρηθεί σε καλλιέργειες καπνού. Ο Cu είναι ενεργοποιητής των ενζύμων της φωτοσυνθετικής αντίδρασης (πλαστοκυανίνη), της εξουδετέρωσης των ελευθέρων ριζών του O₂ (υπεροξειδικής δισμουτάση), της αίμης (κυτοχρωμική οξειδάση) και άλλων σημαντικών ενζύμων (φαινολάση) (Καράταγλης Σ. 1992).

Στον καπνό φαίνεται ότι σχετίζεται με τα ενζυμικά συστήματα που εμπλέκονται στην βιοσύνθεση των ολικών αλκαλοειδών. Έτσι, ο Wen και συνεργάτες παρατήρησαν ότι η αύξηση της συγκέντρωσης Cu στο έδαφος προκαλεί αύξηση ολικών αλκαλοειδών στα φύλλα (Wen TC. et al, 1983). Οι ίδιοι αναφέρουν ότι διαπίστωσαν μια σαφή ανταγωνιστική δράση μεταξύ του Cu, του Zn και του Cd που μειώνει την συνδυαστική τους δράση σε σχέση με το άθροισμα των χωριστών δράσεών τους.

Στην ποικιλία I, η συσσώρευση του Cr όταν η αναλογία της λάσπης είναι 10%, φαίνεται ότι αυξάνεται σημαντικά σε σχέση με της ανόργανης λίπανσης ($p=0,000$), αλλά η διαφορά εξαλείφεται στις μεγαλύτερες αναλογίες λάσπης (εικ.3.31).

Στην ποικιλία II, οι συγκεντρώσεις του Cr στις ομάδες με 10%, 20% και 40% αναλογία λάσπης είναι μη σημαντικά μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες των ομάδων εφαρμογής ανόργανης λίπανσης (εικ.3.32).

Από τις εργασίες που μελετούν τη σχέση λάσπης βιολογικού καθαρισμού και συσσώρευσης μετάλλων στον καπνό, λίγες αναφέρονται στις συγκεντρώσεις του Cr.

Η εργασία των Gigliotti και συνεργατών παρατηρεί ότι η εφαρμογή λάσπης αυξάνει τις συγκεντρώσεις του Cr στα φύλλα και είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματά μας (Gigliotti G. et al, 1993).

Η αυξημένη συσσώρευση Cr κατά την εφαρμογή της λάσπης σε μικρή (ποικιλία I) ή μεγάλη (ποικιλία II) αναλογία, θα πρέπει να αποτελέσει σημείο διερεύνησης, αφ' ενός λόγω των αρκετά υψηλών μέσων τιμών Cr που διαπιστώνονται σε σχέση με τα εμπορικά τσιγάρα και αφ' ετέρου λόγω της διαπιστωμένης συμμετοχής του σε μηχανισμούς καρκινογένεσης μέσω παραγωγής δραστικών ριζών οξυγόνου, κυρίως στον πνεύμονα.

Οι δύο ποικιλίες φαίνεται ότι, σε συνδυασμό με τις εδαφικές ιδιότητες, έχουν την ικανότητα να αναχαιτίζουν την είσοδο του Cr σε μεγάλες συγκεντρώσεις οργανικής ουσίας.



Μέταλλα και pH

Προκειμένου να μελετηθεί η συμπεριφορά των δύο ποικιλιών ως προς την συσσώρευση των βαρέων μετάλλων κατά την καλλιέργειά τους σε εδάφη με διαφορετικά pH, έγινε στατιστική σύγκριση των μέσων τιμών όλων των ομάδων ανάπτυξης.

Οι King και συνεργάτες αναφέρουν ότι όταν εφαρμόζεται λάσπη βιολογικού καθαρισμού σε διαφορετικές αναλογίες και σε εδάφη διαφορετικής οξύτητας (από 5,5 έως 6,5), η μεταβολή του εδαφικού pH, σε κάθε έδαφος και σε κάθε εφαρμογή λάσπης, δεν υπερβαίνει τις 0,7 μονάδες (King LD.et al,1990).

Έτσι, διαπιστώθηκε ότι στην ποικιλία I στο αλκαλικό υπόστρωμα ($pH=7,4$) σε σύγκριση με το όξινο ($pH=5,5$), οι συγκεντρώσεις του Cd, του Cu και του Zn μειώνονται σημαντικά ($p=0,000$, $p=0,003$ και $p=0,002$), ενώ η συγκέντρωση του Pb αυξάνεται σημαντικά ($p=0,014$) και τα επίπεδα του Cr δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ των δύο εδαφών (εικ.3.33 και 3.27,3.28).

Στην ποικιλία II διαπιστώθηκε ότι οι συγκεντρώσεις του Cd και του Zn μειώνονται σημαντικά ($p=0,000$ και $p=0,01$ αντίστοιχα) και η συγκέντρωση του Pb αυξάνεται σημαντικά ($p=0,000$) σε έδαφος με $pH=7,4$, ενώ οι μέσες τιμές των Cr και Cu δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ των δύο εδαφών (εικ.3.34 και 3.29,3.30).

Είναι γνωστό ότι το εδαφικό pH επηρεάζει την διαθεσιμότητα των εδαφών σε βαρέα μέταλλα (Mulchi CL.et al,1992, Adamu-Agho C.,1987).

Οι Mulchi και συνεργάτες αναφέρουν ότι η εδαφική οξύτητα είναι η σημαντικότερη και η ευκολότερα διαχειρίσιμη παράμετρος που μπορεί να προσδιορίσει την διαλυτότητα των μετάλλων στα εδάφη και ότι, με εξαίρεση τον Pb και τον Cu, η διαλυτότητα και διαθεσιμότητα των περισσότερων βαρέων μετάλλων είναι αντιστρόφως ανάλογη του εδαφικού pH. Οι ίδιοι αναφέρουν ότι η απορρόφηση (absorption), η χηλοποίηση (chelation) και η διαλυτοποίηση (dissolution) των κατακρημισμένων ορυκτών μορφών των στοιχείων εξαρτώνται από το pH και ότι τα κατιόντα δεσμεύονται ασθενέστερα σε χαμηλό pH, οπότε η εδαφική ικανότητα προσρόφησης μετάλλων μπορεί να αυξηθεί πολλαπλά με κάθε αύξηση μονάδας του pH μέσα σε εύρος από 4,0 έως 7,5 (Mulchi CL.et al, 1991).

Οι μικρές γραμμικές συσχετίσεις μεταξύ της συγκέντρωσης των βαρέων μετάλλων στους φυτικούς ιστούς και των αποσπάσιμων εδαφικών μετάλλων (soil-extractable metal), προσανατόλισαν τους ερευνητές τα τελευταία χρόνια στην δημιουργία μοντέλων πολυπαραγοντικής συσχέτισης όπου συμπεριλαμβάνονται πολλές εδαφικές παράμετροι,

εκ των οποίων το εδαφικό pH είναι το κυριότερο, για την πρόβλεψη της συσσώρευσης βαρέων μετάλλων στα καλλιεργούμενα φυτικά είδη (Miner GS. et al,1997).

Προκειμένου να διαπιστωθεί η ενσωμάτωση των βαρέων μετάλλων στην τροφική αλυσίδα, υπόψη πρέπει να ληφθεί η κινητικότητα και η βιοδιαθεσιμότητά τους, δεδομένου ότι η πρόσληψη των μετάλλων από τα φυτά είναι ανάλογη με την συγκέντρωση των βιοδιαθέσιμων κλασμάτων τους στο έδαφος και όχι με την συνολική συγκέντρωσή τους σε αυτό. Διάφορες τεχνολογίες έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια για την αποκατάσταση των ρυπαινόμενων εδαφών, οικολογικές και βιοτεχνολογικές. Οι περισσότερες στηρίζονται στην ελαχιστοποίηση της κινητικότητας των μετάλλων στα εδάφη με την χρήση δολομιτικών ασβεστολίθων (dolomitic lime), φωσφορικών ή καταλοίπων οργανικής ουσίας, φυσικών ή συνθετικών προσθέτων (Mench MJ. et al, 1994, Jing J. et al,1992).

Η επιλογή εδάφους με κατάλληλο pH είναι ιδιαίτερα σημαντική κατά την εφαρμογή λάσπης βιολογικού καθαρισμού που αν και στην περίπτωση των Ιωαννίνων έχει ουδέτερο pH, είναι πιθανόν να μεταβάλλει την εδαφική οξύτητα αρκετά χρόνια μετά την πρώτη εφαρμογή της.

Ανάλογα με το είδος, το pH του εδάφους και την προέλευσή του, το pH και το ποσοστό της εφαρμοζόμενης λάσπης, είναι δυνατόν να μεταβληθεί το pH του καλλιεργούμενου εδάφους, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα τη μεταβολή συσσώρευσης βαρέων μετάλλων στον καλλιεργούμενο καπνό.

Οι γενικές συστάσεις που υπάρχουν αφορούν την διατήρηση του $\text{pH} \geq 6,5$ για τρία χρόνια μετά την εφαρμογή της λάσπης βιολογικού καθαρισμού στην καλλιέργεια καπνού, ώστε να αποφευχθεί η ανεπιθύμητη πρόσληψη βαρέων μετάλλων κατά την περίοδο της μέγιστης απελευθέρωσης ιόντων υδρογόνου, σχετιζόμενης με την διάσπαση της οργανικής ουσίας και το μεταβολισμό του αζώτου. Παρόλα αυτά έχει παρατηρηθεί οξύνιση του εδάφους και σημαντική νιτροποίηση έως και μία δεκαετία μετά την πρώτη εφαρμογή της λάσπης (Adamu CA.et al,1989, Mulchi CL.et al,1992).

Τα αποτελέσματά μας βρίσκονται σε συμφωνία με των Mulchi και συνεργατών που αναφέρουν ότι ανάλογα με το τελικό εδαφικό pH, οι συγκεντρώσεις των βαρέων μετάλλων σε διάφορα φυτικά είδη αυξάνονται, μειώνονται ή παραμένουν σταθερά. Οι ίδιοι αναφέρουν ότι με την αύξηση του εδαφικού pH (αλκαλοποίηση) μειώνονται οι συγκεντρώσεις των Cd και Zn στα φυτά που μελέτησαν και ότι η διατήρηση του $\text{pH} \geq 6,5$



δεν προκαλεί σημαντικές αλλαγές στα περιεχόμενα Cd, Ni και Pb (Mulchi CL. et al,1991).

Παρόμοιες παρατηρήσεις έγιναν και από τους King και συνεργάτες οι οποίοι παρατήρησαν μείωση της συγκέντρωσης των Cd και Zn κατά την αύξηση του pH έως 6,0. Οι ίδιοι αναφέρουν ότι δεν διαπίστωσαν περαιτέρω μείωση σε μεγαλύτερο pH και ότι η εφαρμογή λάσπης προκάλεσε σημαντική μεταβολή (από 4,7 έως 5,5) μόνο σε εδάφη με χαμηλό αρχικό εδαφικό pH ($\text{pH}=5,5$). Κατά την εφαρμογή λάσπης σε εδάφη με υψηλότερο pH (5,9 και 6,5) δεν παρατήρησαν σημαντικές μεταβολές οξύτητας έως την περίοδο συλλογής των φύλλων.

Όσον αφορά τα υπόλοιπα βαρέα μέταλλα, οι King και συνεργάτες αναφέρουν ότι το Cr και μερικώς ο Pb δεν επηρεάζεται σημαντικά από το pH και ότι ο Cu μειώνεται με την αύξηση του pH (King LD. et al, 1990).

Τα αποτελέσματά μας όσον αφορά την ποικιλία I βρίσκονται σε συμφωνία με τα παραπάνω για το Cd, Zn, Cu και Cr, ενώ όσον αφορά την ποικιλία II βρίσκονται σε συμφωνία για τα Cd, Zn και Cr.

Για τα υπόλοιπα μέταλλα θα μπορούσαμε να ισχυριστούμε ότι είναι πιθανόν ότι ο Pb στις ποικιλίες I και II και ο Cu στην ποικιλία II έχουν μικρή διαλυτότητα σε συνθήκες όξινου pH όπως έχει αναφερθεί και από άλλους ερευνητές (Mulchi CL. et al,1991).

Μέταλλα και γονότυπος

Οι γενετικοί παράγοντες είναι διαπιστωμένο ότι επηρεάζουν την πρόσληψη των βαρέων μετάλλων.

Από τα αποτελέσματά μας παρατηρείται ότι οι δύο ποικιλίες παρουσιάζουν διαφορά στις συγκεντρώσεις των Cd και Cu. Έτσι, η ποικιλία I συσσωρεύει σημαντικά μεγαλύτερα επίπεδα Cd και Cu σε σχέση με την ποικιλία II (εικ.3.35). Η διαπίστωση αυτή ισχύει και όταν λαμβάνεται υπόψη το αρχικό εδαφικό pH, οπότε τα Cu και Cd είναι σημαντικά μεγαλύτερα στην ποικιλία I σε σχέση με την ποικιλία II, τόσο σε συνθήκες όξινου pH ($p=0,0002$ και $p=0,0003$ αντίστοιχα), όσο και σε συνθήκες αλκαλικού pH ($p=0,003$ και $p=0,02$ αντίστοιχα).

Η επίδραση του γονότυπου του καπνού στην συγκέντρωση και μετακίνηση του Cd έχει διαπιστωθεί από πολλούς ερευνητές, ορισμένοι από τους οποίους κατέβαλαν προσπάθειες ώστε να εντοπίσουν τις ποικιλίες που ελαχιστοποιούν την συσσώρευση Cd στα χρησιμοποιούμενα φύλλα.



Οι Clarke και συνεργάτες ισχυρίζονται ότι οι 16 ποικιλίες καπνού που ανέπτυξαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις Cd παρουσίασαν σημαντικές διαφορές στα επίπεδα του προσλαμβανόμενου μετάλλου, που όμως δεν ήταν σταθερές σε όλες τις περιπτώσεις εφαρμογής Cd, οπότε παρατηρούν ότι τα αποτελέσματα δεν θα μπορούσαν να έχουν κατευθείαν εφαρμογή σε συνθήκες πεδίου (αγρού) και οι ποικιλίες θα έπρεπε να αξιολογηθούν ξανά σε συγκεκριμένες περιοχές (Clarke BB. et al, 1989).

Όταν η καλλιέργεια του καπνού γίνεται σε εδάφη με ρύπανση Cd προερχόμενη από υπερφωσφορικά λιπάσματα, λάσπη βιολογικού καθαρισμού ή βροχοπτώσεις, είναι πιθανόν να μη γίνει δέσμευση όλου του μετάλλου στην ρίζα του φυτού με αποτέλεσμα τη μεταφορά του στον βλαστό και στα φύλλα, που δεν φέρουν πάντα ορατά συμπτώματα φυτοτοξικότητας.

Στην περίπτωση αυτή είναι φανερό ότι πρέπει να γίνεται προσεκτική επιλογή ποικιλιών καπνού οι οποίες να ελαχιστοποιούν την συσσώρευση Cd στα φυτικά τμήματα (φύλλα) που περιέχονται στα παρασκευαζόμενα τσιγάρα.

Οι ρίζες του καπνού παρουσιάζουν μεγάλη ανθεκτικότητα στο Cd σε σχέση με άλλα είδη, οπότε χρησιμοποιούνται σε βιολογικές δοκιμές για τον έλεγχο της βιοδιαθεσιμότητας του Cd προερχόμενου από υλικά που περιέχουν ρύπανση μετάλλων, όπως τα αιωρήματα λάσπης.

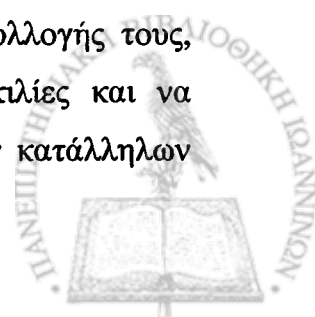
Ορισμένα πειράματα αφορούν την δημιουργία γενετικά τροποποιημένων ριζών για την εκτίμηση της διαθεσιμότητας του Cd, παρόλο που στην περίπτωση του καπνού δεν διαπιστώθηκε διαφορά στην πρόσληψη Cd σχετιζόμενη με την γενετική τροποποίηση (Metzger L. et al, 1992).

Όσον αφορά τον Cu, θα μπορούσαμε να πούμε ότι ακολουθώντας παρόμοια κινητική με το Cd όπως έχει αναφερθεί για πολλά είδη (Fergusson JE., 1990), προσλαμβάνεται σε σημαντικά μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στην ποικιλία I.

Μέταλλα και χρόνοι συλλογής

Η συγκέντρωση των βαρέων μετάλλων αναφέρεται ότι σχετίζεται με την ηλικία των φύλλων του καπνού.

Στην παρούσα μελέτη η συλλογή των φύλλων έγινε σε 4 «επίπεδα» βαθμού ωρίμανσης των φύλλων που αντιστοιχούσαν στους τέσσερις χρόνους συλλογής τους, προκειμένου να διαπιστωθεί η κινητική των μετάλλων στις δύο ποικιλίες και να διατυπωθεί ένα ασφαλές συμπέρασμα σχετικά με την επιλογή των πλέον κατάλληλων



συλλογών, κατά την καλλιέργεια σε υποστρώματα επιβαρημένα σε βαρέα μέταλλα, όπως η λάσπη του βιολογικού καθαρισμού.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι και στις δύο ποικιλίες υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις συγκεντρώσεις όλων των μετάλλων μεταξύ των διαφόρων χρόνων συλλογής των φύλλων.

Στην ποικιλία I, διαπιστώνεται ότι όλα τα μέταλλα έχουν την τάση να **μειώνονται από τα γηραιότερα προς στα νεώτερα φύλλα** (εικ.3.25). Το συμπέρασμα αυτό μπορεί να διατυπωθεί και όταν λαμβάνεται υπόψη το εδαφικό pH, όπου τόσο σε συνθήκες όξινου όσο και σε συνθήκες αλκαλικού pH το Cd, ο Pb και το Cr μειώνεται σημαντικά από τα γηραιότερα στα νεώτερα φύλλα, ενώ ο Cu μειώνεται σημαντικά σε αλκαλικό pH και ο Zn μειώνεται σημαντικά κυρίως σε όξινο pH (εικ.3.21,3.22).

Θα μπορούσαμε λοιπόν να συμπεράνουμε ότι εκτός του Cu και μερικώς του Zn το pH του εδάφους δεν επηρεάζει εντός του φυτού την κινητική των μετάλλων στην ποικιλία I.

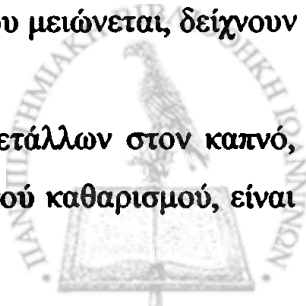
Στις περισσότερες ομάδες υποστρώματος που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη του καπνού διαπιστώνεται μια ανάλογη συμπεριφορά για όλα σχεδόν τα μέταλλα (εικ.3.1 έως 3.10). Με εξαίρεση τον Cu που είτε δείχνει αυξητική τάση από τα γηραιότερα στα νεώτερα φύλλα σε ορισμένες ομάδες υποστρώματος (εικ.3.2 : pH1 - 10% και εικ.3.2 : pH1 - 20%), είτε παρουσιάζει αυξομειώσεις σε άλλες ομάδες υποστρώματος και του Zn που ενώ δείχνει να μειώνεται, σε ορισμένες ομάδες (εικ.3.7,3.9) εμφανίζει τη μικρότερη μέση τιμή στον τρίτο χρόνο συλλογής, η κινητική των υπόλοιπων μετάλλων φαίνεται να μην επηρεάζεται από το είδος του χρησιμοποιούμενου υποστρώματος στην ποικιλία I.

Στην ποικιλία II διαπιστώνεται ότι υπάρχει μια εντελώς αντίθετη συμπεριφορά στην κινητική των περισσότερων βαρέων μετάλλων.

Έτσι, το Cd, ο Pb, το Cr και ο Zn φαίνεται ότι **αυξάνονται σημαντικά από τα γηραιότερα στα νεώτερα φύλλα**, ενώ ο Cu φαίνεται ότι μειώνεται, και οι διαπιστώσεις αυτές ισχύουν και όταν λαμβάνεται υπόψη το εδαφικό pH (εικ.3.23,3.24), και όταν δεν συνυπολογίζεται ως παράμετρος (εικ.3.26).

Στην περίπτωση που εξετάσουμε την κινητική των μετάλλων στην ποικιλία II στις διάφορες ομάδες υποστρωμάτων (εικ.3.11 έως 3.20), παρατηρούμε ότι με εξαίρεση το Cr σε συνθήκες αλκαλικού pH, όλα τα βαρέα μέταλλα εκτός του Cu που μειώνεται, δείχνουν αυξητική τάση από τα γηραιότερα στα νεώτερα φύλλα.

Οι εργασίες που αναφέρονται στην κινητική των βαρέων μετάλλων στον καπνό, κατά την καλλιέργειά του σε εδάφη με εφαρμογή λάσπης βιολογικού καθαρισμού, είναι



αρκετά περιορισμένες και στις περισσότερες περιπτώσεις δεν συμπεριλαμβάνονται τα ονόματα των χρησιμοποιούμενων ποικιλιών στις πειραματικές συνθήκες.

Σε βιβλιογραφία των King και συνεργατών αναφέρεται ότι κατά την καλλιέργεια καπνού σε εδάφη όπου είχε εφαρμοστεί λάσπη βιολογικού καθαρισμού, οι συγκεντρώσεις του Cd και του Zn μειώθηκαν, ενώ η συγκέντρωση του Cu αυξήθηκε από τα χαμηλότερα (γηραιότερα) στα υψηλότερα φύλλα (νεώτερα).

Οι ίδιοι ισχυρίζονται ότι οι συγκεντρώσεις του Pb ήταν ελαφρά υψηλότερες στα γηραιότερα φύλλα και ότι τα νεώτερα φύλλα δεν είχαν ανιχνεύσιμα επίπεδα Cr. Για την εξήγηση των αποτελεσμάτων τους αναφέρουν ότι η παρατηρούμενη μείωση Cd και Zn με την αύξηση του ύψους των φύλλων στο στέλεχος, οφείλεται στην περιορισμένη κινητικότητα τους και ότι η συγκέντρωσή τους σχετίζεται με την ηλικία των φύλλων. Αντιθέτως για τον Cu ισχυρίζονται ότι πρέπει να είναι πιο κινητικός στο φυτό του καπνού οπότε είναι καλύτερα κατανεμημένος στα διάφορα επίπεδα συλλογής (King LD. et al,1990).

Για το Cd αναφέρεται ότι στον καπνό, αντίθετα από άλλα φυτικά είδη, οι συγκεντρώσεις στα φύλλα είναι πολύ υψηλότερες σε σχέση με τις ρίζες, πιθανόν λόγω χαμηλής αποτελεσματικότητας των διαλυτών πεπτιδίων των ριζών (φυτοχηλοποιητικές πρωτεΐνες), που συνήθως δεσμεύουν το μέταλλο και εμποδίζουν τη μεταφορά του στα υπέργεια τμήματα του φυτού. Ο Cu επίσης επάγει την σύνθεση ενός μεταλλοδεσμευτικού πεπτιδίου μη ταυτόσημου με το Cd δεσμευτικό - πεπτίδιο, ενώ δεν υπάρχουν μαρτυρίες για την επαγωγή *in vivo* ή δέσμευση *in vitro* Zn σε αυτό το Cd -δεσμευτικό πεπτίδιο. Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι τα φυτά έχουν μια εξειδίκευση στην επαγωγή μεταλλοδεσμευτικών πεπτιδίων που καθορίζει την ανθεκτικότητά τους στα βαρέα μέταλλα (Reese RN.et al, 1987, Mett VL. et al,1993).

Η διαπίστωση αυτή εξηγεί γιατί ορισμένοι ερευνητές, αντίθετα από τους προαναφερθέντες, υποστηρίζουν ότι σε συνθήκες τοξικότητας βαρέων μετάλλων όπως το Cd, ο Cu και ο Zn, τα βαρέα μέταλλα συσσωρεύονται στις ρίζες ποικιλιών καπνού, σε συγκεντρώσεις 2-7 φορές υψηλότερες από ότι στα φύλλα (Wen TC., 1983).

Τα αποτελέσματά μας για την ποικιλία I συμφωνούν με τα δεδομένα των King και συνεργατών ως προς την κινητική του Cd, του Zn, και του Cr, ενώ η παρατηρούμενη μείωση του Cu και η αύξηση του Pb δεν βρίσκεται σε συμφωνία με τις διαπιστώσεις των παραπάνω ερευνητών.

Για την ποικιλία II η κινητική των μετάλλων που δεν συμφωνεί με τα βιβλιογραφικά δεδομένα είναι δυνατόν να αποδοθεί στα ιδιαίτερα γενετικά



χαρακτηριστικά της ποικιλίας που σχετίζονται με τη μεταφορά των μετάλλων εντός του φυτού.

Αζωτούχες ενώσεις και ανόργανη λίπανση

Η μέση τιμή περιεκτικότητας νικοτίνης (%) των ομάδων της ποικιλίας I (Τσεμπέλια Αγρινίου) που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα ανόργανης λίπανσης βρέθηκε 0,810%. Όταν συνεκτιμάται το εδαφικό pH, η περιεκτικότητα νικοτίνης σε όξινο pH είναι 0,680% και σε αλκαλικό pH είναι 0,940%.

Από τις αναλύσεις του Καπνολογικού Ινστιτούτου Δράμας αναφέρεται ότι η ποικιλία I περιέχει νικοτίνη μέσης περιεκτικότητας 1,18%. Παρολαυτά, ο Μυλωνάς και συνεργάτες αναφέρουν ότι ανάλογα με το χορηγούμενο άζωτο, η περιεκτικότητα των ολικών αλκαλοειδών κυμαίνεται από 0,75% έως 1,15% (Καπνολογικό Ινστιτούτο).

Εκτός από τον προσδιορισμό της κατάλληλης συγκέντρωσης N στο εδαφικό διάλυμα, υπόψη θα πρέπει να ληφθεί και η χημική του μορφή, (νιτρικό ή αμμωνιακό άζωτο), όπως και ο χρόνος εφαρμογής της αζωτούχου λίπανσης. Η ποικιλία I, απαιτεί χορήγηση αζωτούχου λίπανσης τόσο πριν, όσο και μετά τη μεταφύτευση των φυτών (Μυλωνάς Β.,1994), οπότε λαμβάνοντας υπόψη αυτά τα δεδομένα, μπορούμε να εξηγήσουμε την παρατηρούμενη μείωση της περιεκτικότητας νικοτίνης στα φυτά που αναπτύχθηκαν μετά από εφαρμογή ανόργανης λίπανσης.

Η μέση τιμή περιεκτικότητας νικοτίνης των ομάδων της ποικιλίας II (Μυρωδάτα Αγρινίου) που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα ανόργανης λίπανσης βρέθηκε 1,211%. Όταν συνεκτιμάται το pH του εδάφους, η περιεκτικότητα νικοτίνης είναι 1,205% σε όξινο και 1,217% σε αλκαλικό pH (Καπνολογικό Ινστιτούτο).

Το Καπνολογικό Ινστιτούτο αναφέρει ότι η ποικιλία II εμφανίζει μέση τιμή περιεκτικότητας 1,225%, συγκέντρωση που βρίσκεται σε απόλυτη συμφωνία με τα αποτελέσματά μας.

Σύμφωνα με το Μυλωνά, η ποικιλία II απαιτεί χορήγηση χαμηλής συγκέντρωσης αζώτου, ενώ η αύξηση του εδαφικού αζώτου από 2 έως 8 Kg/ στρέμμα αυξάνει την περιεκτικότητα των ολικών αλκαλοειδών από 1,04 σε 1,49%.

Όσον αφορά το ολικό άζωτο, οι μετρήσεις του Καπνολογικού Ινστιτούτου αναφέρουν η ποικιλία I περιέχει 3,607 % και η ποικιλία II περιέχει 1,730%.



Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι στις ομάδες φυτών που αναπτύσσονται σε έδαφος όπου εφαρμόστηκε ανόργανη λίπανση, η μέση τιμή περιεκτικότητας του ολικού αζώτου στην ποικιλία I είναι 3,603% και στην ποικιλία II είναι 3,680%.

Οι αναλύσεις του Ινστιτούτου Καπνού βρίσκονται σε συμφωνία μόνο όσον αφορά την ποικιλία I.

Στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων μας θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι η μεγαλύτερη ποσότητα εδαφικού αζώτου προσλαμβάνεται από την 4^η έως την 9^η - 10^η εβδομάδα μετά τη μεταφύτευση, ενώ η πρόσληψή του θα πρέπει σταδιακά να ελαττώνεται ώστε να γίνει η πλήρης αφομοίωσή του μέχρι την περίοδο συλλογής των φύλλων.

Σε αντίθετη περίπτωση το φυτό παράγει αυξημένο επίπεδο πρωτεϊνών και άρα ολικού αζώτου (Τσαπικούνης Φ., 1997).

Πολλές άλλες παράμετροι, όπως οι κλιματολογικές συνθήκες, το στάδιο ανάπτυξης του φυτού και ο τύπος και προέλευση της ποικιλίας, επηρεάζουν το ισοζύγιο των αμινοξέων, δηλαδή των ελεύθερων και των δεσμευμένων υπό μορφή πρωτεϊνών. Έτσι, όταν οι συνθήκες του περιβάλλοντος είναι ιδιαίτερα ξηρές περιορίζεται η σύνθεση πρωτεϊνών και ταυτόχρονα αυξάνεται η χρησιμοποίησή τους στην αναπνευστική οδό, με αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης του διαλυτού αζώτου σε μορφή αμινοξέων. Αντίθετα κάτω από συνθήκες έντονης ηλιοφάνειας η πρωτεϊνοσύνθεση γίνεται εντονότερη.

Επίσης, όταν το φυτό μεταβαίνει στην αναπαραγωγική φάση παρατηρείται συνεχής αποδόμηση των πρωτεϊνών με αποτέλεσμα την αύξηση του διαλυτού και την ταυτόχρονη μείωση του ολικού αζώτου, ενώ κατά την αυξητική φάση η πρωτεϊνοσύνθεση υπερβαίνει την αποδόμηση των πρωτεϊνών με αποτέλεσμα την αύξηση του ολικού αζώτου (Akehurst BC., 1981).

Παρόλη την αυξημένη συγκέντρωση ολικού αζώτου στην ποικιλία II, διαπιστώνουμε ότι η περιεκτικότητα νικοτίνης είναι μέσα στα αναφερθέντα όρια, οπότε θα μπορούσαμε να ισχυριστούμε ότι πιθανόν οι μεταβολικοί δρόμοι βιοσύνθεσης των αλκαλοειδών διαφέρουν στις δύο ποικιλίες.

Αυτό που είναι ενδιαφέρον να διαπιστωθεί είναι αν τα βαρέα μέταλλα εμπλέκονται στις μεταβολικές οδούς βιοσύνθεσης των αλκαλοειδών στις δύο ποικιλίες. Από την σύγκριση που ακολουθεί στο επόμενο κεφάλαιο μεταξύ της περιεκτικότητας των αζωτούχων ενώσεων στις ομάδες που αναπτύχθηκαν σε κανονικές συνθήκες λίπανσης (ΑΛ) και στις ομάδες όπου εφαρμόστηκε λάσπη βιολογικού καθαρισμού με αυξημένες

συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων, φαίνεται ότι μπορεί να οδηγηθούμε σε κάποια συμπεράσματα, σχετικά με την αλληλεπίδραση αλκαλοειδών και βαρέων μετάλλων στις δύο ποικιλίες.

Όσον αφορά την περιεκτικότητα NO_3 στις δύο ποικιλίες διαπιστώνεται ότι στα φυτά που αναπτύχθηκαν με εφαρμογή ανόργανης λίπανσης οι περιεκτικότητες είναι 2,787% και 0,937% αντίστοιχα.

Προκειμένου να γίνει σύγκριση δεν υπάρχουν αντίστοιχα στοιχεία στην Ελληνική ή ξένη βιβλιογραφία για τις συγκεντρώσεις νιτρικών στις ποικιλίες I και II.

Για τις ελληνικές, ανατολικού τύπου ποικιλίες που έχουν αναλυθεί (Σαμσούς Κατερίνης, Μπασμά Δράμας και Κάμπα-Κούλακ) οι μέσες τιμές συγκέντρωσης νιτρικών διαφέρουν ανάλογα με την εξεταζόμενη ποικιλία και κυμαίνονται από 0,475% έως 3,325% (Divanidis SG. et al, 1990).

Αζωτούχες ενώσεις και χρόνοι συλλογής

Η συγκέντρωση των αζωτούχων ενώσεων αναφέρεται ότι σχετίζεται με τη θέση των φύλλων στο φυτό του καπνού.

Στο ολικό άζωτο του φυτού συγκαταλέγονται οργανικά συστατικά υψηλού μοριακού βάρους (πρωτεΐνες, νουκλεϊνικά οξέα) και μικρού μοριακού βάρους (διαλυτές αζωτούχες ενώσεις όπως τα αμινοξέα, τα αμίδια, οι αμίνες, οι νιτρικές ενώσεις και τα αλκαλοειδή).

Η ανακύκλωση του αζώτου πραγματοποιείται σε τρία βασικά στάδια όπου στο πρώτο γίνεται μετατροπή του ανόργανου αζώτου (NO_3^- , NH_4^+ , N_2) στις οργανικές ενώσεις μικρού Μ.Β., στο δεύτερο πραγματοποιείται η σύνθεση των υψηλού Μ.Β. αζωτούχων οργανικών ενώσεων και στο τρίτο γίνεται διάσπαση των μεγαλομοριακών ενώσεων από υδρολυτικά ένζυμα.

Η αλληλομετατροπή του διαλυτού σε πρωτεϊνικό άζωτο καθορίζεται από πολλούς παράγοντες από τους οποίους ένας είναι η φάση ανάπτυξης του φυτού (Καράταγλης Σ., 1992).

Η κυριότερη μορφή διαλυτού αζώτου στον καπνό, δηλ. τα αλκαλοειδή, εικάζεται ότι σχετίζονται με την αποταμίευση του πλεονάζοντος αζώτου, και είναι απομεινάρια ενός ανεπαρκούς μεταβολικού δρόμου του φυτού με κύριο μειονέκτημα την σπατάλη στην χρήση του αζώτου.



Η **περιεκτικότητα νικοτίνης** σε σχέση με την θέση των φύλλων στο στέλεχος εξαρτάται από την αφαίρεση ή όχι του άνθους (κορυφολόγημα).

Στα φυτά που έχει προηγηθεί κορυφολόγημα, αναμένεται γενικά ότι η συγκέντρωση νικοτίνης θα είναι τριπλάσια στα κορυφαία σε σχέση με τα κατώτερα φύλλα, πιθανόν γιατί η παράταση της βλαστικής φάσης ευνοεί την αφομοίωση του αζώτου υπό μορφή αμινοξέων, αμιδίων κ.λ.π., που συμμετέχουν στην βιοσύνθεσή της.

Σε φυτά όμως που δεν έχει προηγηθεί κορυφολόγημα, οι έρευνες έχουν δείξει ότι η συγκέντρωση νικοτίνης αυξάνεται ελαφρά προς τα μεγαλύτερα φύλλα του φυτού και ακολουθεί κανονική μείωση όσο το μέγεθός τους μειώνεται, δηλ. στην κορυφή του φυτού (Akehurst BC., 1981).

Στις ποικιλίες I και II, όπου δεν είχε προηγηθεί αφαίρεση του άνθους διαπιστώνεται ότι ανεξαρτήτως υποστρώματος και εδαφικού pH, οι μέγιστες περιεκτικότητες νικοτίνης παρατηρούνται πράγματι στα μεσαίας ηλικίας φύλλα (χρόνος 3 για την ποικιλία I και χρόνος 2 για την ποικιλία II) (εικ.3.60,3.61).

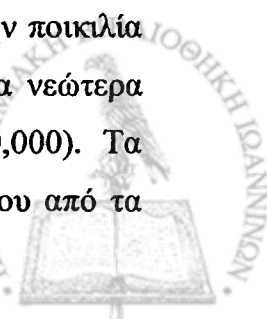
Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι οι διαφορές νικοτίνης στους χρόνους στην ποικιλία I είναι οριακά σημαντικές, ($p=0,05$) και στην ποικιλία II είναι πολύ σημαντικές ($p=0,000$).

Τα ίδια περίπου αποτελέσματα προκύπτουν και όταν λαμβάνεται υπόψη το εδαφικό pH (εικ. 3.56,3.57,3.58,3.59), ή το υπόστρωμα ανάπτυξης (εικ.3.36 έως 3.55), παρόλο που η ποικιλία II όταν καλλιεργείται σε αλκαλικό pH και στα περισσότερα υποστρώματα τείνει να συσσωρεύει παρόμοια με το χρόνο 2 επίπεδα νικοτίνης και στο χρόνο 4 (νεώτερα φύλλα).

Στις μετρήσεις του Καπνολογικού Ινστιτούτου αναφέρεται ότι στην ποικιλία I, η μέγιστη περιεκτικότητα νικοτίνης παρατηρείται στα νεώτερα φύλλα, (χρόνος 4) ενώ στην ποικιλία II εμφανίζεται στα φύλλα δεύτερου χρόνου συλλογής, με αμέσως μικρότερη περιεκτικότητα τα φύλλα του τέταρτου χρόνου (Καπνολογικό Ινστιτούτο).

Για την ποικιλία II τα αποτελέσματά μας συγκλίνουν, με τις αναλύσεις του Ινστιτούτου, κυρίως όσον αφορά την καλλιέργεια σε σχεδόν αλκαλικό έδαφος, ενώ για την ποικιλία I μπορούμε να πούμε ότι οι μετρήσεις τους αφορούσαν κορυφολογημένα φυτά.

Όσον αφορά τις συγκεντρώσεις ολικού αζώτου διαπιστώνεται ότι στην ποικιλία I, σε όλες τις συνθήκες (pH, υπόστρωμα), αυξάνεται από τα γηραιότερα στα νεώτερα φύλλα και οι διαφορές στους χρόνους είναι στατιστικά σημαντικές ($p=0,000$). Τα αποτελέσματα του Καπνολογικού Ινστιτούτου δείχνουν αύξηση ολικού αζώτου από τα



φύλλα πρώτου έως τα φύλλα τελευταίου χρόνου συλλογής χωρίς να είναι γνωστή η στατιστική σημαντικότητα (Καπνολογικό Ινστιτούτο).

Στην ποικιλία II τα αποτελέσματα δείχνουν σε όλες τις συνθήκες, ότι το ολικό άζωτο μειώνεται από τον χρόνο 1 στον χρόνο 4 με ελάχιστη συγκέντρωση στον χρόνο 3 και στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των χρόνων ($p=0,000$).

Το Καπνολογικό Ινστιτούτο αναφέρει ότι το ολικό άζωτο στην ποικιλία II αυξάνεται από τον πρώτο στον δεύτερο χρόνο συλλογής και στην συνέχεια μειώνεται από τον δεύτερο στον τέταρτο χρόνο με ελάχιστη συγκέντρωση στον χρόνο 3 (Καπνολογικό Ινστιτούτο).

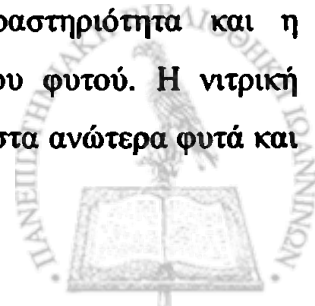
Για τα νιτρικά δεν μπορούμε να κάνουμε συγκρίσεις δεδομένης της έλλειψης στοιχείων για τις συγκεκριμένες ποικιλίες.

Αυτό που διαπιστώνεται όμως είναι ότι στη μεν ποικιλία I, η περιεκτικότητα νιτρικών που διαφέρει στατιστικά σημαντικά στους διάφορους χρόνους ($p= 0,000$), αυξάνεται από τα γηραιότερα στα νεώτερα φύλλα, ενώ στην ποικιλία II η περιεκτικότητα νιτρικών μειώνεται με στατιστική σημαντικότητα ($p=0,000$) από τα γηραιότερα στα νεώτερα φύλλα.

Τα νιτρικά άλατα αποτελούν την κύρια πηγή αζώτου για τα φυτά που για να μεταβολισθούν πρέπει να αναχθούν πρώτα σε νιτρώδη, με τη μεσολάβηση της νιτρικής αναγωγής και μετά σε αμμωνία, με τη μεσολάβηση της νιτρώδους αναγωγής. Η παραγόμενη αμμωνία δεσμεύεται με αναγωγική αμίνωση των α-κετονοξέων (κυρίως του α-κετογλουταρικού οξέως) με τη μεσολάβηση της δεϋδρογονάσης του γλουταμινικού οξέως σε γλουταμινικό οξύ και με τη μεσολάβηση της γλουταμινικής συνθετάσης σε γλουταμίνη.

Η αμινική ομάδα $-NH_2$ του γλουταμινικού οξέως μέσω τρανσαμίνωσης μπορεί να μεταφερθεί σε άλλα α-κετονοξέα με τη δράση αμινοτρανσφερασών, οπότε γίνεται η σύνθεση σχεδόν όλων των αμινοξέων που απαιτούνται από το φυτό.

Η μεταφορά ηλεκτρονίων κατά την αναγωγή των νιτρικών σε νιτρώδη πραγματοποιείται ακολουθώντας μια διαδοχική σειρά αντιδράσεων στον χλωροπλάστη και στο κυτόπλασμα, με τη νιτρική ανωγή να προμηθεύεται υδρογόνο είτε από το $NADPH + H^+$ είτε από το $NADH + H^+$. Η νιτρική αναγωγή υπάρχει σε μεγάλα ποσά στο κυτόπλασμα των μεριστωματικών κυττάρων, ενώ η δραστηριότητα και η συγκέντρωσή της είναι πολύ αυξημένη στα νεώτερα φύλλα του φυτού. Η νιτρική αναγωγή είναι σύμπλοκο ένζυμο με μοριακό βάρος 200.000 Da στα ανώτερα φυτά και



στο μόριό της περιέχει αρκετές προσθετικές ομάδες συμπεριλαμβανομένης της FAD, του κυτοχρώματος και του μολυβδαινίου (Mo).

Με τη μείωση της δραστηριότητας της νιτρικής αναγωγάσης παρατηρείται αύξηση στη συγκέντρωση νιτρικών αλάτων στα κύτταρα των φυτών (Marschner H., 1995).

Από εργασία των Διβανίδη και συνεργατών διαπιστώνουμε ότι η χρονική μεταβολή της συγκέντρωσης των νιτρικών διαφέρει στις διάφορες ποικιλίες καπνού.

Έτσι, στη μελέτη αναφέρεται ότι τα νιτρικά μειώνονται από τον πρώτο στον τελευταίο χρόνο συλλογής στις ποικιλίες Μπασμά Δράμας, Σαμσούς Κατερίνης και Μπέρλεν Γιαννιτών, ενώ αυξάνονται στις ποικιλίες Κάμπα-Κούλακ και Βιρτζίνια Καρδίτσας (Divanidis SG. et al., 1990).

Οι ίδιοι αναφέρουν ότι εκτός από τα νιτρικά, ανάλογη χρονική πορεία στις ποικιλίες που αναλύθηκαν παρατηρήθηκε και για το NO και για την ειδική νιτροζαμίνη NNN που περιεχόταν στο κύριο ρεύμα του αέριου προϊόντος τους.

Με βάση αυτά τα δεδομένα μπορούμε να ισχυριστούμε ότι αναμένεται στην ποικιλία I ανεξάρτητα υποστρώματος και εδαφικού pH, αύξηση των παραγόμενων TSNA από τα γηραιότερα στα νεώτερα φύλλα, ενώ στην ποικιλία II αναμένεται σε αντιστοιχία με τα περιεχόμενα νιτρικά μείωση των παραγόμενων νιτροζαμινών.

Αζωτούχες ενώσεις και γονότυπος

Από τα αποτελέσματά μας διαπιστώνεται ότι η ποικιλία II περιέχει σημαντικά ($p=0,000$) υψηλότερα επίπεδα νικοτίνης από την ποικιλία I, ανεξαρτήτως υποστρώματος ανάπτυξης. Επίσης, στην ποικιλία II, η περιεκτικότητα των νιτρικών είναι σημαντικά ($p=0,000$) χαμηλότερη σε σχέση με την ποικιλία I. Παρόλα αυτά, οι συγκεντρώσεις ολικού αζώτου δεν διαφέρουν στις δύο ποικιλίες (εικ.3.70).

Οι διαπιστώσεις αυτές ισχύουν και όταν λαμβάνεται υπόψη το εδαφικό pH, οπότε θα μπορούσαμε να ισχυριστούμε ότι η βιοσύνθεση των αλκαλοειδών και η αφομοίωση των νιτρικών στις δύο ποικιλίες αποδίδεται σε γονοτυπικές κυρίως διαφορές και όχι στην εδαφική οξύτητα.

Οι Ελληνικές ποικιλίες καπνού είναι άμεσα ή έμμεσα Αμερικανικής προέλευσης και αποτέλεσμα μακροχρόνιου εγκλιματισμού, φυσικής επιλογής, διασταυρώσεων και μεταλλαγών δύο τουλάχιστον βασικών γενετικών υβριδίων καπνού.

Η ποικιλία I (Τσεμπέλια Αγρινίου) κατατάσσεται στις ποικιλίες γεύσεως ή βασικές και χαρακτηρίζεται από τη μικρή περιεκτικότητα νικοτίνης και τα λίγα σάκχαρα, ενώ η



ποικιλία II (Μυρωδάτα Αγρινίου) κατατάσσεται στις ποικιλίες γεμίσματος ή ουδέτερες και χαρακτηρίζεται από τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα νικοτίνης και τα πολλά σάκχαρα.

Οι δύο ποικιλίες κατάγονται από παλιές τοπικές ποικιλίες μετά από υβριδισμό και επιλογή. Τα διάφορα φυσικά, χημικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των διαφόρων καλλιεργούμενων ποικιλιών καπνού είναι ως ένα βαθμό διακριτικά του τύπου ή ποικιλίας και επηρεάζονται σημαντικά από τις συνθήκες του περιβάλλοντος, τις καλλιεργητικές φροντίδες, την αποξήρανση, τη ζύμωση και την επεξεργασία (Σφήκας ΑΓ., 1994).

Από την στατιστική ανάλυση προκύπτει ότι από τις παραμέτρους που εξετάστηκαν (pH, χρόνοι συλλογής, υπόστρωμα), το υπόστρωμα ανάπτυξης καθορίζει σημαντικά τις διαφορές συγκέντρωσης νικοτίνης και νιτρικών μεταξύ της ποικιλίας I και II.

Αζωτούχες ενώσεις και υποστρώματα

Από τα αποτελέσματα διαπιστώνεται ότι στην ποικιλία I, δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0,008$) στην περιεκτικότητα νικοτίνης στα διάφορα υποστρώματα ανάπτυξης, ενώ τόσο οι συγκεντρώσεις του ολικού αζώτου όσο και τα επίπεδα των νιτρικών διαφέρουν σημαντικά.

Επίσης παρατηρείται ότι η νικοτίνη που περιέχεται στα φυτά που αναπτύσσονται σε έδαφος όπου εφαρμόζεται λάσπη βιολογικού καθαρισμού σε αναλογίες 10% και 20% δεν διαφέρει σημαντικά από τα φυτά της ανόργανης λίπανσης, ενώ η παραγωγή νικοτίνης αυξάνεται σημαντικά ($p=0,000$) μόνο κατά την εφαρμογή λάσπης σε αναλογία 40%.

Αντίστοιχα, τα νιτρικά στην ποικιλία I αυξάνονται προοδευτικά με την αύξηση της αναλογίας της εφαρμοζόμενης λάσπης σε επίπεδα που όμως είναι σημαντικά χαμηλότερα από τα νιτρικά που περιέχονται στα φυτά που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα όπου εφαρμόστηκε ανόργανη λίπανση. Ανάλογη αύξηση παρατηρείται και στο ολικό άζωτο της ποικιλίας I με αύξηση της αναλογίας της λάσπης, ενώ όταν εφαρμόζεται ανόργανη λίπανση φαίνεται ότι δεν μεταβάλλεται σημαντικά η περιεκτικότητα ολικού αζώτου σε σχέση με τις ομάδες εφαρμογής λάσπης (εικ.3.66).

Η κύρια παράμετρος που προσδιορίζει το ποσοστό της εφαρμοζόμενης λάσπης βιολογικού καθαρισμού για γεωργικούς σκοπούς είναι η περιεκτικότητα του N της λάσπης ή η βιοδιαθεσιμότητα του N στο καλλιεργούμενο φυτό. Η κύρια μορφή N στην λάσπη είναι η οργανική ενώ περιέχονται και μικρές ποσότητες διαλυτού νιτρικού αζώτου και αμμωνίας.



Η οργανική μορφή είναι σημαντική πηγή αζώτου για τα φυτά που όμως απελευθερώνει σταδιακά το απαιτούμενο άζωτο μέσω της διαδικασίας της mineralization-ανοργανοποίησης (μετατροπής σε NH_4^+ , NO_3^- και NO_2), η οποία διαφοροποιείται στα είδη της λάσπης, στους τρόπους επεξεργασίας της και στις αναλογίες εφαρμογής της. Σε κάθε περίπτωση προκειμένου να μην γίνει υπέρβαση των ετήσιων αναγκών των φυτικών ειδών σε άζωτο και προκειμένου να αποφευχθεί η ρύπανση και ο ευτροφισμός του υδροφόρου ορίζοντα και της θάλασσας θα πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στις ετήσιες αναλογίες εφαρμογής της λάσπης όπως και στη μελλοντική διάσπαση του οργανικού αζώτου (Ross AD.et al, 1992).

Οι Serna και συνεργάτες αναφέρουν ότι ανάλογα με την προέλευση της λάσπης, η συσσωρευτική συγκέντρωση του N που προσλαμβάνεται από το ίδιο είδος φυτού κυμαίνεται από 7-20% και ότι το ποσοστό mineralization (ανοργανοποίησης) του αζώτου είναι από 14 έως 46%, όπου τα μεγαλύτερα ποσοστά αντιστοιχούν στα λύματα αερόβιας επεξεργασίας (Serna MD.et al, 1992).

Στην ποικιλία I φαίνεται ότι η εφαρμογή λάσπης βιολογικού καθαρισμού καλύπτει τις ανάγκες σε ολικό άζωτο σε σχέση με την ανόργανη λίπανση και ότι ως ένα βαθμό η δυνατότητα παραγωγής νικοτίνης δεν επηρεάζεται σημαντικά από την αύξηση της αναλογίας της λάσπης.

Η παράμετρος που θα πρέπει να ληφθεί σοβαρά υπόψη είναι η παρατηρούμενη αύξηση στα επίπεδα των νιτρικών της ποικιλίας I όταν εφαρμόζεται λάσπη βιολογικού καθαρισμού που μπορεί να συντελέσει στην αύξηση των παραγόμενων TSNA κατά την διάρκεια του καπνίσματος. Η ποικιλία I φαίνεται ότι αδυνατώντας να ενσωματώσει υπό μορφή αμινοξέων ή αλκαλοειδών την περίσσεια των απορροφούμενων νιτρικών, εμφανίζει σημαντικά αυξημένες συγκεντρώσεις σε σχέση με τον μάρτυρα (ομάδα 0%).

Παρόλα αυτά, θα πρέπει να αναφέρουμε ότι από τα αποτελέσματά μας φαίνεται ότι η οργανική μορφή αζώτου συντελεί στη σημαντικά μικρότερη περιεκτικότητα νιτρικών σε σχέση με την ανόργανη μορφή των χημικών λιπασμάτων που, έχει βρεθεί ότι στις ανατολικού τύπου ποικιλίες ενισχύει την συγκέντρωση του οξειδίου του αζώτου στο αέριο προϊόν (Divanidis SG. et al, 1990).

Όσον αφορά την ποικιλία II, τα αποτελέσματά μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι παρατηρείται μια εντελώς αντίθετη με την ποικιλία I συμπεριφορά στην βιοσύνθεση των αζωτούχων ενώσεων κατά την ανάπτυξη σε διαφορετικά υποστρώματα.



Στην ποικιλία αυτή η περιεκτικότητα της νικοτίνης διαφέρει σημαντικά ($p=0,003$) στις διάφορες ομάδες υποστρωμάτων, ενώ τα επίπεδα των νιτρικών και του ολικού αζώτου δεν φαίνεται να επηρεάζονται από το χρησιμοποιούμενο υπόστρωμα.

Η ποικιλία II φαίνεται ότι ανταποκρίνεται καλύτερα από την ποικιλία I στην οργανική μορφή λίπανσης γιατί ενσωματώνει ικανοποιητικά τα διαθέσιμα νιτρικά χωρίς σημαντικές διαφοροποιήσεις στις διάφορες αναλογίες λάσπης και χωρίς σημαντική επιβάρυνση, εκτός ίσως της ομάδας 40%, σε συσσώρευση νιτρικών σε σχέση με την ανόργανη μορφή λίπανσης (εικ.3.67).

Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με παλιότερη εργασία των Καλλίστρατου και συνεργατών που αναφέρουν ότι στην ποικιλία II (Μυρωδάτα Αγρινίου) δεν βρέθηκαν ανιχνεύσιμα επίπεδα νιτροζαμινών (Kallistratos G.et al, 1983), προφανώς λόγω μικρής συγκέντρωσης νιτρικών.

Προκειμένου να γίνει αξιολόγηση των αποτελεσμάτων μας, δεν υπάρχουν μελέτες στον καπνό που να αφορούν στην ανάλυση της περιεκτικότητας των αζωτούχων ενώσεων κατά την ανάπτυξη σε έδαφος εμπλουτισμένο με λάσπη βιολογικού καθαρισμού, πιθανόν γιατί όπως αναφέρουν οι Guttenmann και συνεργάτες να είναι αναμενόμενη η δραστική αλλαγή στην φυσιολογική βιοσύνθεση των αζωτούχων συστατικών των φύλλων παρουσία βαρέων μετάλλων (Guttenmann WH.et al, 1982).

Παρόλο που εδώ και πολλά χρόνια μελετάται η λιπασματική αξία και η περιβαλλοντική επιβάρυνση κατά την χρήση λάσπης βιολογικού καθαρισμού, οι μετρήσεις που έχουν γίνει αφορούν μόνο το ολικό άζωτο, που είτε αναφέρεται ότι αυξάνεται σημαντικά (Gutenmann et al, 1982) είτε ότι αυξάνεται ελαφρά (Gigliotti G.et al, 1993) όταν εφαρμόζεται λάσπη βιολογικού καθαρισμού στην καλλιέργεια του καπνού. Επίσης, οι Butorac A.et al (1995) αναφέρουν ότι η χρήση οργανικών λιπασμάτων βρέθηκε ότι αυξάνει τις συγκεντρώσεις νικοτίνης και K και ότι μειώνει τα επίπεδα των αναγωγικών σακχάρων, του Ca και του Mg.

Σε εργασία των McGrath και συνεργατών, αναφέρεται ότι η παρουσία βαρέων μετάλλων στη λάσπη βιολογικού καθαρισμού μπορεί να επηρεάσει τη μικροβιακή δραστηριότητα και τους πληθυσμούς των ετεροτροφικών βακτηρίων, των κυανοβακτηρίων και των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων του γένους *Rhizobium* που δεσμεύουν βιολογικά το ατμοσφαιρικό άζωτο (N_2) και το μεταφέρουν σε ανόργανο δεσμό, με αποτέλεσμα τη μακροπρόθεσμη μείωση της εδαφικής γονιμότητας και της ανάπτυξης των καλλιεργούμενων φυτών (McGrath SP.et al, 1995).



Στην ποικιλία II, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το άζωτο που προσλαμβάνεται μετατρέπεται σε διάφορες αζωτούχες ενώσεις, οπότε δεν αυξάνεται σημαντικά η συγκέντρωση των νιτρικών (εκτός της ομάδας 40%) στις ομάδες εφαρμογής λάσπης σε σχέση με το μάρτυρα (ομάδα 0%).

Αντίθετα στην ποικιλία I, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το προσλαμβανόμενο άζωτο παραμένει υπό μορφή νιτρικών, οπότε το επίπεδο νικοτίνης αν και διαφέρει σημαντικά από του μάρτυρα (εκτός της ομάδας 20%) δεν αυξάνεται περισσότερο στις ομάδες εφαρμογής λάσπης.

Η μη εμφάνιση διαφορών στην ποικιλία I ως προς την περιεκτικότητα νικοτίνης στα διάφορα υποστρώματα εμφανίζεται κυρίως στο αλκαλικό pH όπου οι ομάδες υποστρώματος 10% και 20% δεν διαφέρουν ούτε με την ομάδα ανόργανης λίπανσης ούτε με το μάρτυρα (εικ.3.63).

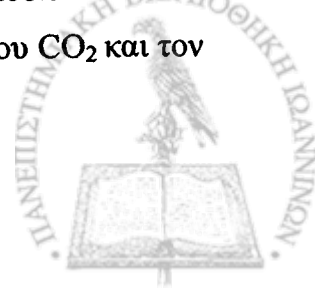
Αντιθέτως η συμπεριφορά της ποικιλίας I μεταβάλλεται όταν το pH του εδάφους είναι όξινο, όπου η συγκέντρωση της νικοτίνης αυξάνεται σημαντικά στις ομάδες με 10% και 40% αναλογία λάσπης σε σχέση με την ομάδα της ανόργανης λίπανσης.

Στην ομάδα με 20% αναλογία λάσπης η παραγόμενη νικοτίνη μειώνεται σημαντικά στα επίπεδα της ανόργανης λίπανσης (εικ.3.62).

Από τα παραπάνω μπορούμε να ισχυριστούμε ότι το pH του εδάφους όταν εφαρμόζεται λάσπη βιολογικού καθαρισμού Ιωαννίνων μπορεί να διαφοροποιήσει την βιοσυνθετική συμπεριφορά της νικοτίνης της ποικιλίας I, γεγονός που μπορεί να αποδοθεί την πιθανή συμμετοχή των βαρέων μετάλλων (Douma D. et al,1999).

Η εμπλοκή των βαρέων μετάλλων στο μεταβολισμό του αζώτου έχει αναφερθεί από πολλούς ερευνητές οι οποίοι εστιάζουν το ενδιαφέρον τους στις ανταγωνιστικές και συνεργιστικές σχέσεις των απαραίτητων και των μη απαραίτητων μετάλλων στον καπνό.

Σε παλαιότερη εργασία των Wen et al αναφέρεται ότι κατά την εφαρμογή βαρέων μετάλλων (Cd, Cu και Zn) σε φυτά καπνού, αυξήθηκε η συγκέντρωση του ολικού αζώτου και των ολικών αλκαλοειδών των φύλλων με ταυτόχρονη μείωση του περιεχόμενου P και των αναγωγικών σακχάρων (Wen TC., 1983). Ο Cu εκτός από τη συμμετοχή του στη σύσταση βασικών ενζύμων των φυτών (πλαστοκυανίνη, υπεροξειδική δισμουτάση, κυτοχρωμική οξειδάση, ασκορβική οξειδάση) αποτελεί συστατικό της φαινολάσης που συντελεί στην οξείδωση των φαινολών και στη βιοσύνθεση των αλκαλοειδών. Ο Zn ενεργοποιεί την καρβονική ανυδράση που συμμετέχει στην αποταμίευση του CO₂ και τον



σχηματισμό HCO_3^- στις αντιδράσεις καρβοξυλίωσης των φυτών (Marschner H., 1995, Padiglia A. et al, 1999).

Το Cd σε συγκεντρώσεις 0-100 ppm προκάλεσε μείωση των χλωροφυλλών a και b και της νικοτίνης. Αύξηση του Cd στα 150 ppm προκάλεσε αύξηση της νικοτίνης καθώς και των πρωτεϊνών. Η ενεργότητα της υπεροξειδάσης των φύλλων και της CMP (CMP :5' - μονοφωσφορική κυτιδίνη = cytosine 5' - monophosphate) τέλος αυξήθηκε όταν αυξήθηκε η συγκέντρωση του Cd (Li Y. et al, 1992).

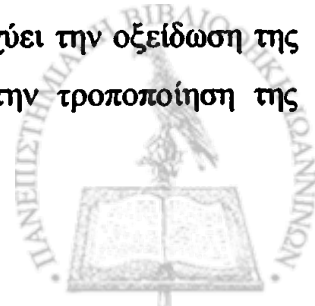
Η CMP είναι φωσφορυλιώμενο νουκλεοσίδιο που προέρχεται από την διάσπαση της τριφωσφορικής κυτιδίνης (CTP) η οποία χρησιμοποιείται στην βιοσύνθεση των γλυκερινοφωσφατιδίων (π.χ. φωσφατιδυλοχολίνης, φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης, φωσφατιδυλοσερίνης κ.λ.π.), ως ενεργοποιημένο ενδιάμεσο κατά τον σχηματισμό του φωσφοδιεστερικού δεσμού.

Τα γλυκερινοφωσφατίδια έχουν κυρίως σημασία σαν συστατικά των βιολογικών μεμβρανών και άρα των θυλακοειδών μεμβρανών που εντοπίζονται στους χλωροπλάστες και που περιέχουν τις χρωστικές της φωτοσύνθεσης και τα άλλα οξειδοαναγωγικά συστήματα που χρειάζονται για την εναποθήκευση ενέργειας σε μορφή ATP (Karlson P., 1984).

Από τα αποτελέσματά μας φάνηκε ότι στην ποικιλία I παρατηρούνται ισχυρά αρνητικές συσχετίσεις μεταξύ της νικοτίνης και των βαρέων μετάλλων σε όλες τις εφαρμογές λάσπης και κυρίως στην ομάδα 20% όπου, όπως αναφέρθηκε, σε συνθήκες όξινου pH υπάρχει σημαντική μείωση στα επίπεδα νικοτίνης (πιν.3.2).(Douma D. et al, 2001).

Επίσης σε συνθήκες όξινου pH τα επίπεδα των νιτρικών της ποικιλίας I αυξάνονται σημαντικά με την αύξηση της αναλογίας λάσπης (εικ.3.62).

Άλλοι ερευνητές αναφέρουν ότι η αυξημένη συγκέντρωση Cd στις ρίζες και τους βλαστούς προκαλεί μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας της νιτρικής αναγωγάσης (NRA = nitrate reductase activity) που όμως διαφέρει από είδος σε είδος. Οι ίδιοι αναφέρουν ότι η αναστολή της NRA στα φύλλα ορισμένων φυτικών ειδών είναι κυρίως έμμεση και σχετίζεται με την αναστολή της παραγωγής του NADPH που προμηθεύει υδρογόνο κατά την αναγωγή των νιτρικών σε νιτρώδη λόγω μειωμένης φωτοσύνθεσης και αναπνοής, παρουσία Cd. Επίσης είναι πιθανόν ότι το Cd ενισχύει την οξείδωση της NADPH ή ότι το Cd δεσμεύεται στο ένζυμο με αποτέλεσμα την τροποποίηση της καταλυτικής του λειτουργίας (Elsokkary IH. et al, 1991).



Από τα αποτελέσματα διαπιστώσαμε ότι στην ποικιλία I, εκτός από τις ισχυρά αρνητικές συσχετίσεις μεταξύ της νικοτίνης και των βαρέων μετάλλων, σε όλες τις εφαρμογές της λάσπης και σε αλκαλικό pH παρατηρούνται και ισχυρά θετικές συσχετίσεις μεταξύ των Zn και Cu με τα υπόλοιπα μέταλλα (πιν.3.9, 3.11).

Στην ποικιλία II, όταν το pH του εδάφους είναι όξινο, η εφαρμογή της λάσπης σε κάθε αναλογία προκαλεί σημαντική αύξηση στην περιεκτικότητα της νικοτίνης σε σχέση με το μάρτυρα (0%) (εικ.3.64). Επίσης, στην ποικιλία II δεν βρέθηκαν πολλές συσχετίσεις νικοτίνης και μη απαραίτητων μετάλλων στις διάφορες ομάδες υποστρωμάτων, ενώ στην ομάδα με 20% ποσοστό λάσπης εμφανίσθηκε αρνητική συσχέτιση νικοτίνης-Cu (πιν.3.2).

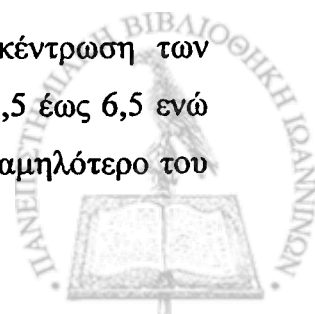
Η διαπίστωση αυτή συνοδεύεται και από το γεγονός ότι τα επίπεδα των νιτρικών στις ομάδες 10%, 20% και 40% δεν διαφέρουν από του μάρτυρα (0%) ενώ μόνο η εφαρμογή ανόργανης μορφής λίπανσης αυξάνει σημαντικά τα επίπεδα.

Όταν το pH του εδάφους που χρησιμοποιείται είναι αλκαλικό και γίνεται εφαρμογή λάσπης, η παραγωγή νικοτίνης στην ποικιλία II είτε δεν διαφέρει (ομάδες 10% και 20%) είτε μειώνεται (ομάδα 40%) σε σχέση με το μάρτυρα. Ταυτόχρονα στις ομάδες εφαρμογής λάσπης η νικοτίνη είτε είναι αυξημένη είτε δεν διαφέρει σε σχέση με την ομάδα ανόργανης λίπανσης (εκτός της ομάδας 40% όπου μειώνεται σημαντικά), παρόλο που τόσο το ολικό άζωτο όσο και τα νιτρικά δεν διαφέρουν σημαντικά στις διαφορετικές ομάδες υποστρωμάτων (εικ.3.65). Σε αλκαλικό pH τα επίπεδα του Cr αυξάνονται στην ποικιλία II (εικ.3.34) και ταυτόχρονα παρατηρείται θετική συσχέτιση νικοτίνης- Cr (πιν.3.6).

Παρόλο που η έλλειψη Ca προκαλεί χαμηλή συγκέντρωση νικοτίνης και η προσθήκη του σε όξινα εδάφη ενισχύει την πρόσληψη N από τον καπνό, ευνοϊκό εδαφικό pH για την καλλιέργεια του καπνού είναι από 5,5 έως 6,5. Η άνοδος του pH άνω του 6,8 είναι ανεπιθύμητη γιατί μπορεί να προκαλέσει προβλήματα διαθεσιμότητας Fe, Mn, Zn και μείωση πρόσληψης K, Mg και P (Μυλωνάς Β., 1994), όπως και τοξικότητα Al (Marsh BH.,1990).

Αζωτούχες ενώσεις και pH

Το εδαφικό pH έχει βρεθεί ότι επηρεάζει σημαντικά την συγκέντρωση των αζωτούχων ενώσεων του καπνού. Ευνοϊκό pH θεωρούνται οι τιμές από 5,5 έως 6,5 ενώ μετρίως ευνοϊκό θεωρούνται οι τιμές από 7,0 έως 8,5. Όταν το pH είναι χαμηλότερο του



5,5 τα εδάφη αναφέρεται ότι είναι προβληματικά είτε λόγω αντικατάστασης και έκπλυσης των ανταλλάξιμων κατιόντων K, Ca και Mg από κατιόντα H και Al, είτε λόγω ισχυρής δέσμευσης των φωσφορικών ιόντων, είτε λόγω πιθανής μείωσης της διαθεσιμότητας του Mo που συμμετέχει άμεσα στην αναγωγική δέσμευση και μεταφορά του αζώτου μέσω νιτρογενάσης και νιτρικής αναγωγάσης (Γιασόγλου Ν. και συν., 1994).

Από τα αποτελέσματά μας διαπιστώνεται ότι όταν το εδαφικό pH είναι όξινο και δεν λαμβάνεται υπόψη το υπόστρωμα ανάπτυξης, η συγκέντρωση νικοτίνης στις ποικιλίες I και II είναι σημαντικά χαμηλότερες σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα σε συνθήκες αλκαλικού pH, ενώ οι συγκεντρώσεις των νιτρικών και του ολικού αζώτου δεν διαφέρουν (εικ.3.68,3.69).

Παρόλο που το αλκαλικό εδαφικό pH (=7,4) δεν θεωρείται ιδανικό γιατί όπως αναφέρεται άνοδος του pH άνω του 6,8 μπορεί να προκαλέσει μείωση στην πρόσληψη Fe, Zn και Mn, παρατηρούμε ότι οι συγκεντρώσεις της νικοτίνης είναι σημαντικά υψηλότερες από του όξινου (=5,5). Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι σε όξινα εδάφη προκαλείται μείωση του pH κυρίως λόγω παραγωγής ιόντων H κατά τη νιτροποίηση του αμμωνιακού αζώτου που περιέχεται τόσο στα χημικά λιπάσματα όσο και στην οργανική ουσία της λάσπης (King LD. et al, 1990, Bell RH. et al, 1989 και Μυλωνάς Β. και συν., 1994).

Συστατικά του καπνού και υγεία

Παρόλη την αποτελεσματικότητα των φίλτρων στα τσιγάρα και τις σημαντικές αλλαγές που πραγματοποιήθηκαν τις τελευταίες δεκαετίες στην παρασκευή, σύσταση και σχεδιασμό τους, τα ποσοστά μεταφοράς των καρκινογόνων παραγόντων στο κύριο ρεύμα και στο παράπλευρο ρεύμα καπνού που εισπνέουν οι καπνιστές και στον περιβαλλοντικό καπνό που εισπνέουν οι παθητικοί καπνιστές, παραμένουν σε υψηλά επίπεδα (Chiba M. et al, 1992, Brunnemann KD. et al, 1996 (a), Hoffmann D. et al, 1994).

Στους καρκινογόνους παράγοντες του αέριου προϊόντος του καπνού, συγκαταλέγονται τα βαρέα μέταλλα και οι TSNA (Hoffmann D. et al, 1997 (a), Smith CJ. et al, 1997).

Η τροποποίηση της παρασκευής των τσιγάρων και των καπνιστικών συνθηκών φαίνεται ότι μετέβαλλε την χημεία του αέριου προϊόντος και φαίνεται ότι συνδέεται άμεσα με την αλλαγή στην συχνότητα εμφάνισης ορισμένων τύπων καρκίνου που σχετίζονται με τον ένα ή τον άλλο καρκινογόνο παράγοντα (Stellman SD. et al, 1997).

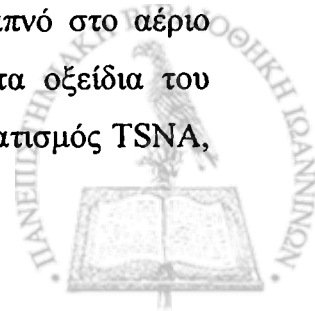
Μέταλλα όπως ο Cu, το Cr και το Cd, μέσω διαφόρων μηχανισμών προμεταλλακτικών βλαβών (Dovinova I. et al,1999, Izzotti A. et al), είναι δυνατόν να οδηγήσουν σε καρκινογένεση στα όργανα συσσωρεύσής τους, όπως στον πνεύμονα, στα νεφρά, στον προστάτη, στο ήπαρ, στους όρχεις, στο αιμοποιητικό σύστημα, στους μύες και στον λιπώδη ιστό (Misra R. et al, 1997, 1998, Kasprzak S. et al, 1995).

Άλλα μέταλλα όπως ο Pb, των οποίων η μεταλλαξογόνος δράση εκδηλώνεται σε υψηλές μόνο δόσεις, μπορούν σε χαμηλά επίπεδα να είναι συµμεταλλαξογόνοι και πιθανόν συγκαρκινογόνοι παράγοντες, ενισχυτικοί άλλων μεταλλακτικών παραγόντων όπως η υπεριώδης ακτινοβολία (Roy NK. et al, 1992, Hartwig A. et al,1990).

Εκτός από την άμεση δράση τους στην πρόκληση του καρκίνου, τα βαρέα μέταλλα όπως ο Pb ή το Cd, μπορεί να συμβάλλουν και έµμεσα στην επαγωγή της καρκινογένεσης με παθογόνες δράσεις στις οποίες μεσολάβουν και στις οποίες συμπεριλαμβάνονται η υπεροξειδωση των λιπιδίων π.χ στους ινοβλάστες του πνεύμονα (Yang CF. et al, 1997), στο ήπαρ και στα νεφρά (Gupta P. et al, 1999, Shaikh ZA. et al, 1997) ή στα ερυθρά αιμοσφαίρια (Gurer H. et al, 1998). Επίσης, μπορεί να αναστείλουν τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς άμυνας π.χ στον πνεύμονα (Martin-Mateo MC. et al,1997, McKenna I. et al, 1998) και στα ερυθρά αιμοσφαίρια (Sarkar S. et al,1997) και μπορεί να διεγείρουν φλεγμονή που τουλάχιστον στον πνευμονικό ιστό σχετίζεται με τη νεοπλασία (McKenna I. et al, 1997, Borm PJ. et al, 1996).

Από την άλλη πλευρά τα αλκαλοειδή του καπνού όπως η νικοτίνη, μπορεί να σχετίζονται άμεσα με την παθογένεση του καρκίνου του πνεύμονα π.χ. α) μέσω ενεργοποίησης της μιτογόνο-ενεργοποιούμενης πρωτεΐνης MAP (mitogen-activated protein) στα καρκινικά κύτταρα και αναστολής της απόπτωσης τους και β) μέσω ακύρωσης των αντικαρκινογόνων δράσεων των θεραπευτικά χορηγούμενων οπιοειδών τα οποία αναστέλλουν τις δράσεις της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC: protein Kinase C) και της ERK2 (Heusch WL. et al, 1998).

Από το μεταβολισμό της νικοτίνης κατά την επεξεργασία, την αποθήκευση και το κάπνισμα προκύπτουν οι καρκινογόνες ειδικές N-νιτροζαμίνες του καπνού (TSNA: tobacco specific nitrosamines) που είτε μεταφέρονται άμεσα είτε παράγονται μέσω πυρολυτικών αντιδράσεων κατά την καύση στο κύριο και παράπλευρο ρεύμα του αέριου προϊόντος. 25-45% των TSNA φθάνει με άμεση μεταφορά από τον καπνό στο αέριο προϊόν, ενώ το υπόλοιπο συντίθεται με αντίδραση της νικοτίνης με τα οξείδια του αζώτου. Ταυτόχρονα στους καπνιστές είναι αυξημένος ο ενδογενής σχηματισμός TSNA,



μετά από πρόσληψη αλκαλοειδών και οξειδίων του αζώτου ή νιτρικών (Hecht SS. et al, 1977, Burton H. et al, 1992, Hecht SS., 1997).

Διάφορες υπεροικογένειες ενζύμων (Κυτόχρωμα P450, glutathione-transferases (GTs)-γλουταθειόνη-θειοτρανσφεράση, N-acetyltransferases (NATs) θεωρούνται απόκριση στις τοξικές επιθέσεις του περιβάλλοντος. Επομένως, μεταβολές της δραστηριότητας των ενζύμων οδηγούν σε μεγαλύτερη ευαισθησία στον καρκίνο. Πολλά από τα ένζυμα αυτά είναι γενετικά πολυμορφικά και σε πολλές μελέτες έχουν συσχετιστεί συγκεκριμένα αλληλόμορφα με μεγαλύτερη ευαισθησία στον καρκίνο, π.χ. GSTM1 GSTT1. Βρέθηκε ότι υπάρχει συσχετισμός -αυξημένη συχνότητα του μηδενικού αλληλομόρφου του GSTM1 σε καπνιστές με καρκίνο πνεύμονα (αδενοκαρκίνωμα) και άλλους καρκίνους σε σχέση με τους μάρτυρες. Σύμφωνα με τους πολυμορφισμούς του ανθρώπινου NAT2, οι άνθρωποι διακρίνονται σε αργούς και γρήγορους ακετυλιωτές ανάλογα με τη δραστηριότητα του ενζύμου αυτού. Οι αργοί ακετυλιωτές είναι ευπαθείς στις αρωματικές και ετεροκυκλικές αμίνες από οποιαδήποτε πηγή και αν προέρχονται. Κυρίως ενοχοποιούνται για τον καρκίνο της ουροδόχου κύστης (Filiadis IF. et al, 1999).

Είναι επομένως αντιληπτό ότι είναι σημαντική η μείωση τόσο της περιεχόμενης νικοτίνης όσο και των νιτρικών στο περιεχόμενο μίγμα των τσιγάρων, δεδομένης της σχέσης τους με τα TSNA.

Εκτός από την άμεση επαφή τους με τον άνω γαστρεντερικό σωλήνα, την τραχεία και τον πνεύμονα, τα προϊόντα του μεταβολισμού των TSNA μεταφέρονται μέσω της κυκλοφορίας στο ήπαρ, στο πάγκρεας, στο νεφρό και στην ουροδόχο κύστη (Hoffmann D. et al, 1985).

Από βιοδοκιμές σε πειραματόζωα βρέθηκε ότι τα μεταβολικά προϊόντα των TSNA, όπως η NNK και η NNN, προκαλούν μεταλλάξεις στον πνεύμονα στην ρινική κοιλότητα, στο ήπαρ, στο πάγκρεας και στον οισοφάγο που φαίνεται ότι σχετίζονται με την ανάπτυξη όγκων στον πνεύμονα (όπως κυψελίδο/βρογχιόλιο υπερπλασιών, αδενωμάτων και αδενοκαρκινομάτων), στο πάγκρεας, στην ρινική κοιλότητα, στην τραχεία, στον οισοφάγο, και στην γλώσσα. (Kawano R. et al, 1996, Schuller HM. et al, 1998, Hoffmann D. et al, 1994, Patten CJ. et al, 1997, Hecht SS., 1999 (α)).

Εκτός από τους επιβλαβείς παράγοντες που ανιχνεύονται στο αέριο προϊόν του καπνού, μέταλλα όπως ο Zn με τεκμηριωμένη αντιοξειδωτική προστασία μεταφέρονται, έστω και σε μικρό ποσοστό, στο κύριο ρεύμα καπνού που παράγεται από τσιγάρα με φίλτρο. Η παρουσία του Zn εξασφαλίζει την λειτουργία και διαμόρφωση πολλών μεταγραφικών παραγόντων όπως των ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών, των

επιδιορθωτικών ενζύμων που απομακρύνουν τις ενδογενείς βλάβες που προκύπτουν από άλλους παράγοντες και των αντιοξειδωτικών ενζύμων που χρησιμοποιούνται ως εκκαθαριστές των ελευθέρων ριζών (Meplan C. et al, 1999, Hartwig A., 1998, Sato M. et al, 1993).

Από τα παραπάνω είναι φανερό ότι κύρια επιδίωξη θα πρέπει να είναι ο προσδιορισμός των συνθηκών εκείνων (pH υποστρώματος, σύσταση υποστρώματος, συλλογές φύλλων και γονότυποι) που θα συμβάλλουν στην παραγωγή καπνού με όσο το δυνατόν μικρότερες συγκεντρώσεις Cd, Cr, Cu, Pb, νικοτίνης και νιτρικών και μεγαλύτερες συγκεντρώσεις Zn, ώστε το αέριο προϊόν που εισπνέουν οι καπνιστές να περιέχει λιγότερες επιβλαβείς ουσίες. Σκοπός της εργασίας ήταν ο προσδιορισμός των συνθηκών αυτών στην καλλιέργεια δύο ποικιλιών καπνού.

Επίσης, η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε προκειμένου να καταλήξουμε σε πρόταση για την χρήση, στην καλλιέργεια δύο ποικιλιών καπνού, οργανικής μορφής λίπανσης, όπως η λάσπη του βιολογικού καθαρισμού που χαρακτηρίζεται από υψηλές συσσωρεύσεις βαρέων μετάλλων και οργανικού αζώτου.

Από τη μελέτη μας προέκυψε ότι μεταξύ των δύο εδαφικών pH που χρησιμοποιήθηκαν, το όξινο προκαλεί σημαντικά μεγαλύτερες συσσωρεύσεις Cd και Cu στον καπνό, οπότε θα μπορούσαμε να προτείνουμε την επιλογή του αλκαλικού. Στην περίπτωση του αλκαλικού εδάφους όμως, αυξάνονται τα επίπεδα της νικοτίνης και του Pb και μειώνονται οι συγκεντρώσεις Zn.

Εφόσον οι συγκεντρώσεις των Cd και Zn δε μεταβάλλονται σε τιμές $pH > 6,0$, μπορούμε να προτείνουμε την διατήρηση της εδαφικής οξύτητας στα επίπεδα εκείνα που ελαχιστοποιούν την συγκέντρωση της νικοτίνης.

Κάτω από την ίδια προϋπόθεση και εφόσον η χρονική μεταβολή των μετάλλων δεν επηρεάζεται από τις καλλιεργητικές συνθήκες (pH και είδος υποστρώματος), θα μπορούσαμε να προτείνουμε την επιλογή των νεώτερων φύλλων στην μία ποικιλία (Ποικιλία I) και των γηραιότερων φύλλων στην δεύτερη (Ποικιλία II) που παρουσιάζουν τις μικρότερες συγκεντρώσεις καρκινογόνων μετάλλων, με την μικρότερη δυνατή επιβάρυνση σε νιτρικά και νικοτίνη.

Εκτός από τις καλλιεργητικές συνθήκες, στην εφαρμογή των παραπάνω προτάσεων σοβαρά υπόψη θα πρέπει να ληφθούν και οι γονοτυπικές διαφορές που προσδιορίζουν σημαντικά την συμπεριφορά της κάθε ποικιλίας.



Έτσι, με εξαίρεση την περιεκτικότητα νικοτίνης, η δεύτερη ποικιλία παρουσιάζει συνολικά μικρότερη επιβάρυνση στους περισσότερους επιβλαβείς παράγοντες (Cd, Cu και νιτρικά), χωρίς να διαφέρει σημαντικά σε συγκεντρώσεις Cr.

Η σχέση νικοτίνης-βαρέων μετάλλων στις δύο ποικιλίες ερευνήθηκε επίσης με πολλαπλή παλίνδρομη ανάλυση από την οποία φαίνεται τελικά ότι στην ποικιλία I σημαντικότερος παράγοντας πρόβλεψης των επιπέδων της νικοτίνης είναι το Cd για pH 5,5 και 7,4 (beta : -1,13 και -1,17 αντίστοιχα) ενώ στην ποικιλία II είναι ο Cu για pH 5,5 (beta:-0,78) και το Cr για pH 7,4 (beta: 0,75).

Συνεπώς, οι γενετικοί χαρακτήρες είναι δυνατόν να ερμηνεύσουν τον διαφορετικό ρόλο των παραπάνω μετάλλων στα επίπεδα νικοτίνης των δύο ποικυλίων καπνού.

Όσον αφορά την εφαρμογή λάσπης βιολογικού καθαρισμού στην καλλιέργεια των δύο ποικυλίων, διαπιστώνεται ότι συγκριτικά με την ανόργανη λίπανση, όταν το εδαφικό pH διατηρείται στα επίπεδα που προαναφέρθηκαν (ελαφρά όξινο) δεν παρατηρείται σημαντική επιβάρυνση σε επιβλαβείς παράγοντες, με επιφύλαξη για το Cr. Οι προτεινόμενες αναλογίες λάσπης θεωρούμε ότι θα πρέπει να είναι 40% κατά την καλλιέργεια της ποικιλίας I και 20% κατά την καλλιέργεια της ποικιλίας II, όπου συγκριτικά με την ανόργανη λίπανση, δεν παρατηρείται αύξηση σε καρκινογόνα μέταλλα και ταυτόχρονα επιτυγχάνεται μεγιστοποίηση στα επίπεδα του Zn. Επίσης, στις παραπάνω αναλογίες λάσπης, παρόλη την οριακή (ποικιλία II) ή σημαντική (ποικιλία I) επιβάρυνση σε νικοτίνη υπάρχει και το επιπλέον πλεονέκτημα της αποφυγής συσσώρευσης νιτρικών που είναι σημαντικά υψηλότερα (τουλάχιστον στην ποικιλία I) κατά την εφαρμογή της ανόργανης λίπανσης.



5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Η συγκέντρωση των μετάλλων στον καπνό εξαρτάται από το pH του υποστρώματος.

Σε αλκαλικό pH υποστρώματος, τα φυτά εμφάνισαν χαμηλές συγκεντρώσεις μετάλλων, εκτός από Pb, πιθανότατα διότι η πρόσληψή του μειώνεται σε συνθήκες με αυξημένα οξειδωτικά χαρακτηριστικά (π.χ. ξηρασία) πιθανόν λόγω μειωμένης διαλυτότητας των σχηματιζόμενων αλάτων του.

2. Η συγκέντρωση της νικοτίνης εξαρτάται επίσης από το pH του υποστρώματος. Εμφανίζεται αυξημένη στα φυτά που αναπτύσσονται σε υποστρώματα με αλκαλικό pH, ενώ τα νιτρικά δεν επηρεάζονται ιδιαίτερα από την οξύτητα του εδάφους. Μία ερμηνεία, κυρίως στην ποικιλία I θα ήταν η βιβλιογραφικά τεκμηριωμένη αύξηση της δράσης της νιτρικής αναγωγής σε αλκαλικό pH, σε σχέση με το ισχυρά όξινο, και συνεπώς η αυξημένη αφομοίωση νιτρικών προς σχηματισμό νικοτίνης.

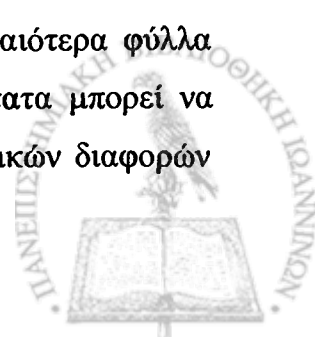
Στην ποικιλία II πιθανότατα ο σχηματισμός νικοτίνης βασίζεται κυρίως στο πρωτεϊνικό άζωτο και όχι στο προερχόμενο από αναγωγή των νιτρικών του εδάφους.

3. Η αναλογία λάσπης 40% στο υπόστρωμα ευνοεί την μείωση των Cr και Cu, δεν επηρεάζει τα Pb και Cd που είναι χαμηλά και συγχρόνως αυξάνει τον Zn.

Πιθανώς λόγω αυξημένης οργανικής ουσίας, μειώνεται η βιοδιαθεσιμότητα των Cr και Cu κυρίως, καθώς και των Pb και Cd λιγότερο, ενώ ευνοείται η μεταφορά του Zn, ο οποίος εμφανίζεται αυξημένος, καθώς υπόκειται και σε ισχυρούς μηχανισμούς εκλεκτικής πρόσληψης ως απαραίτητο ιχνοστοιχείο από το φυτό.

4. Η αναλογία λάσπης 40% στο υπόστρωμα αυξάνει στατιστικά σημαντικά τη νικοτίνη στην ποικιλία I, ενώ στην ποικιλία II η ίδια συγκέντρωση αυξάνει τα νιτρικά χωρίς να επηρεάζει τη νικοτίνη, πιθανότατα λόγω της ήδη διαπιστωθείσας διαφορετικής μεταβολικής οδού βιοσύνθεσης της νικοτίνης στις δύο ποικιλίες.

5. Μέγιστη επιβάρυνση από βαρέα μέταλλα εμφανίζεται στα γηραιότερα φύλλα της ποικιλίας I και στα νεώτερα της ποικιλίας II και πιθανότατα μπορεί να αποδοθεί σε διαφορές κινητικότητας των μετάλλων λόγω γενετικών διαφορών



στις 2 ποικιλίες ως προς την επαγωγή εκλεκτικών φυτοχελασών για τα διάφορα μέταλλα.

6. Μέγιστη επιβάρυνση σε νιτρικά εμφανίζουν τα νεώτερα φύλλα στην ποικιλία I και σε νικοτίνη τα μεσαία. Στην ποικιλία II μέγιστη επιβάρυνση σε νιτρικά εμφανίζουν τα γηραιότερα φύλλα ενώ σε νικοτίνη τα νεώτερα και μεσαία.

Η συγκέντρωση νικοτίνης είναι συνάρτηση των βλαστητικών φάσεων του φυτού και της απομάκρυνσης του άνθους. Στην παρούσα μελέτη και οι 2 ποικιλίες δεν υπέστησαν αφαίρεση του άνθους και γι' αυτό ευνοήθηκε η αύξηση της νικοτίνης στα μεσαία φύλλα. Για τα νιτρικά υπάρχουν ενδείξεις ότι σχετίζονται με τα γενετικά χαρακτηριστικά των ποικιλιών.

7. Οι 2 ποικιλίες εμφάνισαν σημαντικές διαφορές τόσο στην κινητική των μετάλλων όσο και στα επίπεδα των αζωτούχων ενώσεων. Γενικά, η ποικιλία I εμφανίζει υψηλότερες τιμές νιτρικών και μετάλλων από την II, ενώ η τελευταία εμφανίζει υψηλότερες τιμές νικοτίνης. Οι διαφορές αυτές αποδίδονται στο διαφορετικό γενετικό υπόστρωμα το οποίο φαίνεται να παίζει καθοριστικό ρόλο στην φυσιολογία του καπνού και πρέπει να ληφθεί ιδιαίτερα υπόψη στις προτάσεις εφαρμογής των στερεών αποβλήτων.

ΤΕΛΙΚΟ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ – ΠΡΟΤΑΣΗ

Με στόχο: α) την δημιουργία ενός προϊόντος καπνού με τις κατά το δυνατόν λιγότερες επιβλαβείς ουσίες για την υγεία των καπνιστών και β) την καταλληλότερη διαχείριση της λάσπης επεξεργασμένων αστικών λυμάτων, και σύμφωνα με τα αποτελέσματα της διατριβής, θα μπορούσαν να προταθούν οι παρακάτω εφαρμογές στην ανάπτυξη καπνού :

1. διατήρηση pH υποστρώματος σε ελαφρά όξινα επίπεδα (6-7),
2. επιλογή των νεώτερων φύλλων της ποικιλίας I και των γηραιότερων της ποικιλίας II
3. εφαρμογή αναλογιών λάσπης 40% για την ποικιλία I και 20% για την ποικιλία II, ώστε να επιτευχθεί :

- α. μείωση των καρκινογόνων μετάλλων
- β. ελαχιστοποίηση των νιτρικών
- γ. μεγιστοποίηση των επιπέδων Zn
- δ. περιορισμένη επιβάρυνση από νικοτίνη



Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΦΥΤΩΝ ΚΑΠΝΟΥ ΣΤΑ ΕΠΙΚΙΝΔΥΝΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΤΟΥ ΚΑΠΝΙΣΜΑΤΟΣ

**(Αλληλεπιδράσεις βαρέων μετάλλων και επιβλαβών αζωτούχων ενώσεων στο προϊόν
κατανάλωσης ποικιλιών καπνού κατά την πειραματική ανάπτυξή τους σε ιλύ β' βαθμίου
βιολογικού καθαρισμού)**

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα βαρέα μέταλλα που περιέχονται στα τσιγάρα περνούν στο αέριο προϊόν του καπνού, καταλήγοντας σε διάφορα επίπεδα στους ιστούς και τα βιολογικά υγρά των καπνιστών. Στα σημεία και όργανα συσσώρευσης των μετάλλων είναι δυνατόν να προκληθεί καρκινογένεση με άμεσους μηχανισμούς, κυρίως μέσω επαγωγής οξειδωτικής προσβολής του DNA και με έμμεσους μηχανισμούς, κυρίως μέσω αντικατάστασης απαραίτητων ιχνοστοιχείων διαφόρων τύπων ενζύμων, όπως επιδιορθωτικών, αντιοξειδωτικών κ.λ.π.

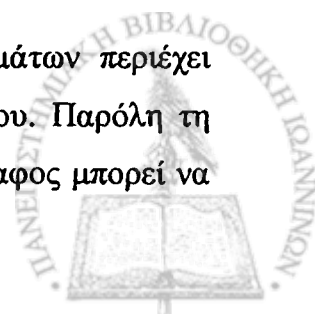
Η αυξημένη συγκέντρωση νικοτίνης και οξειδίων του αζώτου στα τσιγάρα συμβάλλει στην παραγωγή των ειδικών N-Νιτροζαμινών (TSNA) στο αέριο προϊόν του. Η ενζυματική υδροξυλίωση των TSNA έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή ενδιάμεσων προϊόντων που ευθύνονται για μεταλλάξεις αζωτούχων βάσεων της νουκλεοτιδικής αλυσίδας και σχετίζονται με πολλούς τύπους καρκίνου.

Η περιεκτικότητα σε μέταλλα και TSNA του αέριου προϊόντος επηρεάζεται από την σύσταση των τσιγάρων η οποία καθορίζεται από τις γεωργικές πρακτικές και συνθήκες που επικρατούν κατά την καλλιέργεια του φυτού του καπνού.

Η πρόσληψη των μετάλλων, η βιοσύνθεση των αλκαλοειδών και η αφομοίωση των νιτρικών στα φύλλα του καπνού εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως τα χημικά και εδαφολογικά στοιχεία του υποστρώματος ανάπτυξης, ο γονότυπος και το επιλεγόμενο φυτικό τμήμα.

Το στερεό προϊόν των Εγκαταστάσεων Επεξεργασίας Αστικών Λυμάτων (Ε.Ε.Α.Λ) είναι δυνατόν να αποτελέσει υπόστρωμα ανάπτυξης φυτικών ειδών ποικίλης χρήσης από τους καταναλωτές.

Η ιλύς που προέρχεται από μονάδες επεξεργασίας αστικών λυμάτων περιέχει μεγάλες συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων και οργανικής μορφής αζώτου. Παρόλη τη λιπασματική της αξία, η συχνή και παρατεταμένη χρήση της στο ίδιο έδαφος μπορεί να



δημιουργήσει σημαντικά περιβαλλοντικά προβλήματα και, κυρίως λόγω της εναπόθεσης μετάλλων και της ανοργανοποίησης του αζώτου, σοβαρές επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπου.

Η βιοδιαθεσιμότητα εντούτοις, των διαφόρων στοιχείων και η πρόσληψή τους από τα φυτά εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά της λάσπης και την φυσιολογία του κάθε φυτικού είδους.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν 40 νεαρά φυτά καπνού ποικιλίας Τσεμπέλι (Ποικιλία I) και 40 νεαρά φυτά καπνού ποικιλίας Μυρωδάτα (Ποικιλία II) που κατανεμήθηκαν σε 10 διαφορετικές ομάδες υποστρώματος.

Στις 5 ομάδες το αρχικό εδαφικό pH ήταν όξινο ($\text{pH } 1=5,5$) και στις άλλες 5 ομάδες το αρχικό pH ήταν αλκαλικό ($\text{pH } 2=7,4$).

Για κάθε περίπτωση εδαφικού pH, η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σε 5 πειραματικές ομάδες υποστρώματος ως εξής :

- Ομάδα 0% : καλλιέργεια σε έδαφος
- Ομάδα 10% : καλλιέργεια σε έδαφος με 10% λάσπη
- Ομάδα 20% : καλλιέργεια σε έδαφος με 20% λάσπη
- Ομάδα 40% : καλλιέργεια σε έδαφος με 40% λάσπη
- Ομάδα ΑΛ : καλλιέργεια σε έδαφος με ανόργανη λίπανση.

Η συλλογή των φύλλων έγινε σε 4 διαφορετικούς χρόνους ανάλογα με την περίοδο ωρίμανσής τους (χρόνοι 1,2,3 και 4), όπου στον χρόνο 1 αντιστοιχούσαν τα γηραιότερα και στον χρόνο 4 αντιστοιχούσαν τα νεώτερα φύλλα.

Ακολούθησε προσδιορισμός των Cd, Zn, Pb, Cu και Cr με φασματοφωτομετρία ατομικής απορρόφησης Perkin Elmer mod.560, νικοτίνης με φασματοφωτομετρία υπεριώδους, ολικού αζώτου με τη μέθοδο Kjeldahl και νιτρικών με αέρια χρωματογραφία.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΜΕΤΑΛΛΑ

Χρόνοι συλλογής

Και οι δύο ποικιλίες (I, II) εμφάνισαν σημαντικές διαφορές στις συγκεντρώσεις όλων των μετάλλων μεταξύ των διαφόρων χρόνων συλλογής των φύλλων. Μέγιστη επιβάρυνση σε μέταλλα στην ποικιλία I εμφάνισαν τα γηραιότερα φύλλα, ενώ αντίθετα

στην ποικιλία II τα νεώτερα φύλλα έδειξαν να συσσωρεύουν σημαντικά τα μέταλλα, με εξαίρεση τον Cu και Zn.

Υποστρώματα

Και οι δύο ποικιλίες επίσης εμφάνισαν σημαντικές διαφορές στις συγκεντρώσεις των μετάλλων που αναπτύχθηκαν σε διαφορετικά υποστρώματα. Μέγιστη επιβάρυνση σε Cu και Cr εμφανίστηκε στην ομάδα 0% (μόνο έδαφος) ενώ η εφαρμογή λάσπης βιολογικού καθαρισμού μείωσε σημαντικά τις συγκεντρώσεις τους.

Στην ποικιλία I η εφαρμογή λάσπης 40% μείωσε τα επίπεδα Cd ($p=0,000$) και αύξησε τα επίπεδα Zn ($p=0,000$) σε σύγκριση με την ομάδα ανόργανης λίπανσης.

Στην ποικιλία II, υποστρώματα ανάπτυξης με 10% και 20% ιλύ, μείωσαν σημαντικά τον Cu και τον Zn, ενώ υπόστρωμα με 40% ιλύ μείωσε σημαντικά το Cd ($p=0,000$) σε σχέση με την ανόργανη λίπανση.

pH

Το αλκαλικό pH των υποστρωμάτων γενικά και στις δύο ποικιλίες ελαχιστοποίησε το Cd χωρίς να μεταβάλλει το Cr, αύξησε όμως σημαντικά την συσσώρευση του Pb και μείωσε την συγκέντρωση του Zn σε σύγκριση με το όξινο pH.

Η ποικιλία II εμφάνισε γενικά μικρότερη συσσώρευση μετάλλων, κυρίως Cd και Cu, από την ποικιλία I και η διαφορά αυτή διατηρήθηκε τόσο στο αλκαλικό όσο και το όξινο pH.

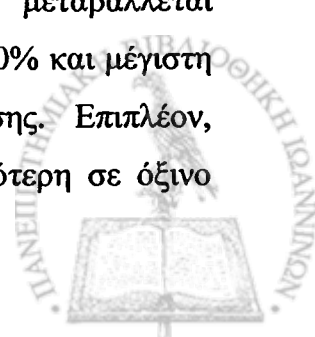
ΑΖΩΤΟΥΧΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

Χρόνοι συλλογής

Και οι δύο ποικιλίες εμφάνισαν σημαντικές διαφορές στα επίπεδα νικοτίνης και νιτρικών μεταξύ των διαφόρων χρόνων συλλογής των φύλλων. Η μέγιστη επιβάρυνση, στην ποικιλία I, σε νιτρικά εμφανίστηκε στα νεώτερα φύλλα και σε νικοτίνη στα μεσαία φύλλα. Η ποικιλία II αντίθετα εμφάνισε μέγιστη επιβάρυνση σε νιτρικά στα γηραιότερα φύλλα, ενώ η νικοτίνη ήταν αυξημένη στα νεώτερα και μεσαία.

Υποστρώματα και pH

Στην ποικιλία I, μεταξύ των διαφορετικών υποστρωμάτων παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στα επίπεδα των νιτρικών ενώ η νικοτίνη δε μεταβάλλεται σημαντικά. Μέγιστη επιβάρυνση σε νικοτίνη παρατηρείται στην ομάδα 40% και μέγιστη συσσώρευση νιτρικών εμφανίζεται στην ομάδα ανόργανης λίπανσης. Επιπλέον, ανεξαρτήτως υποστρώματος, η νικοτίνη εμφανίζεται σημαντικά χαμηλότερη σε όξινο pH ($p=0,000$) σε σχέση με το αλκαλικό.



Στην ποικιλία II, μεταξύ των διαφορετικών υποστρώματων παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στις συγκεντρώσεις νικοτίνης ενώ τα νιτρικά δεν παρουσιάζουν σημαντική μεταβολή. Μέγιστη συσσώρευση νικοτίνης εμφανίζεται στην ομάδα 20%, ενώ μέγιστη επιβάρυνση σε νιτρικά παρατηρείται στην ομάδα με 40% ποσοστό λάσπης. Σε υποστρώματα όξινα η εφαρμογή λάσπης προκάλεσε σημαντική μείωση των νιτρικών σε σχέση με την ανόργανη λίπανση, γενικά δε ανεξαρτήτως υποστρώματος, η νικοτίνη ήταν σημαντικά χαμηλότερη ($p=0,0001$) σε όξινο pH.

Από την συσχέτιση νικοτίνης και βαρέων μετάλλων, με πολλαπλή παλίνδρομη ανάλυση προέκυψε ότι στην ποικιλία I και στα δύο pH, η αυξημένη παρουσία Cd συνεπάγεται μείωση των επιπέδων νικοτίνης ενώ στην ποικιλία II σημαντικότεροι παράγοντες πρόβλεψης των επιπέδων της νικοτίνης είναι ο Cu στο pH 5,5 ($\beta: -0,78$), δηλ. η αυξημένη παρουσία του συνεπάγεται μείωση της νικοτίνης και το Cr για pH 7,4 ($\beta: 0,78$), όπου η αυξημένη παρουσία του συνοδεύεται από αύξηση των επιπέδων νικοτίνης.



VARIOUS BIOLOGICAL TOBACCO GROWING SUBSTRATE EFFECT ON THE NOXIOUS FOR HEALTH PRODUCTS OF SMOKING

**(Heavy metals' and noxious nitrogenous compounds' interaction in the final product of
tobacco varieties during their experimental growing
on biologically treated sewage sludge)**

DIMITRA DOUMA

SUMMARY

INTRODUCTION

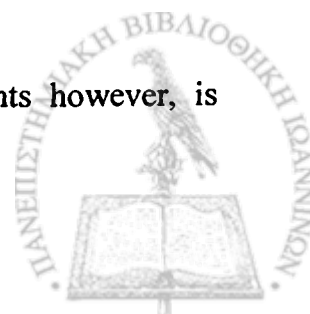
Heavy metals contained in cigarettes, pass to the tobacco smoke, ending up in the tissues and biological fluids of smokers at various concentrations. In the target organs of metal accumulation, carcinogenesis may be induced, either by direct mechanisms, mainly through DNA oxidative insult or by indirect mechanisms such as essential elements' substitution in various enzymes, eg. DNA repairing, antioxidant etc.

The increased concentrations of nicotine and nitrogen oxides in cigarettes contributes into the production of Tobacco-Specific-Nitrosamines (TSNA) in tobacco smoke. TSNA enzymatic hydroxylation produces mutagenic byproducts related to several cancer types.

Heavy metals and TSNA concentration in tobacco smoke is depended on the agricultural practices and conditions predominating during the tobacco plant growth. Substrate chemical and physical characteristics, the genetic features and the selected parts of the plant determine metal uptake, alkaloid biosynthesis and nitrate absorption by tobacco leaves.

The solid product of domestic sewage treatment may be used as growth substrate for several consumable plant species. Sewage sludge presents high levels of heavy metals and organic nitrogen, therefore despite the high fertilizing value its frequent and prolonged use due to heavy metals deposition and organic nitrogen mineralization, may cause severe environmental and health consequences.

Metal and other compounds bioavailability and intake by plants however, is depended on sludge characteristics and plant species physiology.



MATERIAL AND METHODS

In the present thesis 40 seedlings of the Tsebeli variety (variety I) and 40 seedlings of the Mirodata variety (variety II) were separated and transplanted in 10 different groups of substrates. In the first 5 groups, soil pH was acid (pH: 5,5) and in the other 5 groups soil pH was alkaline (pH : 7,4). Cultivation was conducted as follows :

- Group 0% : cultivation in plain soil
- Group 10% : cultivation in soil with 10% sludge
- Group 20% : cultivation in soil with 20% sludge
- Group 40% : cultivation in soil with 40% sludge
- Group IF : cultivation in soil with inorganic fertilizer

Leaf collection took place in 4 different harvesting periods according to their maturity level (times 1,2,3, and 4), where older leaves were corresponding to time 1 and younger leaves were corresponding to time 4.

The concentration of Cd, Zn, Pb, Cu and Cr was determined by means of Atomic Absorption Spectrophotometry (Perkin-Elmer mod.560), of nicotine by means of UV Spectrophotometry, of Total Nitrogen by means of Kjeldahl method and of nitrates by means of gas Chromatography.

RESULTS

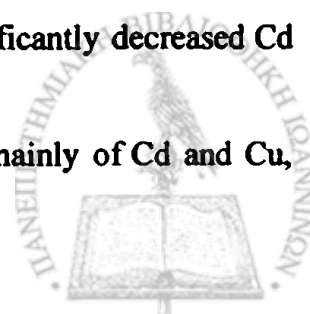
METALS

Variety's I older leaves presented the highest metal aggravation whereas in Variety II younger leaves were significantly metal aggravated, except for Cu and Zn. Sludge application significantly decreased metal accumulation. In variety I sludge application 40% decreased Cd levels ($p=0,000$) and increased Zn ($p=0,000$) compared to inorganic fertilization.

In variety II substrates of 10% and 20% sludge significantly decreased Cu and Zn, while the 40% proportion significantly decreased Cd ($p=0,000$) compared to inorganic fertilization.

Alkaline substrate pH, in general and in both varieties significantly decreased Cd and Zn but increased Pb compared to acidic substrate pH.

Variety II overall, showed decreased metal accumulation, mainly of Cd and Cu, compared to variety I and this difference was sustained in both pH.



NITROGENOUS COMPOUNDS

Nitrates presented the highest concentrations in the younger and middle leaves, whereas the latest showed also the highest nicotine levels in variety I. Contrary wise, in variety II, the older leaves presented the highest nitrate levels, while nicotine was increased in younger and middle leaves.

In variety I, the highest nicotine levels appeared in substrates of 40% sludge and nitrates in inorganically fertilized ones. As an overall, nicotine is significantly decreased in acidic pH ($p=0,000$) compared to alkaline pH.

In variety II, the highest nicotine levels appeared in substrates of 20% sludge and nitrates in substrates of 40% sludge proportion.

Acid substrates in general, produces lower nitrate and nicotine levels ($p=0,0001$).

Nicotine and metal correlation, analyzed by multiple regression analysis, showed that in variety I and in both pHs, increased Cd resulted in nicotine decrease, while in variety II the most important prediction factors of nicotine were Cu for pH 5,5 (beta : - 0,78) and Cr for pH 7,4 (beta : 0,78).

FINAL CONCLUSION-PROPOSITION

The present thesis, aiming: a) the minimization of noxious compounds in the tobacco product b) the optimization of treated sewage-sludge management, and according to our results, concluded that the following measures on tobacco management should be taken in account:

1. Substrate pH upkeeping within slightly acidic levels (6-7),
2. Younger leaves of variety I and older leaves of variety II selective harvesting,
3. 40% sludge proportion for variety I and 20% sludge proportion for variety II application,

in order to succeed:

1. reduction of carcinogenic metals
2. minimization of nitrates
3. maximization of Zn levels
4. limited nicotine aggravation.



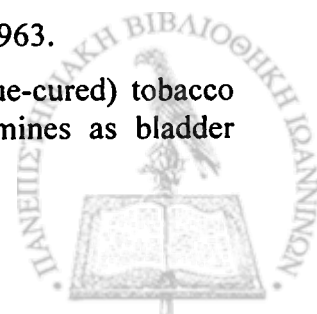
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ελληνικές Βιβλιογραφίες

- Γιαννάκης Δ, Καλφακάκου Β, Γαλάνη Α και συν: Έρευνα της συσχέτισης μεταξύ των επιπέδων ορού βαρέων μετάλλων και των ιστολογικών ευρημάτων ασθενών με καρκίνο της ουροδόχου κύστης. Ελληνική Ουρολογία 1996, 8: 251-256.
- Γιασόγλου Ν, Μουστάκας ΝΚ και Κοσμάς ΚΣ: Διαχείριση παθογενών εδαφών στην καπνοκαλλιέργεια. 1ο Επιστημονικό Συνέδριο για τον καπνό 1994, 79-96.
- Ζαχοκώστας Κ: Καπνά Βιρτζίνια. Γεωρ.Τεχν.Αφ.Λίπ.Θρ.1997, 106-111.
- Καλαϊτζάκης ΙΑ :Υδατάνθρακες και δευτερογενή φυτικά προϊόντα, εκδ.SCRIPTUM 1995, 179-186.
- Καπνολογικό Ινστιτούτο, Στοιχεία του Ινστιτούτου Καπνού Δράμας 2000.
- Καπούλας Β.: Ελεύθερες ρίζες οξυγόνου: Χημεία, Βιοχημεία. Σύγχρονη Ιατρική της Εντατικής Θεραπείας 1999,4: 149-156.
- Καρατάγλης Σ. : Φυσιολογία φυτών, Εκδ. Art of Text, Θεσσαλονίκη 1992.
- Κωσταντή Α.: Τοξικότητα του οξυγόνου. Σύγχρονη Ιατρική της Εντατικής Θεραπείας 1999, 4: 79-88.
- Λέκκα Μ.(α): Προϊόντα οξειδωσης στα βιολογικά συστήματα. Σύγχρονη Ιατρική της Εντατικής Θεραπείας 1999, 4: 157-163.
- Λέκκα Μ.(β): Μεταβολισμός οξυγόνου. Σύγχρονη Ιατρική της Εντατικής Θεραπείας 1999, 4: 165-171.
- Μάνος Γ. : Ειδική Γεωργία ΙΙΙ (Βιομηχανικά φυτά). ΤΕΙ Ηπείρου, Άρτα 1990.
- Μυλωνάς Β.: Επιδράσεις της λίπανσης, της γονιμότητας του εδάφους και της άρδευσης στα Ανατολικά Καπνά. 1ο Επιστ. Συνεδ. για τον καπνό 1994, 97-151.
- Μυλωνάς Β: Επιδράσεις της φωσφορούχου λίπανσης στον καπνό και τη γονιμότητα- παραγωγικότητα του καπνού. Πρακτικά Πανελληνίου Συνεδρίου Γεωργικής Έρευνας, Φυτική Παραγωγή, Θεσ/νίκη 1990, 1:305-321.
- Ντζάνης ΗΔ: Λίπανση του καπνού. Γεωρ.Κτην.1995, 9:118-130.
- Παπαδόπουλος ΓΔ: Εδαφολογία - ΤΕΙ Ηπείρου, Άρτα 1996.
- Παπαδόπουλος ΓΔ, Χουλιάρης Ν και Jacquin F: Αλληλεπίδραση μεταξύ της μικροβιακής δραστηριότητας και της αφομοιωσιμότητας των φυσικών φωσφοριτών στο έδαφος. Γεωργική Έρευνα 1986, 10: 231-241.
- Πιστόλης ΛΤ: Λίπανση των καπνών Βιρτζίνια. Γεωρ.Τεχν.Αφ.Λίπ.Θρ.1994, 139-141.
- Σφήκας ΑΓ.: Διεθνείς τάσεις στη βελτίωση των ποικιλιών καπνού: επιζητούμενα χαρακτηριστικά σε σχέση με τις εξελίξεις της αγοράς. 1ο Επιστ. Συνέδριο για τον Καπνό 1994, 47-62.
- Τσαπικούνης Φ. : Θρέψη - Λίπανση των φυτών. Εκδόσεις Α. Σταμούλης, Αθήνα 1997, 4: 123-131.
- Τσατήρης Β, Κυριακούλας Α, Κουλουμπής Π και συν.: Στοιχεία παραγωγής και σύστασης της υλός αστικών αποβλήτων, δυνατότητες γεωργικής χρησιμοποίησης και σχετικά προβλήματα. 8ο Πανελλήνιο Εδαφολογικό Συνέδριο, Ξάνθη 1994.
- Τσοτσόλης Ν: Λίπανση ανατολικών καπνών και Μπέρλεϋ. Γεωρ.Τεχν.Αφ.Λίπ.Θρ.1994, 135-138.

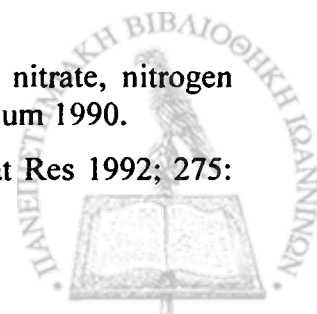
Ξένες Βιβλιογραφίες

- Adamu CA, Bell PF and Mulchi C: Residual metal concentrations in soils and leaf accumulations in tobacco a decade following farmland application of municipal sludge. *Environ Pollution* 1989; 56: 113-126.
- Adamu-Agho C, Bell PF, Mulchi C: The role of soil extractants and soil characteristics in assessing the availability of heavy metals in Maryland soils for the growth of tobacco. University of Maryland, Diss Abst Intern 1987; 48/08-B: 2147.
- Ahmad S et al.: Determination of toxic elements in tobacco products by instrumental neutron activation analysis. *J Radioanalyt Nuclear Chem* 1979; 54: 331-341.
- Akehurst BC: Tobacco, Tropical Agriculture Series. 2nd edition, Longman, N York 1981.
- Amin S, Desao D, Hecht SS, Hoffmann D: Synthesis of tobacco-specific N-nitrosamines and their metabolites and results of related bioassays. *Crit Rev Toxicol* 1996; 26(2): 139-147.
- Angerer P et al.: Cadmium concentrations in human tissues taken during operation. *Zentralblatt Bakteriell Mikrobiol Hygiene (B)* 1988; 187: 19-30.
- Ariza ME, Williams MV: Lead and mercury mutagenesis: type of mutation dependent upon metal concentration. *J Biochem Mol Toxicol* 1999; 13(2): 107-112.
- Arrick BA, Nathan CF, Griffith OW and Cohn ZA: Glutathione depletion sensitizes tumor cells to oxidative cytolysis. *J Biol Chem* 1982; 257: 1231-1237.
- Arrick BA and Nathan CF: Glutathione metabolism as a determinant of therapeutic efficacy: A review. *Cancer Res* 1984; 44: 4225-4232.
- Arsenjan E, Paskaleva-Tomora K and Staler S: Contribution à l'étude des processus d'oxydation lors de la fermentation des tabacs orientaux. *Proc 4th Int Tob Sci Cong*, Athens 1966; 794-799.
- Arsenjan E and Gruselev L: Nature et problèmes de la fermentation des tabacs orientaux. *Proc 4th Int Tob Sci Cong*, Hamburg 1970; 210-211.
- Arsenjan E.: Situation and problems of oriental tobacco fermentation. *Bulgar Tob* 1977; 8: 102-107.
- Bache CA, Lisk DJ, Dass GJ et al: Cadmium and nickel in mainstream particulates of cigarettes containing tobacco grown on a low-cadmium soil-sludge mixture. *J Toxicol Environ Health* 1985; 16: 547-552.
- Bacon C, Leighty WR and Bullock JF: Boron, copper, manganese and zinc requirement tests of tobacco. *Tech Bul US Dep Agric* 1950; 1009.
- Bacon CW, Wenger R and Bullock JF: Chemical changes in tobacco during flue-curing. *Ind Engng Chem Ind Edn* 1952; 44: 292-296.
- Baker AJM, Ewartz K, Hendry GAF et al.: The evolutionary basis of cadmium tolerance in higher plants. 4th Intern Confer Heavy Metals in the Environment, Barcelona 1990; 160-167.
- Baldwin E: Dynamic aspects of biochemistry, Cambridge University Press, 1963.
- Bartch H, Malaveile C, Friesen M et al.: Black (air-cured) and blond (flue-cured) tobacco cancer risk IV: molecular dosimetry studies implicate aromatic amines as bladder carcinogens. *Eur J Cancer* 1993; 29A(8): 1199-1207.



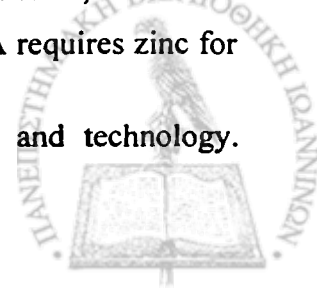
- Baskaran K, Laconi S and Reddy MK: Transformation of hamster pancreatic duct cells by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK), in vitro. *Carcinogenesis* 1994; 15(11): 2461-2466.
- Bell PF and Mulchi CL: Residual effects of land applied municipal sludge on tobacco II: Agronomic, chemical and physical properties. *Tob Sci* 1988; 32: 44-48.
- Bell RW, Edwards DG and Ashner CJ: Effects of Ca supply on uptake of Ca and selected mineral nutrients by tropical food legumes in solution culture. *Aust J Agric Res* 1989; 40: 1003-1013.
- Berg JM.: Potential metal-binding domains in nucleic acid binding proteins. *Science* 1986; 232: 485-487.
- Bergelson S, Pinkus R and Daniel V (a): Intracellular glutathione levels regulated Fos/Jun induction and activation of glutathione S-transferase gene expression. *Cancer Res* 1994; 54: 36-40.
- Bergelson S, Pinkus R and Daniel V (β): Induction of AP-1 (Fos/Jun) by chemical agents mediates activation of glutathione S-transferase and quinone reductase gene expression. *Oncogene* 1994; 9: 565-571.
- Beyersmann D: Interactions in metal carcinogenicity. *Toxicol Lett* 1994; 72(1-3): 333-338.
- Blanusa M et al.: Interaction of cadmium, zinc and copper in relation to smoking habit, age and histopathological findings in human kidney cortex. *Arch Toxicol* 1985; 58: 115-117.
- Borello S, De Leo ME, Galeotti T: Defective gene expression of MnSOD in cancer cells. *Mol Asp Med* 1993; 14(3): 253-258.
- Borm PJ, Driscoll K: Particles, inflammation and respiratory tract carcinogenesis. *Toxic Lett* 1996; 88:109-113.
- Bose RN, Moghaddas S, Mazzer PA et al.: Oxidative damage of DNA by chromium (V) complexes: relative importance of base versus sugar oxidation. *Nucleic Acids Res* 1999; 15, 27(10): 2219-2226.
- Bowen HJM: Environmental chemistry of the elements. Academic Press 1979.
- Boyland E, Roe FJC and Gorrod JW: Induction of pulmonary tumors in mice by nitrosonornicotine, a possible constituent of tobacco smoke. *Nature* 1964; 202: 1126.
- Brunnemann KD, Prokopczyk B, Djordjevic MV and Hoffmann D (a): Formation and analysis of tobacco-specific N-nitrosamines. *Crit Rev Toxicology* 1996; 26(2): 121-137.
- Brunnemann KD, Mitacek EJ, Liu Y et al (b): Assessment of major carcinogenic tobacco-specific N-nitrosamines in Thai cigarettes. *Cancer Detect Prev* 1996; 20(2): 114-121.
- Bruwaene RV, Kirchmann R and Impens R: Cadmium contamination in agriculture and zoo-technology. *Experientia* 1984; 40: 43-52.
- Burton HR, Dye NK and Bush LP: Distribution of tobacco constituents in tobacco leaf tissue I. Tobacco-specific nitrosamines, nitrate, nitrite and alkaloids. *J Agric Food Chem* 1992; 40: 1050-1055.
- Bush LP and Saunders JL: Accumulation manipulation and regulation of nicotine content in tobacco. *Proc Amer Chem Soc Symposium* 1977; 173: 389-423.
- Butorac A et al.: Influence of biopost and organo upon flue-cured tobacco grown on semigley II. Chemical composition of tobacco leaf and changes in the chemical soil complex. *J Agronomy & Crop Sci* 1995; 175: 307-316.
- Calsou P, Frit P, Bozzato C, Salles B: Negative interference of metal (II) ions with nucleotide excision repair in human cell-free extracts. *Carcinogenesis* 1996; 17(12): 2779-2782.

- Carmella S, Akerkar S and Hecht SS: Metabolites of the tobacco-specific nitrosamine NNK in smokers' urine. *Cancer Res.* 1993; 53: 721-724.
- Casadevall M, da Cruz Fresco P, Kortenkamp A: Chromium (VI)-mediated DNA damage: oxidative pathways resulting in the formation of DNA breaks and abasic sites. *Chem Biol Inter* 1999; 123(2): 117-132.
- Casalino E, Sblano C, Landriscina C: Enzyme activity alteration by cadmium administration to rats: the possibility of iron involvement in lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 1997; 15,346(2): 171-179.
- Cerutti P.: Prooxidant states and tumor promotion. *Science* 1985; 227: 375-381.
- Chen H, Cook LS, Li XY et al: CYP2D6 genotype and the incidence of anal and vulvar cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkes Prev* 1999; 8(4 pt 1): 317-321.
- Chen YP, Johnson GK and Sqmier CA: Effects of nicotine and tobacco-specific nitrosamines on hamster cheek pouch and gastric mucosa. *J Oral Pathol Med* 1994; 23(6): 251-255.
- Chiba M and Masironi R: Toxic and trace elements in tobacco and tobacco smoke. *Bulletin of the World Health Organization* 1992; 70(2): 269-275.
- Chiocca SM, Sterner PA, Biggart NW et al.: Nickel mutagenesis: alteration of the MuSVts 110 thermosensitive splicing phenotype by a nickel-induced duplication of the 3' splice site. *Mol Carcinogen* 1991; 4: 61-71.
- Clarke BB and Brennan E: Accumulation and distribution of cadmium in tobacco plant and its significance. *Phytopathology* 1981;71:209.
- Clarke BB and Brennan E: Differential cadmium accumulation and phytotoxicity in sixteen tobacco cultivars. *JAPCA* 1989; 39: 1319-1322
- Clarke BB and Brennan E: Tobacco leaves accumulate cadmium from root applications of the heavy metal. *Tobacco Science* 1983; 27: 28-29.
- Cole JS: Powdery mildew of tobacco (*Erysiphe cichoracearum* DC) .III. Further studies of the effects of potassium deficiency on susceptibility, free amino nitrogen and carbohydrate content of leaves. *Ann Appl Biol* 1966; 57: 201-209.
- Costa M.: Molecular mechanisms of nickel carcinogenesis. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1991; 31: 321-327.
- Crockford RH: Effect of amount and time of application of nitrogen on the nicotine content of tobacco leaves. *Aust J Exp Agric Anim Husb* 1977; 17: 469-474.
- Cuenoud B, Szostak JW: A DNA metalloenzyme with DNA ligase activity. *Nature* 1995; 375(6532): 611-614.
- Datta AK, North SL, Kasprzak KS: Effects of chelators on the oxidation of guanine moiety in 2'-deoxyguanosine and DNA in the presence of Cu (II), Co (II), Fe (III) and Cr (III). *Toxicologist* 1994; 14: 261.
- Davis RD.: Cadmium-a complex environmental problem(Part II)-Cadmium in sludges used as fertilizer.*Experienta* 1984;40:117-234.
- Dawson RF and Osdene TS: A speculative view of tobacco alkaloid biosynthesis. *Recent Ad Phytochem* 1972; 5: 317-338.
- Divanidis SG, Halivopoulos SI and Tsakmaki VD: Relationship between nitrate, nitrogen oxide, carbon oxid and nitrosamines in greek tobacco. *Coresta Symposium* 1990.
- Dizdaroglu M: Oxidative damages to DNA in mammalian chromatin. *Mutat Res* 1992; 275: 331-342.

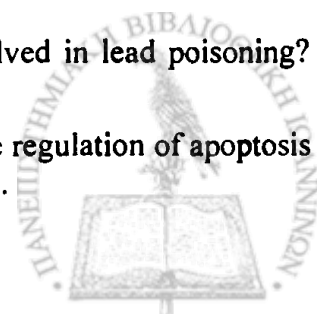


- Douma D. et al : Cadmium and nicotine interrelations in tobacco plants grown on sewage sludge 1st North-African and Middle Eastern Symposium on Environmental and Sanitary Analytical Chemistry, Hammamet (Tunisia) 1999 ; 122
- Douma D et al : Cadmium and nicotine correlation in reference to tobacco plant varieties and to sludge/soil applied ratios. Intern. Confer. on New Horizons in Biotechnology, Trivandrum (India) 2001; 161.
- Donmez H, Dursun N, Ozkul Y and Demirtas H: Increased sister chromatic exchanges in workers exposed to occupational lead and zinc. Biol Trace Elem Res 1998; 61: 105-109.
- Dovinona I, Vachalkova A and Novotny L: Potential carcinogenicity of some transition metal ions. Biol Trace Elem Research 1999; 67: 63-73.
- Dowdy RH, Clapp CE, Linden DR et al.: The progressive influence of 17 years of annual sewage sludge applications on trace metal accumulation by maize. 8th Intern Confer Heavy metals in the Environment, Edinburgh 1991; 1: 379-382.
- Druckey H, Prenssmann R, Ivankovic S and Schmahl D: Organotrope carcinogene Wirkungen bei 65 vershieden N-Nitroso-Verbindungen and BD-Ratten. Z Krebsforsch 1967; 69: 103-201.
- Edwards K, Braun KM, Evans G, Sureka AO: Mainstream and sidestream cigarette smoke condensates suppress macrophage responsiveness to interferon gamma. Human Exp Toxicol 1999; 18(4): 233-240.
- El-Bayoumy K, Iatropoulos M, Amin S et al: Increased expression of cyclooxygenase-2 in rat lung tumors induced by the tobacco specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone: the impact of a high-fat diet. Cancer Res 1999; 59(7): 1400-1403.
- Elliot JM: Chemical composition of various parts of flue-cured tobacco plants. Lighter 1967; 37(4): 15-18.
- Elsokkary IH and Hassan NA: The inhibition of wheat and faba bean nitrate reductase enzyme by cadmium in relation to pH, P and N in the growth medium. 8th Inter Confer Heavy Metals in the Environment, Edinburgh 1991; 1: 161-168.
- Fergusson JE.: The heavy elements: chemistry, environmental impact and health effects. Pergamon Press, 1990.
- Ferraroni M, Rypniewski W, Wilson KS et al.: The crystal structure of the monomeric human SOD mutant F50E/G51E/E133Q at atomic resolution. The enzyme mechanism revisited. J Mol Biol 1999; 7,288(3): 413-426.
- Fischer S, Spiegelhalder B and Preussmann R: Tobacco-specific nitrosamines in European and USA cigarettes. Arch Geschwulstforsch 1990; 60: 169-177.
- Filiadis IF, Georgiou I, Alamanos Y et al: Genotypes of N-acetyltransferase-2 and risk of bladder cancer: a case control study. J Urology 1999; 161: 1672-1675.
- Foiles PG et al.: Mass spectrometric analysis of TSNA-DNA adducts in smokers and non-smokers. Chem Res Toxicol 1991; 4: 364-368.
- Frank F, Braun HE, Holdrinet M and Stonetield KI: Metal contents and insecticide residues in tobacco soils and cured tobacco leaves collected in Ontario. Tob Sci 1977; 21: 74-80.
- Frankenburg WG: Chemical changes in the harvested tobacco leaf. Part I. Chemical and enzymic conversion during the curing process. In: Advances in Enzymology . Interscience, NY 1946; 6: 309-387.
- Frenkel K, Blum F, Troll W: Copper ions and hydrogen peroxide form hypochloride from NaCl thereby mimicking myeloperoxidase. J Cell Bioch 1986; 30: 181-193.

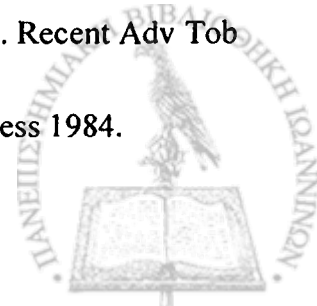
- Fridovich I.: Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 1995; 64: 97.
- Furukawa F, Nishikawa A, Enami T et al: Promotional effects of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL) on N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine (BOP)-initiated carcinogenesis in hamsters. *Food Chem Toxicol* 1997; 35(3-4): 387-392.
- Garner WW Bacpm CW, Bowling Jr JD et a;: The nitrogen nutrition of tobacco. *Tech Bull US Dep Agric* 1934; 414 (tobacco).
- Gerde P, Muggenburg BA, Stephens T et al.: A relevant dose of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone is extensively metabolized and rapidly absorbed in the canine tracheal mucosa. *Cancer Res* 1998; 58(7): 1417-1422.
- Gerstel DU: Essay on the origin of tobacco. *Tob Sci* 1961;5:15-17
- Gigliotti G, Giusquiani PL and Businelli D: Fate in soil and crops of heavy metals from sewage-sludge. *Ann Della Fac di Agrar Univ Degli Stud di Perug* 1993; 14(1): 563-575.
- Gocze PM, Porpacz Z and Freeman DA: Effect of alkaloids in cigarette smoke on human granulosa cell progesterone synthesis and cell viability. *Gynecol Endocrinol* 1996; 10(4): 223-228.
- Gong Q, Hart BA: Effects of thiols on cadmium-induced expression of metallothionein and other oxidant stress genes in rat lung epithelial cells. *Toxicology* 1997; 119: 179-191.
- Green CR: Some relationships between tobacco leaf and smoke composition. *Proc Amer Chem Soc Symposium* 1977; 173: 426-470.
- Griest WH and Guerin MR: Influence of tobacco type on smoke composition. *Proc Amer Chem Soc Symposium* 1977; 173: 122-144.
- Gupta P, Kar A: Cadmium induced thyroid dysfunction in chicken: hepatic type I iodothyronine 5'-monodeiodinase activity and role of lipid peroxidation. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 1999; 123(1): 39-44.
- Guengerich FP, Shimada T, Yun CH et al: Interactions of ingested food beverage and tobacco components involving human cytochrome, p4501A2, 2A6, 2E1 and 3A4 enzymes. *Environ Heath Perspect* 1994; 102(Suppl 9): 49-53.
- Gurer H, Ozgunes H, Neal R et al.: Antioxidant effects of N-acetylcysteine and succimer in red blood cells from lead-exposed rats. *Toxicology* 1998; 128: 181-189.
- Gutenmann WH et al.: Cadmium and nickel in smoke of cigarettes prepared from tobacco cultured on municipal sludge-amended soil. *J Tox Environ Health* 1982; 10: 423-431.
- Hall LW: Effects and mode of alkaloid control in four genotypes of *Nicotiana tabaccum*. MS thesis Univ Kentucky 1975.
- Halley DE and Reid JJ: The bearing of potassium on the quality of tobacco. *Soil Sci* 1943; 55: 79-85.
- Hamilton JW, Kaltreider RC, Bajenova OV et al: Molecular basis for effects of carcinogenic heavy metals on inducible gene expression. *Environ Health Perspect* 1998; 4: 1005-1015.
- Hamilton-Koch W, Shuder RD, Lavelle JM: Metal-induced DNA damage and repair in human diploid fibroblasts and Chinese hamster ovary cells. *Chem Biol Interact* 1986; 59: 17-28.
- Hanas JS, Hazuda DJ, Bogenhagen DF et al.: Xenopus transcription factor A requires zinc for binding to the 5S RNA gene. *J Biol Chem* 1983; 258: 14120-14125.
- Harlan WR and Moseley JM: Tobacco. In: *Encyclopedia of chemistry and technology*. Interscience, New York 1955; 242-261.



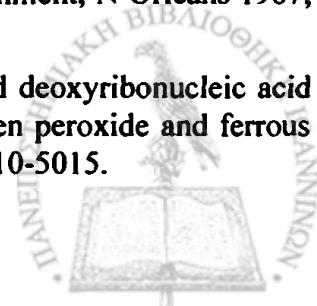
- Hartwig A, Klyszcz-Naslp H, Schlepperegell R et al: Cellular damage by ferric nitrilotracetate and ferric citrate in V79 cells: interrelationship between lipid peroxidation, DNA strand breaks and sister chromatic exchanges. *Carcinogenesis* 1993; 14: 107-112.
- Hartwig A et al.: Comutagenicity and inhibition of DNA repair by metal ions in mammalian cells. *Biol Trace Elem Res* 1989; 21: 359-365.
- Hartwig A, Schlepperegell R, Beyersmann D: Indirect mechanism of lead-induced genotoxicity in cultured mammalian cells. *Mutat Res* 1990; 241(1): 75-82.
- Hartwig A, Snyder RD, Schepperegell R et a. Modulation by Co (II) of UV-induced DNA repair, mutagenesis and sister-chromatid exchanges in mammalian cells. *Mut Res* 1991; 248: 177-185.
- Hartwig A, Beyersmann D: Carcinogenicity of metal compounds: possible role of DNA repair inhibition. *Toxicol Lett* 1998; 28,102-103: 235-239.
- Hartwig A.: Current aspects in metal genotoxicity. *Biometals* 1995; 8(1): 3-11.
- Hartwig A.: Role of DNA repair inhibition in lead - and cadmium-induced genotoxicity: a review. *Environ Health Perspect* 1994; 3: 45-50.
- Haustein KO: Smoking, cardiovascular diseases and possibilities for tolerating nicotine dependence. *Wien Med Wochenshr* 1999; 149(1): 19-24.
- Hecht SS (a): DNA adduct formation from tobacco-specific N-nitrosamines. *Mutat Res* 1999; 24(1-2): 127-142.
- Hecht SS (b): Tobacco smoke carcinogenesis and lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91(14): 1194-1210.
- Hecht SS, Carmella SG and Murphy SE (a): Hemoglobin adducts as biomarkers of exposure to and metabolic activation of carcinogenic tobacco-specific nitrosamines. *Biomed Environ Sci* 1991; 4: 93-103.
- Hecht SS and Hoffmann D (b): 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, a nicotine derived tobacco-specific nitrosamine, and cancer of the lung and pancreas in humans. In: *Origin of Human Cancer. A comprehensive review*. N.Y. Gold Spring Harbor Laboratory Press. 1991; 745-755.
- Hecht SS, Trushin N, Casontonguay A and Rivenson A: A comparative tumorigenicity and DNA methylation in F344 rats by NNK and N-nitrosodimethylamine. *Cancer Res* 1986; 46: 498-502.
- Hecht SS, Chen CB, Ornaaf RM and Hoffmann D: Chemical studies on tobacco smoke .LVI. Tobacco-specific nitrosamines: Origins, carcinogenicity, and metabolism. *IARC Sci Publ* 1978; 19: 395-413.
- Hecht SS and Hoffmann D: The relevance of TSNA to human cancer. *Cancer Surv* 1989; 8: 273-294.
- Hecht SS, Schmeltz I and Hoffmann D: Nitrogenous compounds in cigarette smoke and their possible precursors. *Recent Adv Tob Sci* 1977; 3: 60-92.
- Hecht SS.: Approaches to cancer prevention based on an understanding on N-nitrosamine carcinogenesis. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997; 217(2): 181-191.
- Hermes-Lima M, Pereira B, Bechara EJ et al: Are free radicals involved in lead poisoning? *Xenobiotica* 1991; 21(8): 1085-1090.
- Heusch WL and Maneckjel R: Signaling pathways involved in nicotine regulation of apoptosis of human lung cancer cells. *Carcinogenesis* 1998; 19(4): 551-556.



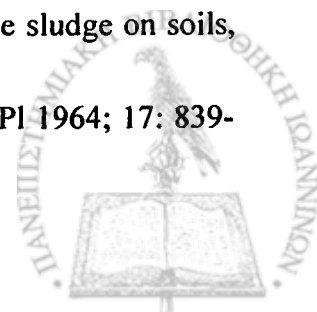
- Higinbotham KG, Rice JM, Diwan BA et al: GGT to GTT transversions in codon 12 of the K-ras oncogene in rat renal sarcomas induced with nickel subsulfide or nickel subsulfide/iron are consistent with oxidative damage to DNA. *Cancer Res* 1992; 52: 4747-4751.
- Hoffmann D, Hoffmann I (a): The changing cigarette 1950-1990. *J Toxicol Environ Health* 1997; 50(4): 307-364.
- Hoffmann D, Djordjevic MV and Hoffmann I (b): The changing cigarette. *Prev Med* 1997; 26(4): 427-434.
- Hoffmann D and Hecht SS: Advances in tobacco carcinogenesis. In: *Handbook of Experimental Pharmacology*. New York Springer 1990; 94: 63-102.
- Hoffmann D, Rivenson A, Chung FL and Hecht SS: Nicotine-derived N-nitrosamines (TSNA) and their relevance in tobacco carcinogenesis. *CRC Crit Rev Toxicol* 1991; 21: 305-311.
- Hoffmann D, and Hecht SS: Nicotine-derived N-Nitrosamines and tobacco-related cancer : current status and future directions. *Cancer Research* 1985; 45: 935-944.
- Hoffmann D, Brunnemann KD, Prokopczyk B and Djordjevic MV: Tobacco-specific N-Nitrosamines and Areca-Derived N-Nitrosamines: chemistry, biochemistry, carcinogenicity and relevance to humans. *J of Toxicol and Environ Health* 1994; 41: 1-52.
- Hosfield DJ, Guan Y, Haas BJ et al: Structure of the DNA repair enzyme endonuclease IV and its DNA complex: double-nucleotide flipping at abasic sites and three-metal-ion-catalysis. *Cell* 1999; 98(3): 397-408.
- Ilyin GS and Lovkova MY: Participation of nicotine in the nitrogen metabolism of *Nicotiana tabaccum L.* *Biochimiya* 1966; 31: 174-181.
- Iskander FY et al.: Determination of 28 elements in American cigarette tobacco by neutron-activation analysis. *Analyst* 1986; 111: 107-109.
- Izzotti A, Bagnasco M, Cocmoirano A et al: DNA fragmentation, DNA-protein crosslinks, postlabeled nucleotidic modifications and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in the lung but not in the liver of rats receiving intratracheal instillation of chromium (VI). Chemoprevention by oral N-acetylcystein. *Mut Res* 1998; 25,400(1-2): 233-244.
- Izzotti A, Bagnasco M, D'Agostini F et al: Formation and persistence of nucleodite alterations in rats exposed whole-body to environmental cigarette smoke. *Carcinogenesis* 1999; 20(8): 1499-1506.
- Jackson JH, Gajewski E, Schraufstatter I et al: Damage to the bases in DNA induced by stimulated human neutrophils. *J Clin Invest* 1989; 84: 1644-1649.
- Jastow JD and Koeppe DE: Uptake and effects of cadmium in higher plants. In: *Cadmium in the environment. Part 1. Ecological Cycling*, Wiley 1980; 607-638.
- Jedrychowski W, Flak E and Mroz E: The adverse effect of low levels of ambient air pollutants on lung function growth in preadolescent children. *Environ Health Perspect* 1999; 107(8): 669-674.
- Jing J and Logan TJ: Heavy metals in the environment. *J Environ Qual* 1992; 21: 73-81.
- Johnson WR.: The pyrogenesis and physiochemical nature of tobacco smoke. *Recent Adv Tob Sci* 1977; 3: 1-27.
- Kabata-Pendias A and Pendias H: Trace elements in soils and plants. CRC Press 1984.



- Kallistratos G, Fasske E, Seferiades K et al.: Benzo(a)pyrene, nitrosamines, arsenic and selluium, factors influencing the tobacco carcinogenesis (with special reference to the Greek tobacco types). *J Med Sci* 1983; 1: 49-55.
- Karlson P: Βιοχημεία. Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσα.1984.
- Kasai Z and Konishi S: The behaviour of Ca in the mature and death process of tobacco plant, *Kyoto Univ Mem Res Inst Fd Sci* 1960; 20: 14-21.
- Kasprzak KS.: Possible role of oxidative damage in metal-induced carcinogenesis. *Cancer Investigation* 1995; 13(4): 411-430.
- Kato S, Bowman ED, Harrington AM, Blomeke B and Shields PG: Human lung carcinogen-DNA adduct levels mediated by genetic polymorphisms in vitro. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87(12): 902-907.
- Kawanishi S, Inoue S, Yamamoto K: Hydroxyl radical and single oxygen production and DNA damage induced by carcinogenic metal compounds and hydrogen peroxide. *Biol Trace Elem Res* 1989; 21: 367-372.
- Kawano R, Takashima Y, Inai K: Effects of K-ras mutations in the development of lung lessions induced by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in A/J mice. *Cancer Res* 1996; 87(1): 44-50.
- Kazantzis G.: Evaluation of the evidence for lead carcinogenicity. *Trace Substances* 1988; 63-79.
- Kensler TW, Trush MA and Guyton KZ: Free radicals as targets for cancer chemoprevention: prospects and problems. *Ann Arbor, MI: CRC Press* 1992.
- King LD and Hajjar LM: The residual effects of sewage sludge on heavy metal content of tobacco and peanut. *J Envir Qual* 1990,19(4):738-748.
- Kloke A, Samerbeck DR and Vetter H: The contamination of plants and soils with heavy metals and the transport of metals in terrestrial food chains. In: *Changing metal cycles and human health Dahlem Konferenzen* 1984; 113-141.
- Koeppel DE: Lead understanding the minimal toxicity of lead in plants. In: *Effect of heavy metal pollution on plants. Effects of trace metals on plant function. Applied science publishers* 1981; 1: 55-76.
- Krasnegor NA: Cigarette smoking as a dependence process. *Natl Inst Drug abuse Res Monogr Ser* 1979,23:614-616.
- Le Marchand L, Sivarman L, Perce L et al: Associations of CYP1A1, GSTM1 and CYP2E1 polymorphisms with lung cancer suggest cell type specialities to tobacco carcinogenesis. *Cancer Res* 1998; 58(21): 4858-4863.
- Lee-Chen SF, Yu CT, Jan KY: Effects of arsenite on the DNA repair of UV-irradiated chinese hamster ovary cells. *Mutagenesis* 1991; 7: 51-55.
- Leete E.: Biosynthesis and metabolism of the tobacco alkaloids. *Proc Amer Chem Soc Symposium* 1977; 173: 365-388.
- Legret M, Divet L and Juste C: Mobility and bio-availability of heavy metals in sewage sludge-treated soils. 6th Inter Confer Heavy Metals in the Environment, N Orleans 1987; 442-444.
- Lesko SA, Drocourt JL, Yang SU: Deoxyribonucleic acid-protein and deoxyribonucleic acid interstrand cross-links induced in isolated chromatin by hydrogen peroxide and ferrous ethylenediaminetetraacetate chelates. *Biochemistry* 1982; 21: 5010-5015.

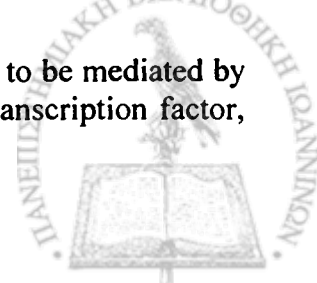


- Levin JD, Shapiro R, Demple B: Metalloenzymes in DNA repair. *Escherichia coli* endonuclease IV and *Saccharomyces cerevisiae* Apr 1. J Biol Chem 1991; 5,266(34): 22893-22898.
- Li Y, Wang H-X, Wu Y-S: Effects of cadmium and iron on the some physiological indicators in leaves of tobacco. *Acta Ecologica Sinica* 1992; 12(2): 147-153.
- Liginsky W.: Chemistry and biology of N-nitrosocompounds. Cambridge: Cambridge University Press 1992.
- Liu S, Medvedovic M, Dixon K: Mutational specificity in a shuttle vector replicating in chromium (VI)-treated mammalian cells. *Environ Mol Mutagen* 1999; 33(4): 313-319.
- Logan TJ and Chaney RL: Nonlinear rate response and relative crop uptake of sludge cadmium for land application of sludge risk assessment. 6th Inter Confer Heavy Metals in the Environment, N Orleans 1987; 387-389.
- London SJ, Daly AK, Leathart JB et al: Genetic polymorphism of CYP2D6 and lung cancer risk in African-Americans and Caucasians in Los Angeles County. *Carcinogenesis* 1997; 18(6): 1203-1214.
- Loyd DR, Phillips DH, Carmichael PL: Generation of putative intrastrand cross-links and strand breaks in DNA by transition metal ion-mediated oxygen radical attack. *Chem Res Toxicol* 1997; 10(4): 393-400.
- Lucas GB: Diseases of tobacco, Biological Consulting Associates, Raleigh, N Carolina 1975.
- Mack DP, Dervan PB: Sequence-specific oxidative cleavage of DNA by a designated metalloprotein, nickel (II) GGH (Hin 139-190). *Biochemistry* 1992; 31: 9399-9405.
- MacLean AJ: Cadmium in different plant species and its availability in soils as influenced by organic matter and additions of lime,P,Cd and Zn. *Can J Soil Sci* 1976,56:129-138.
- Magee PN and Barnes JM: The production of malignant hepatic tumors in the rat by feeding dimethylnitrosamine. *Br J Cancer* 1956; 10: 114-122.
- Marletta MA.: Mammalian synthesis of nitrite, nitrate, nitric oxide and N-nitrosating agents. *Chem Res Toxicol* 1988; 1: 249-257.
- Marmorstein R, Corey M, Ptashne M and Harrison SH: DNA recognition by GAL4: structure of a protein-DNA complex. *Nature* 1992; 356: 408-414.
- Marschner H. Mineral nutrition of higher plants. 2nd edition, Academic press, London 1997.
- Marsh BH: Reduced crude conversion spent line as an alternative lime source (subsoil acidity, root growth). University of Kentucky, Diss Abst Intern 1990; 52/02-B: 583.
- Martin-Mateo MC, Molpeceres LM and Ramos G: Assay for erythrocyte superoxide dismutase activity in patients with lung cancer and effects on pollution and smoke trace elements. *Biol Trace Elem Res* 1997; 60(3): 215-226.
- McBride TJ, Preston BD, Loeb LA: Mutagenic spectrum resulting from DNA damage by oxygen free radicals. *Biochemistry* 1991; 30: 207-213.
- McCants CB and woltz WG: Growth and mineral nutrition of tobacco *Advances in Agronomy*. Academic Press, N.York and London 1967; 19: 211-265.
- McGrath SP, Chandri AM, Giller KE: Long-term effects of metals in sewage sludge on soils, microorganisms and plants. *J Ind Microbiol* 1995; 14(2): 94-104.
- McIlrath W and Skok J.: Distribution of boron in the tobacco plant, *Physiol Pl* 1964; 17: 839-845.

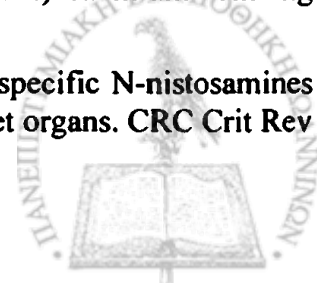


- McKenna I, Waalkes MP, Chen LC: Comparison of inflammatory lung responses in wistar rats and C57 and DBA mice following acute exposure to cadmium oxide fumes. *Toxicol and Appl Pharmacol* 1997; 146:196-206.
- McKenna I, Gordon T, Chen LC et al: Expression of metallothionein protein in the lungs of wistar rats and C57 and DBA mice exposed to cadmium oxide fumes. *Toxic and App Pharmacol* 1998; 153: 169-178.
- Mench MJ, Didier VL, Lofler M et al: Mimicked in-situ remediation study of metal-contaminated soils with emphasis on cadmium and lead. *J of Environ Quality* 1994; 23(1): 58-63.
- Mengel K et al.: Principles of plant nutrition, 3rd edit., Int Potash Inst Worblaufen-Bern/Switzerland 1982.
- Menissier-de Murcia J, Molinete M, Gradwohl G et al: Zinc-binding domain of poly (ADP-ribose) polymerase participates in the recognition of single strand breaks on DNA. *J Mol Biol* 1989; 5,210(1): 229-233.
- Meplan C, Mann K, Hainaut P: Cadmium induces: conformational modifications of wild-type p53 and suppresses p53 response to DNA damage in cultured cells. *J Biol Chem* 1999; 274(44): 31663-31670.
- Mett LV, Lochhead LP and Reynolds PHS: Copper-controllable gene expression system for whole plants. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90: 4567-4571.
- Metzger L, Fouchault I, Glad C et al: Estimation of cadmium availability using transformed roots. *Plant and Soil* 1992; 143(2): 249-257.
- Mikhailova MV, Littlefield NA, Hass BS: Cadmium-induced 8-hydrodeoxyguanosine formation, DNA strand breaks and antioxidant enzyme activities in lymphoblastoid cells. *Cancer Lett* 1997; 19,115(3): 141-148.
- Miller DM, Buettner GR, Aust CD: Transition metals as catalysts of autoxidation reactions. *Free Radical Biol* 1990; 8: 95-108.
- Miner GS, Gutierrez R and King LD: Soil factors affecting plant concentrations of cadmium, copper and zinc on sludge-amended soils. *J Envir Qual* 1997; 26(4): 989-994.
- Misra M, Olinsko R, Dizdaroglu M et al: Enhancement by L-histidine of nickel (II)-induced DNA-protein cross-linking and oxidative DNA base damage in the rat kidney. *Chem Res Toxicol* 1993; 6: 33-37.
- Misra R, Crance KA, Bare RM, Waalkes MP: Lack of correlation between the inducibility of metallothionein mRNA and metallothionein protein in cadmium-exposed rodents. *Toxicology* 1997; 117:99-109.
- Mo JY, Maki H, Sekiguchi M: Hydrolytic elimination of a mutagenic nucleotide, 8-oxodGTP, by human 18-kilodalton protein: sanitization of nucleotide pool. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 11021-11025.
- Morie GP and Baggett MS: Observations on the distribution of certain tobacco smoke components with respect to particle size. *Beitr Tabakforsch* 1977; 9: 72-78.
- Morie GP.: Selective filtration of tobacco smokes components. *Proc Amer Chem Soc Symposium*, 1977; 173: 553-583.
- Moustakas NK, Kogmas KS, Pangos EA: Effect of liming on soil properties and nutrient uptake in flue-cured tobacco. *Coresta, Agro-Phyto meeting, Butapest (Hungary)* 1993.
- Mulchi CL, Adamu CA, Bell PF and Chaney RL: Residual heavy metal concentrations in sludge amended coastal plain soils. II. Predicting metal concentrations in tobacco from soil test information. *Commun Soil Sci Plant Annal* 1992; 23(9&10): 1053-1069.

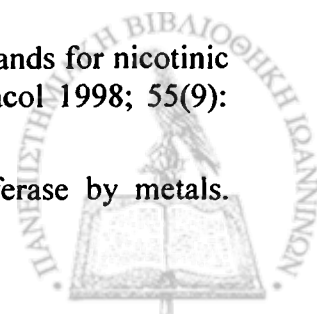
- Mulchi CL, Adamu CA, Bell PF et al: Residual heavy metal concentrations in sludge-amended coastal plain soils-I. Comparison of extractants. *Comm Soil Sci Plant Anal* 1991;22(9&10):919-941.
- Mullen GP, Serpersu EH, Ferrin LJ et al: Metal binding to DNA polymerase I, its large fragment, and two 3'-5'-exonuclease mutants of the large fragment. *J Biol Chem* 1990; 265(2): 14327-14334.
- Muller T, Schuckell R, Jaenicke L: Cadmium/zinc metallothionein induces DNA strand breaks in vitro. *Arch Toxicol* 1991;65:20-26.
- Muller Von German.: Schwermetabgehalte (Cd, Zn, Pb, Cu, Cr) im tabak haufig in der BR deutschland gerauchter zigaretten. *Chemiker Zertung* 1979; 103(4).
- Mussalo-Rauhamaa H and Salmela SS: Cigarettes as a source of some trace and heavy metals and pesticides in man. *Arch Environ Health* 1986; 41: 49-55.
- Myers JA, McLean WO and Bigham JM: Reductions in exchangable magnesium with liming of acid Ohio soils. *Soil Sci Soc Am J* 1988; 52: 131-136.
- Nachiappan V, Mufti SI, Chakravarti A et al: Lipid peroxidation and ethanol-related tumor promotion in Fisher-344 rats treated with tobacco-specific nitrosamines. *Alcohol Alchhol* 1994; 29(5): 565-574.
- Nadkarni RA et al.: Investigations on the relative transference of trace elements from cigarette tobacco into smoke condensate. *Tobacco* 1970; 170: 25-27.
- Nandi M et al.: Cadmium content of cigarettes. *Lancet* 1969; 2: 1329-1330.
- Nason A and McElroy WD: Modes of action of essential mineral elements in *Plant Physiology*, ed. FC Steward, Academic, NY and London 1963; 3: 451-536.
- Nowacki E, Jurzysta M, Gorski P: Effect of nitrogen nutrition on alkaloid metabolism in plants. *Biochem Physiol Pflanzen* 1976;169:231-240.
- O'Connor TR, Graves RJ, de Murcia G et al: Fpg protein of *Escherichia coli* is a zinc finger protein whose cystein residues have a structural and/or functional role. *J Biol Chem* 1993; 268: 9063-9070.
- O'Neill P, Fielden EM, Cocco D et al.: Evidence for catalytic dismutation of superoxide by cobalt (II) derivatives of bovine superoxide dismutase in aqueous solution as studied by pulse radiolysis. *Biochem J* 1982; 1,205(1): 181-187.
- Ochi T, Ishiguro T, Ohsawa M et al.: Participation of active oxygen species in the induction of DNA single-strand scissions by cadmium chloride in cultured Chinese hamster cells. *Mutat res* 1983; 122: 169-175.
- Oleinick NL, Chie S, Ramakrishan N et al: The formation, identification and significance of DNA-protein cross-links in mammalian cells. *Br J Cancer* 1987; 55(VIII): 135-140.
- Oreffo V, Lin HW, Padmanabhan R and Witchi H: K-ras and p53 point mutations in NNK induced lung tumors. *Carcinogenesis* 1993; 14: 451-455.
- Paakko P et al.: Cadmium and chromium as markers of smoking in human lung tissue. *Environ Research* 1989; 49: 197-207.
- Padiglia A, Mesic M, Butorac J et al: Effect of metal substitution in copper amine oxidase form lentil seedlings. *J Biol Chem* 1999; 4(5): 608-613.
- Palmiter RD.: Regulation of metallothionein genes by heavy metals appears to be mediated by a zinc-sensitive inhibitor that interacts with a constitutively active transcription factor, MTF-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 1219-1223.



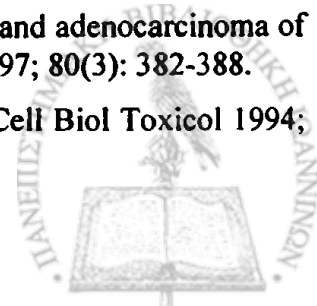
- Park JW, Floyd RA: Lipid peroxidation products mediate the formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA. *Free Rad Biol Med* 1992; 12: 245-250.
- Patel U et al.: Mechanism of mutagenicity by 5-hydroperoxymethyl-2'-deoxyuridine, and intermediate product of ionizing radiation in bacteria. *Mut Res* 1992; 283: 145-156.
- Patten CJ, Smith TJ, Friesen MJ et al: Evidence for cytochrome p4502A6 and 3A4 as major catalysts for N-nitrosomnicotine alpha-hydroxylation by human liver microsomes. *Carcinogenesis* 1997; 18(8): 1623-1630.
- Pavletich NP and Pabo CO: Crystal structure of a five-finger GLI-DNA complex: new perspectives on zinc fingers. *Science* 1993; 261: 1701-1707.
- Pavletich NP and Pabo CO: Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science* 1991; 252: 809-918.
- Peskin AV, Shlyahova L: Cell nuclei generate DNA-nicking superoxide radicals. *FEBS Lett* 1986; 194: 317-321.
- Peterson L and Hecht SS: O⁶-methylguanine is a critical of NNK tumorigenesis in A/J mouse lung. *Canc Res* 1991; 51: 5557-5564.
- Peterson PJ and Girling CA: Effects of trace metals on plant function. In: *Effect of heavy metal pollution on plants*. Applied Science Publisher, 1981; 1: 213-342.
- Petruzzelli G, Vigna Gruidi G, Lubrano L et al: Comparison of heavy metal mobility in a soil treated with sewage sludge, pig slurry and inorganic fertilisers. 8th Intern Confer Heavy Metals in the Environment, Edinburgh 1991; 1: 399-402.
- Pommer AJ, Kuhlmann UC, Cooper A et al.: Homing in the role of transition metals in the HNH motif of colicin endonucleases. *J Biol Chem* 1999; 274(38): 27153-27160.
- Porter DW, Yakushiji H, Nakabeppu Y et al.: Sensitivity of *Escherichia coli* (Mut T) and human (MTH 1) 8-oxo-dGTPases to in vitro inhibition by the carcinogenic metals, nickel (II), copper (II), cobalt (II) and cadmium (II). *Carcinogenesis* 1997; 18(9): 1785-1791.
- Potter JD. Colorectal cancer: molecules and populations. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91(11): 916-932.
- Prokopczyk B, Cox JE, Hoffmann D and Waggoner SE: Identification of tobacco specific carcinogen in the cervical mucus of smokers and nonsmokers. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89(12): 868-873.
- Quinn MJ and Delves HT: UK blood lead monitoring program 1984-1987: protocol and results for 1984: *Human Toxicol* 1987; 6: 459-479.
- Raper Jr CD and McCants CB: Performance of flue-cured tobacco on selected soil nitrogen availability regimes. *Tob Sci* 1970; 14: 22-25.
- Raper Jr CD and McCants CB: Nutrient accumulation in flue-cured tobacco. *Tob Sci* 1966; 10:109.
- Reddy CS and Dorn CR: Municipal sewage sludge application on Ohio farms: estimation of cadmium intake. *Environ Res* 1985; 377-388.
- Reese RN and Wagner GJ: Properties of tobacco (*Nicotiana tabacum*) cadmium-binding peptide(s). *Bioch J* 1987;241(3):641-647.
- Rivenson A, Hecht SS and Hoffmann D: Carcinogenicity of tobacco-specific N-nitosamines (TSNA): the role of vascular network in the resection of the target organs. *CRC Crit Rev Toxicol* 1991; 21: 255-264.



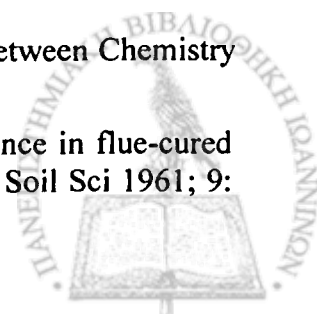
- Rodenhuis S and Slebos RIC: Clinical significance of ras oncogene activation in human lung cancer. *Canc Res Suppl* 1992; 52: 2665-2669.
- Rodgman A.: The composition of cigarette smoke. *Amer Chem Soc N Carol Sect*, Greensboro 1969.
- Rodriguez H, Akman SA: Mapping oxidative DNA damage at nucleotide level. *Free Radical Res* 1998; 29(6): 499-510.
- Rohrbach JF: A survey of some chemical and physical properties of New Zealand flue-cured tobacco. *N Z Journal of Agricultural Research* 1979; 22: 55-59.
- Ronai Z, Gradia S, Peterson LA et al: Analysis of K-ras and p53 mutations in lung tumours induced by 4-(methylnitrosamine)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK), (NNKOAc) or (AMMN). *Proc Am Assoc Cancer Res* 1993; 34: 170.
- Rosin M, Anwar WA and Ward AJ: Inflammation, chromosomal instability and cancer: the schistosomiasis model. *Cancer Res* 1994. 54(suppl): 1929-1933.
- Ross AD, Lawrie RA, Keneally JP and Whatmuff MS: Risk characterisation and management of sewage sludge on agricultural land-implication for the environment and the food chain. *Aust Jot J* 1992; 63(8): 177-181.
- Roy NK, Rossman TG: Mutagenesis and comutagenesis by lead compounds. *Mutat Res* 1992, 298(2): 97-103.
- Saldivar L, Luna M, Reyes E, Soto R, Fostoul TI: Cadmium determination in Mexican-produced tobacco. *Environ Res* 1991; 55(1): 91-96.
- Salem N, Petruzzelli G, Vigna Guidi G and Abou Seeda M: Interaction among sewage sludge and mineral fertilisers on heavy metals uptake by plants. 4th Inter Confer Heavy Metals in the Environment, Barcelona 1990; 280-283.
- Sarkar B.: Metal replacement in DNA-binding zinc finger proteins and its relevance to mutagenicity and carcinogenicity through free radical generation. *Nutrition* 1995; 11(Suppl5): 646-649.
- Sarkar S, Yadav P, Bhatnagar D: Cadmium-induced lipid peroxidation and the antioxidant system in rat erythrocytes: the role of antioxidants. *J Trace Elem Med Biol* 1997; 11(1): 8-13.
- Sato M and Bremner I: Oxygen free radicals and metallothionein. *Free Radical Biol & Medic* 1993; 14: 325-337.
- Schaaper RM, Koplitz RM, Tkeshelashvili LK et al.: Metal-induced lethality and mutagenesis: possible role of apurinic intermediates. *Mutat Res* 1987; 177: 179-188.
- Schenker D.: Considerations on the cadmium content of tobacco products. *Forum Staedte-Hygiene* 1984; 35: 17-18.
- Schmeltz I and Hoffmann D: Nitrogen-containing compounds in tobacco and tobacco smoke. *Chem Rev* 1977; 77: 295-311.
- Schrader E, Hirsh'Ernst KJ, Richter E and Forth H: Metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in isolated rat lung and liver. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1998; 357(3): 336-343.
- Schuller HM and Orloff M: Tobacco-specific carcinogenic nitrosamines. Ligands for nicotinic acetylcholine receptors in human lung cancer cells. *Biochem Pharmacol* 1998; 55(9): 1377-1384.
- Scicchitano DA, Pegg AE: Inhibition of O⁶-alkylguanine-DNA-alkyltransferase by metals. *Mut Res* 1987; 192(3): 207-210.



- Scott R et al.: Cadmium concentrations in human kidneys from the UK. *Human Toxicol* 1987; 6: 111-119.
- Serna MD and Fomares F: Indexes of assessing N availability in sewage sludges. *Plant and Soil* 1992;139:15-21.
- Shaikh ZA, Vu TT, Zaman K: Oxidative stress as a mechanism of chronic cadmium-induced hepatotoxicity and renal toxicity and protection by antioxidants. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999; 1,154(3): 256-263.
- Shi X and Dalal NS: Chromium (V) and hydroxyl radical formation during the glutathione reductase - catalyzed reduction of chromium (VI). *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 163: 627-634.
- Shi XG and Dalal NS: On the hydroxyl radical formation in the reaction between hydrogen peroxide and biologically generated chromium (V) species. *Arch Biochem Biophys* 1990; 277(2): 342-350.
- Shopland DR, Eyre HJ and Pechacek TF: Smoking-attributable cancer mortality in 1991: Is lung cancer now the leading cause of death among smokers in the United States? *INCI* 1991; 83: 1142-1148.
- Shukla GS, Hussain T, Chandra SV: Possible role of regional superoxide dismutase activity and lipid peroxide levels in cadmium neurotoxicity: In vivo and in vitro studies in growing rats. *Life Sci* 1987; 41: 2215-2221.
- Sierra FA: Interrelationships of S, Cl and K on certain chemical and physical properties of flue-cured tobacco. *Diss Apst* 1966; 1767: 3754-B
- Singer B and Essigman JN: Site-specific mutagenesis: retrospective and prospective. *Carcinogenesis* 1991; 12: 949-955.
- Siriratpiriya O.: Capability as fertiliser of sewage sludge disposed in agricultural area of Thailand. 4th. Inter Confer Heavy metals in the Environment, Barcelona 1990; 68-72.
- Smith CJ, Livingston SD and Doolittle DJ: An international literature survey of "IARC Group I carcinogens" reported in mainstream cigarette smoke. *Food Chem Toxicol* 1997; 35(10-11): 1107-1130.
- Smith TJ, Guo Z, Gouzalez FJ et al: Metabolism of NNK in human lung and liver microsomes and cytochromes p-450 expressed in hepatoma cells. *Cancer Res* 1992; 52: 1757-1769.
- Snyder RD, Davis GF, Lachmann PJ: Inhibition by metals of X-ray and ultraviolet-induced DNA repair in human cells. *Biol Trace Elem Res* 1989; 21: 389-398.
- Staretz ME, Foiles PG, Miglietta et al: Evidence for an important role of DNA pyridyloxobutylation in rat lung carcinogenesis by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone: effects of dose and phenethyl isothiocyanate. *Cancer Res* 1997; 57(2): 259-266.
- Stedman RL.: The chemical composition of tobacco and tobacco smoke. *Chem Rev* 1968; 68: 153-207.
- Steinberg RA and Tso TC: Physiology of the tobacco plant. *Amer Rev Pl Physiol* 1965; 9: 151-174.
- Stellman SD, Muscat JE, Thomson S: Risk of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung in relation to lifetime filter cigarette smoking. *Cancer* 1997; 80(3): 382-388.
- Sugiyama S.: Role of cellular antioxidants in metal-induced damage. *Cell Biol Toxicol* 1994; 10: 1.



- Sunderman FW Jr.: Mechanisms of nickel carcinogenesis. *Scand J Work Environ Health* 1989; 15: 1-12.
- Sunderman FW Jr.: Recent advances in metal carcinogenesis. *Ann Clin Lab Sci* 1984; 14: 93-122.
- Takafumi O, Takahashi K and Ohsawa M: Indirect evidence for the induction of a prooxidant state by cadmium chloride in cultured mammalian cells and a possible mechanisms for the induction. *Mutat Res* 1987; 180: 257-266.
- Takijima Y and Katsumi F: Cadmium contamination of soils and rice plants caused by zinc mining. *Soil Sci Plant Nutr* 1973; 19: 235-244.
- Taylor MD: Accumulation of cadmium derived from fertilizers in New Zealand soils. *Sci Total Environ* 1997; 208(1-2): 123-126.
- Thomson R and Monk R: Boron and flue-cured tobacco. *N Y J Sci Technol Sect A* 1956; 28:326-331.
- Thornalley S, Vasak M: Possible role of metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanisms of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. *Biochim Biophys Acta* 1985; 827: 36-44.
- Timblin CR, Janssen YM, Goldberg JL, Mossman BT: GRP78, HSP72/73 and cJun stress protein levels in lung epithelial cells exposed to asbestos, cadmium, or H₂O₂. *Free Radic Biol Med* 1998; 1,24(4): 632-642.
- Tkeshelashvili LK, MvBride TJ, Spense K et al.: Mutation spectrum of copper-induced DNA damage. *J Biol Chem* 1991; 266: 6401-6406.
- Tkeshelashvili LK, Reid TM, McBride TJ et al.: Nickel induces a signature mutation for oxygen free radical damage. *Cancer Res* 1993; 53: 4172-4174.
- Tso TC, McMurtrey Jr JE and Sorokin T: Chemical studies on tobacco smoke. XXI. Correlation and multiple regression among selected cigarette-smoke constituents and leaf characteristics of bright tobacco. *Beitr Tabakforsch* 1973; 7: 190-194.
- Tso TC, Rathkamp G and Hoffmann D: Mineral deficiency and organic constituents in tobacco plants. I. Alkaloids, sugars and organic acids. *Pl Physiol* 1960; 35: 860-870.
- Tso TC, McMurtrey Jr JE and Jeffrey RN: Mineral deficiency and organic constituents in tobacco plants. III. Plant growth and alkaloid contents related to gradual development of calcium or boron deficiency symptoms. *Pl. Physiol* 1962; 37:804-808.
- Tso TC. : Physiology and biochemistry of tobacco plants. Dowden, Hutchinson and Ross, Stroudsburg, Pa 1972.
- Tsuda M, Niitsuma J, Sato S et al: Increase in the levels of N-nitrosoproline, N-nitrosothiopropine and N-nitroso-2-methylthiopropine in human urine by cigarette smoking. *Cancer Lett* 1986; 30: 117-124.
- Vallee BL and Auld DS: Functional zinc-binding motifs in enzymes and DNA-binding proteins. *Faraday Discuss* 1992; 93: 47-65.
- Vallee BL, Coleman JE and Auld DS: Zinc fingers, zinc clusters, and zinc twists in DNA-binding protein domains. *Proc Natl Acad Sci* 1991; 88: 999-1003.
- Vallee BL and Auld DS: Zinc metallochemistry in biochemistry. *Interface between Chemistry and Biochemistry* 1995; 260: 277.
- Venkataraman KV and Tejwani KG: Further studies on the nutritional balance in flue-cured tobacco: Interrelationships between cations accumulated in the leaves. *Soil Sci* 1961; 9: 324-327.



- Verstraeten SV, Golub MS, Keen CL, Oteiza PI: Myelin is a preferential target of aluminum-mediated oxidative damage. *Arch Biochem Biophys* 1997; 15,344(2): 289-294.
- Waalkes MP and Poirier LA: In vitro cadmium-DNA interaction cooperativity of cadmium binding and competitive antagonism by calcium, magnesium and zinc. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1984; 75: 539-546.
- Wallace A and Frolich E: Phosphorus deficiency symptoms in tobacco and transpirational water loss. *Nature, Lond* 1965; 208(5016), 231.
- Wallace A, Sufi SM and Romney EM: Regulation of heavy metal uptake and responses in plants. *Recent advances in plant nutrition* 1971;2:547-558.
- Walter I, Miralles R, Funes E et al: Cd and Ni uptake by crops grown on sewage sludge amended soil. 4th Inter Confer Heavy Metals in the Environment, Barcelona 1990; 350-354.
- Watanabe T, Kasahara M, Nakatsuka H, Ikeda M: Cadmium and lead contents of cigarettes produced in various areas of the world. *Sci Total Environ* 1987; 66: 29-37.
- Wedrychowski A, Schmidt WN, Hnilika LS: The in vivo cross-linking of proteins and DNA by heavy metals. *J Biol Chem* 1986; 261: 3370-3376.
- Wen TC: Influence of heavy metal pollution on the growth, yield and quality of tobacco plant. *Bull Taiwan Tob Res Inst* 1983; 19: 21-33.
- Wink DA, Wink CB, Nims RW et al.: Oxidizing intermediates generated by Fenton reagent: kinetic arguments against intermediary of the hydroxyl radical. *Environ Health Persp* 1994; 102(3): 11-15.
- Wolf FE and Batis WW: Extent of tobacco root development as related to nicotine content of the plant parts. *Tob Sci* 1964; 8: 67-69.
- Woltz WG, Reid WA and Colwell WE: Sugar and nicotine content in cured bright tobacco as related to mineral element composition. *Proc Soil Sci Soc Am Proc* 1948; 13: 385-387.
- Wu DE: Characterization of environmental tobacco smoke by neutron activation analysis as a source of hazardous metals in indoor air pollution. University of Illinois at Urbana - Champaign, Diss Abst Intern 1994; 55/12-B: 5546.
- Xu J, Wise JP, Patierno SR: DNA damage induced by carcinogenic lead chromate particles in cultured mammalian cells. *Mut Res* 1992; 280(2): 129-136.
- Yamamoto K, Inoue S, Kawanishi S: Site-specific DNA damage and 8-hydroxydeoxyguanosine formation by hydroxylamine and 4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide in the presence of Cu(II): Role of active oxygen species. *Carcinogenesis* 1993;14:1397-1401.
- Yang CF, Shen HM, Zhuang ZX, Ong CN: Cadmium-induced oxidative cellular damage in human fetal lung fibroblasts (MRC-5 cells). *Environ Health Perspect* 1997; 105(7): 712-716.
- Yang JL, Chdo JI, Lin JG: Reactive oxygen species may participate in the mutagenicity and mutational spectrum of cadmium in chinese hamster ovary-K1 cells. *Chem Res Toxicol* 1996; 9(8): 1360-1367.
- Yang SW, Becker FF, Chan JY: Inhibition of human DNA ligase I activity by zinc and cadmium and the fidelity of ligation. *Environ Mol Mutagen* 1996; 28(1): 19-25.
- Yoo HY, Chang MS, Rho HM: Heavy metal-induced activation on the rat Cu/Zn superoxide dismutase gene via a metal-responsive element. *Mol Gen Genet* 1999; 262(2): 310-313.
- Yue L: Cadmium in tobacco. *Biomed Environ Sci* 1992; 5(1): 53-56.

Zahradka P, Ebisuzaki K: A shuttle mechanism for DNA-protein interactions. The regulation of poly (ADP-ribose) polymerase. *Eur J Biochem* 1982; 127(3): 575-585.

Zakour RA, Kunkel IA, Loep LA: Metal-induced infidelity of DNA synthesis. *Environ Health Persp* 1981; 40: 197-205.

Zhong Z, Troll W, Koenig KL et al.: Carcinogenic sulfide salts of nickel and cadmium induce H_2O_2 formation by human polymorphonuclear leucocytes. *Cancer Res* 1990; 50: 7564-7570.



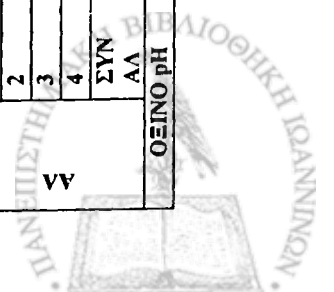
ΠΟΙΚΙΛΙΑ Ι, ΟΕΙΝΟ pH

ΟΜΑΔΕΣ ΥΠΟΤΙΤΡΜΑ ΤΟΞ	ΧΡΟΝΟΣ ΕΞΑΜΟΙΗΣ	ΝΙΚΟΤΙΝΗ		ΑΖΩΤΟ		ΝΙΤΡΙΚΑ		Ζn	
		mean±sd	Median	mean±sd	Median	mean±sd	Median	mean±sd	Median
0%	1	0,500	0,500	2,730	2,730	-	-	107,741±0,262	107,817
	2	0,760	0,760	2,580	2,580	0,700	0,700	115,818±0,543	115,642
	3	0,550	0,550	3,130	3,130	-	-	36,786±0,508	36,774
	4	0,400	0,400	-	-	0,040	0,040	42,245±0,280	42,245
	ΣΥΝ 0%	0,552±0,135	0,525	2,813±0,242	2,730	0,370±0,352	0,370	75,647±37,488	74,925
10%	1	0,790	0,790	2,780	2,780	1,300	1,300	66,745±0,287	66,726
	2	0,800	0,800	2,760	2,760	0,020	0,020	43,171±0,376	43,171
	3	0,760	0,760	3,480	3,480	1,000	1	46,341±0,415	46,287
	4	0,820	0,820	5,470	5,470	0,600	0,600	65,415±0,652	65,369
	ΣΥΝ 10%	0,792±0,022	0,795	3,622±1,141	3,130	0,730±0,494	0,800	55,418±11,090	55,875
20%	1	0,570	0,570	2,140	2,140	0,900	0,900	101,636±0,562	101,422
	2	0,610	0,610	3,270	3,270	1,800	1,800	76,791±0,271	76,881
	3	1,050	1,050	4,220	4,220	2,400	2,400	55,959±0,196	55,922
	4	0,580	0,580	6,240	6,240	2,500	2,500	75,824±0,211	75,881
	ΣΥΝ 20%	0,702±0,207	0,595	3,967±1,553	3,745	1,900±0,657	2,100	77,552±16,735	76,210
40%	1	0,980	0,980	2,620	2,620	1,500	1,500	105,460±0,286	105,344
	2	0,710	0,710	4,000	4	2,200	2,200	63,651±0,508	63,893
	3	0,970	0,970	4,490	4,490	3,200	3,200	91,360±0,241	91,328
	4	0,800	0,800	5,250	5,290	2,900	2,900	50,473±0,292	50,449
	ΣΥΝ 40%	0,865±0,118	0,885	4,090±0,989	4,245	2,450±0,679	2,550	77,736±22,486	77,516
ΑΑ	1	0,570	0,570	2,630	2,630	2,600	2,600	59,220±0,095	59,239
	2	0,860	0,860	1,470	1,470	3,400	3,400	59,508±0,339	59,472
	3	0,700	0,700	4,630	4,630	4,300	4,300	56,071±0,357	56,138
	4	0,590	0,590	6,380	6,380	3,100	3,100	50,712±0,125	50,712
	ΣΥΝ ΑΑ	0,680±0,118	0,645	3,777±1,941	3,630	3,350±0,638	3,250	56,378±3,661	57,758
ΟΕΙΝΟ pH		0,718±0,168	0,735	3,698±1,370	3,270	1,914±1,205	2,000	68,546±23,466	61,417



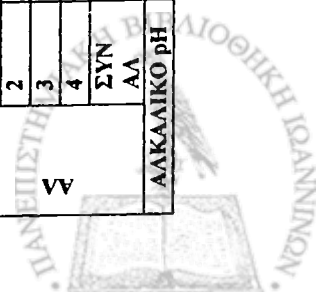
ΠΟΙΚΙΛΙΑ Ι, ΟΞΙΝΟ pH

ΟΜΑΔΕΣ ΥΠΟΤΡΩΜΑ ΤΩΣ	ΧΡΟΝΟΙ ΔΥΝΑΜΟΤΗΣ	Cu		Cr		Pb		Cd	
		mean±sd	Median	mean±sd	Median	mean±sd	Median	mean±sd	Median
0%	1	39,184±0,499	29,231	14,134±0,032	14,128	4,618±0,544	4,586	6,301±0,120	6,263
	2	27,400±0,652	27,400	18,102±0,167	18,130	5,479±0,321	5,479	3,789±0,074	3,752
	3	17,209	17,209	3,978±0,031	3,983	3,237±0,311	3,173	1,885±0,090	1,912
	4	14,843±0,163	14,785	3,736±0,071	3,730	3,466±0,376	3,378	1,251±0,068	1,238
	ΣΥΝ 0%	22,159±6,436	21,979	9,987±6,496	9,056	4,199±1,001	3,988	3,306±2,031	2,855
10%	1	8,283±0,110	8,283	6,150±0,149	6,169	7,426±0,219	7,426	5,109±0,017	5,115
	2	6,343±0,244	6,343	4,207±0,060	4,184	5,869±0,218	5,869	3,060±0,064	3,073
	3	11,114	11,114	6,029±0,022	6,026	3,465±0,691	3,614	2,372±0,044	2,378
	4	21,365±0,174	21,365	5,020±0,039	5,010	7,803±0,087	7,803	2,999±0,074	3,022
	ΣΥΝ 10%	11,776±5,981	9,746	5,351±0,822	5,518	6,141±1,795	6,647	3,385±1,066	3,052
20%	1	13,117	13,117	6,037±0,114	6,037	8,551±0,506	8,422	5,748±0,103	5,757
	2	8,642	8,642	6,985±0,089	7,012	6,796±0,783	6,571	3,919±0,097	3,949
	3	18,078±0,107	18,078	3,034±0,083	3,009	5,655±0,927	5,562	2,878±0,077	2,855
	4	15,976±0,098	15,976	3,610±0,065	3,624	5,382±0,098	5,382	2,745±0,029	2,739
	ΣΥΝ 20%	13,953±3,652	14,504	4,916±1,697	4,787	6,596±1,416	6,301	3,824±1,240	3,392
40%	1	13,371	13,371	5,089±0,033	5,083	9,366±1,345	9,043	4,621±0,130	4,611
	2	7,239	7,239	3,062±0,065	3,081	2,908±0,381	2,939	2,066±0,008	2,063
	3	19,584±0,095	19,584	3,360±0,027	3,360	7,467±0,607	7,682	2,094±0,017	2,094
	4	11,752	11,752	2,626±0,051	2,626	3,917±0,411	3,917	1,628±0,063	1,620
	ΣΥΝ 40%	12,986±4,567	12,561	3,534±0,966	3,227	5,914±2,791	5,440	2,602±1,220	2,079
AA	1	13,566±0,232	13,597	2,394±0,044	2,408	6,596±0,317	6,658	9,111±0,125	9,110
	2	9,954	9,954	3,275±0,039	3,284	4,946±0,615	4,825	5,936±0,044	5,936
	3	12,367±0,086	12,336	4,193±0,048	4,181	6,673±0,458	6,734	4,132±0,044	4,132
	4	14,106±0,147	14,106	2,266±0,061	2,254	4,340±0,295	4,340	1,989±0,092	1,971
	ΣΥΝ AA	12,498±1,655	12,872	3,032±0,801	2,824	5,638±1,123	5,926	5,291±2,696	5,034
ΟΞΙΝΟ pH		14,674±6,030	13,371	5,364±3,890	4,080	5,698±1,889	5,680	3,682±1,940	3,052



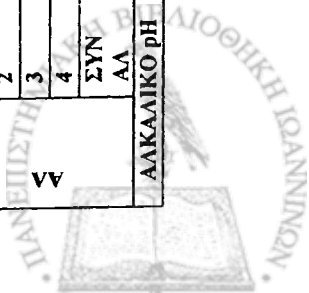
ΠΟΙΚΙΛΙΑ Ι, ΑΛΚΑΛΙΚΟ pH

ΟΜΑΔΕΣ ΥΠΟΕΤΡΩΜΑ ΤΟΥ	ΧΡΟΝΟΙ ΕΥΛΑΘΙΕΣ	ΝΙΚΟΤΙΝΗ		ΑΖΩΤΟ		ΝΙΤΡΙΚΑ		Ζn	
		mean±sd	Median	mean±sd	Median	mean±sd	Median	mean±sd	Median
0%	1	0,820	0,820	1,710	1,710	0,300	0,300	27,659±0,711	27,640
	2	0,820	0,820	3,740	3,740	1,400	1,400	102,676±0,567	102,640
	3	0,680	0,680	3,280	3,280	0,030	0,030	49,607±0,142	49,602
	4	-	-	-	-	-	-	-	-
	ΣΥΝ 0%	0,773±0,068	0,820	2,910±0,907	3,280	0,576±0,618	0,300	59,980±32,895	49,602
10%	1	0,790	0,790	2,890	2,890	0,300	0,300	53,049±0,299	53,030
	2	0,820	0,820	2,870	2,870	2,600	2,600	50,433±0,385	50,523
	3	1,160	1,160	4,490	4,490	1,900	1,900	13,880±0,096	13,861
	4	0,960	0,960	5,840	5,840	3,000	3	74,827±0,742	75,151
	ΣΥΝ 10%	0,932±0,150	0,890	4,022±1,278	3,690	1,950±1,064	2,250	48,047±22,603	51,749
20%	1	0,510	0,510	1,670	1,670	1,000	1	84,762±0,503	84,856
	2	1,080	1,080	3,550	3,550	2,000	2	68,524±0,314	68,542
	3	1,260	1,260	4,440	4,440	2,100	2,100	13,248±0,139	13,193
	4	0,700	0,700	5,280	5,280	2,500	2,500	24,183±0,207	24,148
	ΣΥΝ 20%	0,887±0,307	0,89	3,735±1,383	3,995	1,900±0,570	2,050	47,679±30,757	46,341
40%	1	0,800	0,800	3,740	3,740	0,400	0,400	92,429±0,439	92,468
	2	1,030	1,030	3,170	3,170	1,400	1,400	89,373±0,782	89,135
	3	1,200	1,200	4,780	4,780	3,300	3,300	35,329±0,222	35,440
	4	1,290	1,290	5,450	5,450	2,500	2,500	70,226±1,191	70,712
	ΣΥΝ 40%	1,080±0,192	1,115	4,285±0,915	4,260	1,900±1,133	1,950	71,839±23,487	79,878
ΑΑ	1	0,990	0,990	2,040	2,040	1,200	1,200	48,063±0,249	48,151
	2	0,730	0,730	3,280	3,280	2,000	2	94,186±0,483	94,114
	3	1,200	1,200	3,480	3,480	2,700	2,700	30,144±0,248	30,207
	4	0,840	0,840	4,920	4,920	3,000	3	27,519±0,198	27,531
	ΣΥΝ ΑΑ	0,940±0,181	0,915	3,430±1,055	3,380	2,225±0,716	2,350	49,978±27,597	39,040
ΑΛΚΑΛΙΚΟ pH		0,930±0,217	0,840	3,716±1,196	3,550	1,770±0,996	2,000	55,269±28,359	61,417



ΠΟΙΚΙΛΙΑ Ι, ΑΛΚΑΛΙΚΟ pH

ΟΜΑΔΕΣ ΥΠΟΤΡΟΦΜΑ ΤΟΥ	ΧΡΟΝΟΙ ΕΥΑΘΓΗΣ	Cu		Cr		Pb		Cd	
		mean±sd	Median	mean±sd	Median	mean±sd	Median	mean±sd	Median
0%	1	19,878±0,218	19,878	6,985±0,128	7,032	8,424±0,109	8,424	2,394±0,032	2,394
	2	21,071±0,105	21,071	6,780±0,017	6,774	8,877±0,454	8,816	3,625±0,022	3,630
	3	16,186±0,000	16,186	8,869±0,323	8,759	6,834±0,415	6,834	2,248±0,044	2,248
	4	-	-	-	-	-	-	-	-
	ΣΥΝ 0%	19,045±2,175	19,878	7,545±0,998	7,032	8,045±0,971	8,361	2,756±0,645	2,394
10%	1	12,723±0,112	12,723	8,928±0,107	8,951	10,230±0,242	10,262	2,991±0,041	2,981
	2	9,500±0,103	9,500	5,838±0,034	5,850	8,731±0,578	8,505	2,279±0,051	2,297
	3	2,823±0,090	2,855	1,488±0,032	1,494	2,406±0,333	2,406	0,429±0,048	0,435
	4	14,295±0,000	14,295	4,702±0,032	4,690	5,700±0,098	5,700	1,662±0,083	1,658
	ΣΥΝ 10%	9,835±4,547	11,108	5,239±2,749	5,269	6,766±3,115	7,055	1,840±0,972	1,988
20%	1	11,081	11,081	5,966±0,038	5,969	8,764±0,354	8,889	3,486±0,053	3,489
	2	9,033	9,033	5,341±0,030	5,335	6,774±0,346	6,684	1,824±0,044	1,824
	3	4,318±0,106	4,318	1,065±0,117	1,028	0,864±0,442	0,707	0,214±0,045	0,208
	4	5,023±0,102	5,023	3,272±0,036	3,275	1,321±0,227	1,321	0,497±0,058	0,502
	ΣΥΝ 20%	7,363±2,892	7,072	3,911±1,985	4,312	4,431±3,541	4,044	1,505±1,338	1,167
40%	1	13,659±0,330	13,659	4,476±0,023	4,473	7,386±0,737	7,227	2,273±0,055	2,282
	2	9,143±0,210	9,143	3,314±0,079	3,300	5,988±0,480	6,126	1,803±0,043	1,788
	3	4,250±0,484	4,192	8,033±0,038	8,030	2,589±0,213	2,589	0,683±0,025	0,692
	4	12,267±0,654	12,311	3,930±0,049	3,933	6,155±0,099	6,155	1,599±0,077	1,621
	ΣΥΝ 40%	9,830±3,753	10,471	4,938±1,894	4,219	5,529±1,884	6,143	1,589±0,598	1,718
AA	1	21,535±0,127	21,535	4,122±0,051	4,104	9,276±0,000	9,276	2,864±0,089	2,890
	2	11,945±0,000	11,945	3,836±0,044	3,836	9,320±0,104	9,320	2,392±0,058	2,370
	3	10,444±0,104	10,444	3,790±0,089	3,784	6,054±0,453	6,115	1,786±0,008	1,783
	4	11,591±0,000	11,591	3,765±0,021	3,768	5,478±0,667	5,334	1,747±0,056	1,747
	ΣΥΝ AA	13,879±4,601	11,768	3,878±0,156	3,813	7,532±1,871	7,884	2,197±0,480	2,084
ΑΛΚΑΛΙΚΟ pH		11,619±5,356	11,591	4,973±2,176	4,473	6,377±2,778	6,503	1,936±0,956	1,236

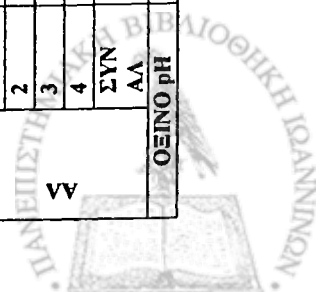


ΠΟΙΚΙΛΙΑ II, ΟΕΙΝΟ pH

ΟΜΑΔΕΣ ΥΠΟΤΡΩΜΑ ΤΩΣ	ΧΡΟΝΟΙ ΕΥΛΑΟΤΗΣ	ΝΙΚΟΤΙΝΗ		ΑΖΩΤΟ		ΝΙΤΡΙΚΑ		Ζn	
		mean±sd	Median	mean±sd	Median	mean±sd	Median	mean±sd	Median
0%	1	0,810	0,810	3,510	3,510	0,700	0,700	34,909±0,290	34,993
	2	0,770	0,770	3,680	3,680	1,300	1,300	46,422±0,163	46,422
	3	0,740	0,740	1,930	1,930	0,500	0,500	266,859±2,543	266,903
	4	0,640	0,640	2,590	2,590	0,500	0,500	89,009±0,495	88,907
	ΣΥΝ 0%	0,740±0,064	0,755	2,927±0,732	3,050	0,750±0,338	0,600	109,300±96,235	67,548
10%	1	0,850	0,850	5,150	5,150	1,600	1,600	61,109±0,542	61,181
	2	1,240	1,240	4,060	4,060	0,500	0,500	63,600±0,245	63,600
	3	0,950	0,950	1,260	1,260	0,900	0,900	58,194±0,639	58,384
	4	0,930	0,930	2,940	2,940	0,700	0,700	54,667±0,470	54,624
	ΣΥΝ 10%	0,992±0,152	0,940	3,352±1,485	3,500	0,925±0,428	0,800	59,392±3,470	59,550
20%	1	0,550	0,550	4,700	4,700	1,100	1,100	66,352±0,580	66,147
	2	1,180	1,180	3,680	3,680	0,600	0,600	50,297±0,039	50,297
	3	1,470	1,470	2,470	2,470	0,700	0,700	56,504±0,533	56,582
	4	1,430	1,430	3,110	3,110	0,200	0,200	61,795±0,760	61,605
	ΣΥΝ 20%	1,157±0,379	1,305	3,490±0,846	3,395	0,650±0,330	0,650	58,737±6,206	59,130
40%	1	1,180	1,180	6,170	6,170	2,400	2,400	69,687±0,042	69,687
	2	1,480	1,480	4,190	4,190	0,800	0,800	66,597±0,159	66,597
	3	1,240	1,240	1,870	1,870	0,080	0,080	80,701±0,468	80,849
	4	1,210	1,210	3,110	3,110	0,400	0,400	94,289±0,080	94,289
	ΣΥΝ 40%	1,277±0,122	1,225	3,835±1,630	3,650	0,920±0,920	0,600	77,818±11,216	74,882
AA	1	1,171	1,170	4,920	4,920	1,800	1,800	68,267±0,358	68,337
	2	1,500	1,500	4,620	4,620	1,000	1	58,522±0,327	58,522
	3	0,980	0,980	2,380	2,380	1,000	1	102,622±0,786	102,622
	4	1,170	1,170	3,630	3,630	1,400	1,400	82,197±1,195	82,474
	ΣΥΝ AA	1,205±0,193	1,170	3,887±1,025	4,125	1,300±0,342	1,200	77,902±17,124	74,578
ΟΕΙΝΟ pH		1,074±0,282	1,170	3,498±1,218	3,570	0,909±0,557	0,750	76,630±46,791	64,877

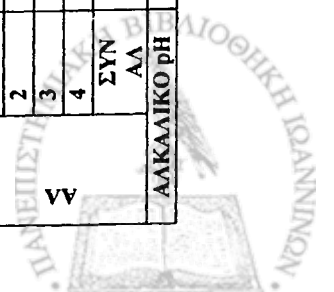
ΠΟΙΚΙΛΙΑ II, ΟΕΙΝΟ pH

ΟΜΑΔΕΣ ΥΠΟΤΡΟΦΑ	ΧΡΟΝΟΙ ΕΥΑΛΟΤΗΣ	Cu		Cr		Pb		Cd	
		meantstd	Median	meantstd	Median	meantstd	Median	meantstd	Median
0%	1	12,359±0,104	12,359	3,072±0,147	3,105	2,796±0,758	2,796	1,236±0,031	1,236
	2	12,718±0,000	12,718	3,576±0,009	3,576	4,857±0,305	4,857	3,346±0,030	3,346
	3	15,422±0,101	15,422	5,881±0,010	5,881	4,007±0,402	4,007	5,750±0,080	5,750
	4	20,904±0,493	20,904	4,735±0,049	4,735	7,167±0,591	7,167	4,851±0,056	4,857
	ΣΥΝ 0%	15,351±3,537	14,026	4,316±1,123	4,138	4,706±1,720	4,474	3,796±1,766	4,075
10%	1	13,319±0,104	13,319	7,624±0,426	7,592	4,802±0,523	4,802	2,292±0,010	2,292
	2	7,516±0,102	7,516	2,528±0,101	2,502	5,570±0,306	5,570	2,422±0,040	2,422
	3	6,397±0,000	6,397	4,904±0,000	4,904	6,752±0,204	6,752	3,615±0,051	3,615
	4	6,750±0,091	6,750	6,030±0,108	6,064	6,512±0,183	6,512	3,653±0,068	3,669
	ΣΥΝ 10%	8,495±2,907	7,129	5,271±1,926	5,390	5,909±0,856	6,095	2,995±0,662	3,008
20%	1	13,029±0,000	13,029	4,071±0,118	4,071	3,981±0,209	3,981	1,103±0,042	1,103
	2	9,437±0,098	9,437	3,235±0,076	3,258	3,145±0,098	3,145	1,674±0,049	1,674
	3	6,484±0,096	6,484	5,417±0,057	5,428	6,231±0,388	6,231	3,525±0,052	3,539
	4	6,301±0,000	6,301	4,791±0,052	4,776	5,715±0,338	5,715	3,245±0,025	3,245
	ΣΥΝ 20%	8,812±2,824	7,960	4,378±0,843	4,481	4,768±1,319	4,792	2,387±1,057	2,470
40%	1	12,058±0,000	12,058	2,904±0,104	2,877	4,750±1,065	4,933	1,516±0,020	1,516
	2	6,297±0,099	6,297	2,759±0,122	2,794	3,795±0,199	3,795	1,311±0,019	1,311
	3	5,477±0,197	5,477	10,843±0,049	10,843	5,819±0,395	5,819	2,772±0,039	2,772
	4	8,182±0,200	8,182	2,692±0,049	2,695	7,398±0,101	7,398	2,811±0,081	2,811
	ΣΥΝ 40%	8,003±2,624	7,195	4,799±3,605	2,839	5,440±1,475	5,477	2,102±0,717	2,124
AA	1	14,974±0,110	14,974	3,503±0,039	3,506	3,910±0,550	3,910	2,908±0,032	2,908
	2	7,457±0,000	7,457	2,053±0,093	2,029	3,506±0,604	3,373	2,938±0,050	2,938
	3	5,791±0,000	5,791	3,462±0,155	3,449	5,365±0,295	5,365	4,641±0,244	4,607
	4	9,505±0,199	9,505	6,420±0,030	6,420	8,122±0,598	8,122	3,951±0,008	3,954
	ΣΥΝ AA	9,432±3,574	8,395	3,859±1,643	3,489	5,226±1,927	4,748	3,609±0,761	3,461
ΟΕΙΝΟ pH		10,019±4,079	8,844	4,525±2,071	3,794	5,210±1,533	5,255	2,978±1,240	2,922



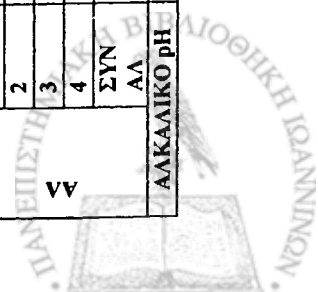
ΠΟΙΚΙΛΙΑ II, ΑΛΚΑΛΙΚΟ pH

ΟΜΑΔΕΣ ΥΠΟΕΣΤΡΩΜΑ ΤΟΞ	ΧΡΟΝΟΙ ΕΞΑΝΘΗΞΕ	ΝΙΚΟΤΙΝΗ		ΑΖΩΤΟ		ΝΙΤΡΙΚΑ		Ζn	
		mean±sd	Median	mean±sd	Median	mean±sd	Median	mean±sd	Median
0%	1	1,100	1,100	4,990	4,990	2,200	2,200	34,610±0,083	34,610
	2	1,520	1,520	3,350	3,350			49,461±1,358	49,546
	3	1,220	1,220	1,630	1,60			38,696±0,079	38,696
	4	1,650	1,650	2,490	2,490	0,080	0,080	61,637±0,038	61,637
	ΣΥΝ 0%	1,372±0,228	1,370	3,115±1,282	2,920	1,140±1,133	1,140	46,101±10,843	43,317
10%	1	1,130	1,130	4,360	4,360	1,900	1,900	38,160±0,535	38,249
	2	1,380	1,380	4,560	4,560	1	1	53,540±0,417	53,652
	3	1,090	1,090	2,040	2,040			46,425±0,202	46,425
	4	1,540	1,540	3,590	3,590	0,400	0,400	44,760±0,578	44,610
	ΣΥΝ 10%	1,285±0,190	1,255	3,637±1,023	3,975	1,10±0,643	1	45,721±5,665	45,909
20%	1	1,350	1,350	4,190	4,190	1,800	1,800	91,324±0,820	91,251
	2	1,600	1,600	3,930	3,930	1,600	1,600	61,624±0,696	61,509
	3	1,080	1,080	2,210	2,210	0,400	0,400	54,024±0,118	54,024
	4	1,550	1,550	3,310	3,310	0,400	0,400	115,503±0,241	115,503
	ΣΥΝ 20%	1,395±0,211	1,450	3,410±0,788	3,620	1,050±0,675	1	80,619±25,301	76,525
40%	1	0,980	0,980	2,260	2,260	4	4	80,359±0,714	80,143
	2	1,360	1,360	4,460	4,460	1,7	1,700	71,763±0,0357	71,692
	3	0,810	0,810	2,270	2,270	0,600	0,600	77,482±1,026	77,373
	4	1,030	1,030	3,450	3,450	1,200	1,200	99,460±0,950	99,305
	ΣΥΝ 40%	1,045±0,205	1,005	3,110±0,947	2,860	1,875±1,329	1,450	82,266±10,763	79,309
AA	1	1,080	1,080	4,700	4,700	1	1	57,367±2,072	57,762
	2	1,250	1,250	4,190	4,190	0,800	0,800	25,412±0,121	25,112
	3	1,090	1,090	2,080	2,080	0,200	0,200	52,215±1,162	52,556
	4	1,450	1,450	2,930	2,930	0,300	0,300	126,723±0,050	126,723
	ΣΥΝ AA	1,271±0,155	1,170	3,475±1,065	3,560	0,575±0,345	0,550	65,429±38,651	53,848
ΑΛΚΑΛΙΚΟ pH		1,263±0,232	1,235	3,349±1,028	3,400	1,151±0,966	1	64,027±26,685	54,327



ΠΟΙΚΙΛΙΑ II, ΑΛΚΑΛΙΚΟ pH

ΟΜΑΔΕΣ ΥΠΟΕΤΡΩΜΑ ΤΩΣ	ΧΡΟΝΟΙ ΕΥΛΑΘΕΙΑΣ	Cu		Cr		Pb		Cd	
		meantstd	Median	meantstd	Median	meantstd	Median	meantstd	Median
0%	1	14,390±0,207	14,390	2,536±0,20	2,536	3,507±0,311	3,507	0,800±0,197	0,800
	2	13,604±0,099	13,604	6,446±0,098	6,481	5,285±0,099	5,285	1,135±0,030	1,135
	3	15,443±0,148	15,439	20,405±0,177	20,365	6,088±0,494	6,088	1,806±0,071	1,809
	4	15,135±0,095	15,135	7,348±0,114	7,377	8,353±0,286	8,353	1,990±0,043	1,979
	ΣΥΝ 0%	14,643±0,746	14,811	9,183±6,947	6,855	5,808±1,822	5,516	1,432±0,50*9	1,450
10%	1	10,624±0,103	10,624	3,339±0,020	3,339	4,463±0,206	4,463	0,660±0,082	0,660
	2	9,625	9,625	5,408±0,057	5,397	6,078±0,601	5,909	0,652±0,044	0,663
	3	6,131	6,131	3,923±0,020	3,923	9,284±0,202	9,284	1,950±0,071	1,956
	4	7,455±0,200	7,455	5,253±0,127	5,253	7,109±0,200	7,109	1,560±0,085	1,586
	ΣΥΝ 10%	8,459±1,826	8,627	4,481±0,097	4,519	6,734±1,832	6,929	1,205±0,588	1,085
20%	1	13,999±0,105	13,999	3,971±0,042	3,971	8,509±0,528	8,509	1,052±0,010	1,052
	2	7,596±0,199	7,596	5,553±0,105	5,556	4,833±0,199	4,833	0,958±0,030	1,958
	3	6,680	6,680	6,320±0,058	6,320	7,108±0,098	7,108	2,134±0,117	2,171
	4	6,121±0,096	6,121	5,382±0,135	5,408	6,875	6,875	1,576±0,049	1,584
	ΣΥΝ 20%	8,599±3,267	7,052	5,306±0,879	5,475	6,831±1,379	6,949	1,430±0,488	1,285
40%	1	14,208±0,207	14,208	5,237±0,157	5,251	6,474±0,415	6,474	0,5030,076	0,530
	2	7,365	7,365	3,062±0,041	3,047	5,436±0,822	5,524	0,771±0,020	0,771
	3	5,315±0,094	5,315	2,987±0,033	2,990	7,523±0,188	7,523	1,302±0,033	1,305
	4	7,912±0,095	7,912	2,742±0,043	2,753	7,6620,192	7,662	1,504±0,061	1,501
	ΣΥΝ 40%	8,700±3,434	7,597	3,507±1,041	3,029	6,7741,022	7,097	1,020±0,416	1,024
AA	1	12,779	12,779	2,592±0,021	2,592	3,889±0,213	3,889	12,779	1,101
	2	11,159±0,101	11,159	4,090±0,136	4,112	5,799	5,799	11,159±0,101	1,142
	3	11,843±0,098	11,843	3,294±0,070	3,300	8,775±0,295	8,775	11,843±0,098	1,978
	4	9,916±0,099	9,916	3,535±0,092	3,526	8,795±0,397	8,795	9,916±0,099	1,638
	ΣΥΝ AA	11,424±1,465	11,502	3,377±0,561	3,403	6,814±2,165	7,125	11,424±1,080	1,381
ΑΛΚΑΛΙΚΟ pH		10,365±3,330	10,269	5,171±3,782	4,008	6,592±1,695	6,875	1,310±0,500	1,210



ΠΟΙΚΙΛΙΑ Ι

Σύγκριση ομάδων υποστρώματος (ανά δύο) με Mann-Whitney U-test

ΟΜΑΔΕΣ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ	ΝΙΚΟΤΙΝΗ	ΝΙΤΡΙΚΑ	ΑΖΩΤΟ	Cd	Cu	Cr	Zn	Pb
0% - 10%	P<0,05	P<0,05	P<0,05	N.S	P<0,05	P<0,05	N.S	N.S
0% - 20%	N.S.	P<0,05	P<0,05	N.S	P<0,05	P<0,05	N.S	N.S
0% - 40%	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05	N.S	N.S
0% - ΑΛ	P<0,05	P<0,05	P≈0,05	N.S	P<0,05	P<0,05	N.S	N.S
ΑΛ - 10%	N.S.	P<0,05	N.S.	P<0,05	P<0,05	P<0,05	N.S	N.S
ΑΛ - 20%	N.S.	P<0,05	N.S.	P<0,05	P<0,05	N.S	N.S	N.S
ΑΛ - 40%	P<0,05	P<0,05	N.S.	P<0,05	N.S	N.S	P<0,05	N.S

ΠΟΙΚΙΛΙΑ ΙΙ

Σύγκριση ομάδων υποστρώματος (ανά δύο) με Mann-Whitney U-test

ΟΜΑΔΕΣ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ	ΝΙΚΟΤΙΝΗ	ΝΙΤΡΙΚΑ	ΑΖΩΤΟ	Cd	Cu	Cr	Zn	Pb
0% - 10%	N.S	N.S	N.S	N.S	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05
0% - 20%	P<0,05	N.S	N.S	N.S	P<0,05	P<0,05	P<0,05	N.S
0% - 40%	N.S	P<0,05	N.S	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P≈0,05
0% - ΑΛ	P≈0,05	N.S	P<0,05	N.S	P<0,05	P<0,05	N.S	P≈0,05
ΑΛ - 10%	N.S.	N.S	N.S	N.S	P<0,05	N.S	P<0,05	N.S
ΑΛ - 20%	P≈0,05	N.S	P≈0,05	P<0,05	P<0,05	N.S	N.S	N.S
ΑΛ - 40%	N.S.	P<0,05	N.S	P<0,05	P<0,05	N.S	P<0,05	N.S

ΠΟΙΚΙΛΙΑ Ι, ΟΞΙΝΟ pH

Σύγκριση ομάδων υποστρώματος (ανά δύο) με Mann-Whitney U-test

ΟΜΑΔΕΣ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ	ΝΙΚΟΤΙΝΗ	ΝΙΤΡΙΚΑ	ΑΖΩΤΟ	Cd	Cu	Cr	Zn	Pb
0% - 10%	P<0,05	N.S.	N.S.	N.S.	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05
0% - 20%	P<0,05	P<0,05	P<0,05	N.S.	P<0,05	P<0,05	N.S.	P<0,05
0% - 40%	P<0,05	P<0,05	P<0,05	N.S.	P<0,05	P<0,05	N.S.	P<0,05
0% - ΑΑ	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05
ΑΑ - 10%	P<0,05	P<0,05	N.S.	P<0,05	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
ΑΑ - 20%	N.S.	P<0,05	N.S.	P<0,05	N.S.	N.S.	P<0,05	N.S.
ΑΑ - 40%	P<0,05	P<0,05	N.S.	P<0,05	N.S.	N.S.	P<0,05	N.S.

ΠΟΙΚΙΛΙΑ ΙΙ, ΟΞΙΝΟ pH

Σύγκριση ομάδων υποστρώματος (ανά δύο) με Mann-Whitney U-test

ΟΜΑΔΕΣ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ	ΝΙΚΟΤΙΝΗ	ΝΙΤΡΙΚΑ	ΑΖΩΤΟ	Cd	Cu	Cr	Zn	Pb
0% - 10%	P<0,05	N.S.	N.S.	P<0,05	P<0,05	N.S.	P<0,05	P<0,05
0% - 20%	P<0,05	N.S.	N.S.	P<0,05	P<0,05	N.S.	P<0,05	N.S.
0% - 40%	P<0,05	N.S.	P<0,05	P<0,05	P<0,05	N.S.	P<0,05	N.S.
0% - ΑΑ	P<0,05	P<0,05	P<0,05	N.S.	P<0,05	N.S.	P≈0,05	N.S.
ΑΑ - 10%	P<0,05	P<0,05	N.S.	N.S.	N.S.	P≈0,05	N.S.	N.S.
ΑΑ - 20%	N.S.	P<0,05	N.S.	P<0,05	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
ΑΑ - 40%	N.S.	P<0,05	N.S.	P<0,05	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

ΠΟΙΚΙΛΙΑ Ι, ΑΛΚΑΛΙΚΟ pH
Σύγκριση ομάδων υποστρώματος (ανά δύο) με Mann-Whitney U-test

ΟΜΑΔΕΣ ΥΠΟΣΤΡΩ ΜΑΤΟΣ	ΝΙΚΟΤΙΝΗ	ΝΙΤΡΙΚΑ	ΑΖΩΤΟ	Cd	Cu	Cr	Zn	Pb
0% - 10%	N.S.	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05	N.S.	N.S.
0% - 20%	N.S.	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05	N.S.	P<0,05
0% - 40%	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05	N.S.	P<0,05
0% - ΑΑ	P<0,05	P<0,05	N.S.	N.S.	P<0,05	P<0,05	N.S.	N.S.
ΑΑ - 10%	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	P<0,05	P<0,05	N.S.	N.S.
ΑΑ - 20%	N.S.	N.S.	N.S.	P<0,05	P<0,05	N.S.	N.S.	P<0,05
ΑΑ - 40%	P<0,05	N.S.	P<0,05	P<0,05	P<0,05	N.S.	P<0,05	P<0,05

ΠΟΙΚΙΛΙΑ ΙΙ, ΑΛΚΑΛΙΚΟ pH
Σύγκριση ομάδων υποστρώματος (ανά δύο) με Mann-Whitney U-test

ΟΜΑΔΕΣ ΥΠΟΣΤΡΩ ΜΑΤΟΣ	ΝΙΚΟΤΙΝΗ	ΝΙΤΡΙΚΑ	ΑΖΩΤΟ	Cd	Cu	Cr	Zn	Pb
0% - 10%	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	P<0,05	P<0,05	N.S.	N.S.
0% - 20%	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	P<0,05	P<0,05	P<0,05	N.S.
0% - 40%	P<0,05	P<0,05	N.S.	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05	N.S.
0% - ΑΑ	P<0,05	N.S.	N.S.	N.S.	P<0,05	P<0,05	P<0,05	N.S.
ΑΑ - 10%	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	P<0,05	N.S.	P<0,05	N.S.
ΑΑ - 20%	P<0,05	N.S.	N.S.	N.S.	P<0,05	N.S.	P<0,05	N.S.
ΑΑ - 40%	P<0,05	P<0,05	N.S.	P<0,05	P<0,05	N.S.	P<0,05	N.S.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΠΟ Kruskal-Wallis ANOVA (median test)

Διαφορές Ποικιλίας Ι - Ποικιλίας ΙΙ

ΝΙΚΟΤΙΝΗ	ΝΙΤΡΙΚΑ	ΑΖΩΤΟ	Cd	Cu	Cr	Zn	Pb
0,000	0,000	N.S	0,000	0,000	N.S	N.S	N.S

Ποικιλία Ι, Διαφορές pH 1 – pH2

ΝΙΚΟΤΙΝΗ	ΝΙΤΡΙΚΑ	ΑΖΩΤΟ	Cd	Cu	Cr	Zn	Pb
0,000	N.S	N.S	0,000	0,003	N.S	0,002	0,014

Ποικιλία ΙΙ, Διαφορές pH 1 – pH 2

ΝΙΚΟΤΙΝΗ	ΝΙΤΡΙΚΑ	ΑΖΩΤΟ	Cd	Cu	Cr	Zn	Pb
0,0001	N.S	N.S	0,000	N.S	N.S	0,01	0,000

Ποικιλία I, Διαφορές χρόνων συλλογής

ΝΙΚΟΤΙΝΗ	ΝΙΤΡΙΚΑ	ΑΖΩΤΟ	Cd	Cu	Cr	Zn	Pb
0,05	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Ποικιλία II, Διαφορές χρόνων συλλογής

ΝΙΚΟΤΙΝΗ	ΝΙΤΡΙΚΑ	ΑΖΩΤΟ	Cd	Cu	Cr	Zn	Pb
0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,008	0,000

Ποικιλία I, Διαφορές ομάδων υποστρώματος

ΝΙΚΟΤΙΝΗ	ΝΙΤΡΙΚΑ	ΑΖΩΤΟ	Cd	Cu	Cr	Zn	Pb
N.S	0,000	0,0001	0,0001	0,000	0,000	0,002	N.S

Ποικιλία II, Διαφορές ομάδων υποστρώματος

ΝΙΚΟΤΙΝΗ	ΝΙΤΡΙΚΑ	ΑΖΩΤΟ	Cd	Cu	Cr	Zn	Pb
0,003	N.S	N.S	0,003	0,000	0,000	0,000	0,03