

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ - Τ.Ε.Ι. ΗΠΕΙΡΟΥ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ:

«Αγροχημεία και Βιολογικές Καλλιέργειες»

**“ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΖΩΤΟΥΧΟΥ ΛΙΠΑΝΣΗΣ ($N-NO_3$) ΣΤΗ
ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΚΑΙ
ΜΠΕΤΑΚΥΑΝΙΝΩΝ ΣΕ ΦΥΤΑ ΠΑΝΤΖΑΡΙΟΥ (*Beta vulgaris* L.)”**

Μεταπτυχιακός σπουδαστής: Παπασάββας Άγγελος

Επιβλέπων Καθηγητής: Σάββας Δημήτριος, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α.

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2008



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	3
1. Το άζωτο.....	3
1.1 Ο κύκλος του αζώτου στη φύση.....	3
1.1.1. Η δέσμευση του ατμοσφαιρικού αζώτου (αζωτοδέσμευση).....	4
1.1.2. Παράγοντες που επηρεάζουν τη δέσμευση του αζώτου μέσω των βακτηρίων στο έδαφος.....	5
1.1.3. Η αποικοδόμηση του οργανικού αζώτου στο έδαφος (νιτροποίηση).....	5
1.1.4. Η μετατροπή των νιτρικών του εδάφους σε ατμοσφαιρικό άζωτο (απονιτροποίηση).....	6
1.1.5. Η διέλευση των νιτρικών μέσα από την τροφική αλυσίδα.....	8
1.1.6. Η απομάκρυνση των νιτρικών του εδάφους μέσω της έκπλυσης.....	8
1.2. Πρόσληψη του αζώτου.....	9
1.2.1. Οι μη συμβιωτικοί οργανισμοί (οργανισμοί που ζουν ελεύθεροι στη φύση).....	9
1.2.2. Οι συμβιωτικοί οργανισμοί.....	9
1.2.3. Βιομηχανική αζωτοδέσμευση.....	10
1.3. Ο ρόλος του αζώτου στα φυτά.....	11
1.3.1. Σχέση χορηγούμενου αζώτου και φυτικής αύξησης.....	11
1.4. Προβλήματα που προκαλούνται από τα νιτρικά και τα νιτρώδη.....	12
1.4.1. Επίδραση νιτρικών και νιτρωδών στην ανθρώπινη υγεία.....	12
1.4.2. Ανώτατα επιτρεπτά όρια συγκέντρωσης νιτρικών στα λαχανικά	14
1.4.3. Το φαινόμενο του ευτροφισμού.....	16
1.4.4. Τα νιτρικά στο συντηρημένο κρέας.....	23
1.4.5. Τοξικότητα των νιτρικών-νιτρωδών στα ζώα.....	24
2. Ο δευτερογενής φυτικός μεταβολισμός.....	27
2.1. Σπουδαιότερες ομάδες δευτερογενών μεταβολιτών.....	27
2.1.1. Τερπένια.....	28
2.1.2. Φαινόλες.....	29
2.1.3. Φλαβονοειδή.....	31
2.1.4. Αλκαλοειδή.....	32
3. Μπεταλαΐνες.....	34
3.1. Χημεία των μπεταλαΐνων.....	36
3.2. Μπετακυανίνες.....	37
3.3 Μπεταξανθίνες.....	38

3.4. Η φυσιολογία των μεταλαϊνών.....	40
3.5. Ιστοκαλλιέργεια.....	41
3.6. Η αποδόμηση των μεταλαϊνών.....	41
4. Το παντζάρι.....	42
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	45
5. Υλικά και μέθοδοι.....	46
5.1. Ανάπτυξη της καλλιέργειας.....	46
5.2. Προσδιορισμός βιομάζας-Χλωροφυλλών.....	47
5.3. Μέτρηση φυσιολογικών παραμέτρων.....	47
5.4. Προσδιορισμός φαινολικών.....	47
6. Αποτελέσματα.....	49
6.1. Επίδραση της συγκέντρωσης των νιτρικών ιόντων του θρεπτικού διαλύματος στην παραγωγή βιομάζας και στην % περιεκτικότητα των φυτών σε νερό.....	51
6.2. Επίδραση της συγκέντρωσης των νιτρικών ιόντων του θρεπτικού διαλύματος στην συγκέντρωση των χλωροφυλλών στα φύλλα.....	53
6.3. Επίδραση της συγκέντρωσης των νιτρικών ιόντων του θρεπτικού διαλύματος στις φυσιολογικές παραμέτρους των φύλλων των φυτών.....	54
6.4. Προσδιορισμός των φαινολικών.....	56
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	67
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	69
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	73

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΤΟ ΑΖΩΤΟ

1.1 Ο ΚΥΚΛΟΣ ΤΟΥ ΑΖΩΤΟΥ ΣΤΗ ΦΥΣΗ

Το άζωτο είναι ένα χημικό στοιχείο που παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς αποτελεί βασικό συστατικό τόσο για τους ζωντανούς οργανισμούς όσο και για την ατμόσφαιρα της οποίας αποτελεί το 78%. Η ατμόσφαιρα, πάνω από μια επιφάνεια 10 στρεμμάτων εδάφους περιέχει 35.000 τόνους στοιχειακό άζωτο. Ονομάστηκε άζωτο γιατί χωρίς αυτό δεν μπορεί να υπάρξει ζωή .

Συμμετέχει στο μόριο των νουκλεοτιδίων και των αμινοξέων που αποτελούν τα δύο δομικά συστατικά των νουκλεϊκών οξέων και των πρωτεϊνών αντίστοιχα καθώς και στο μόριο της χλωροφύλλης.

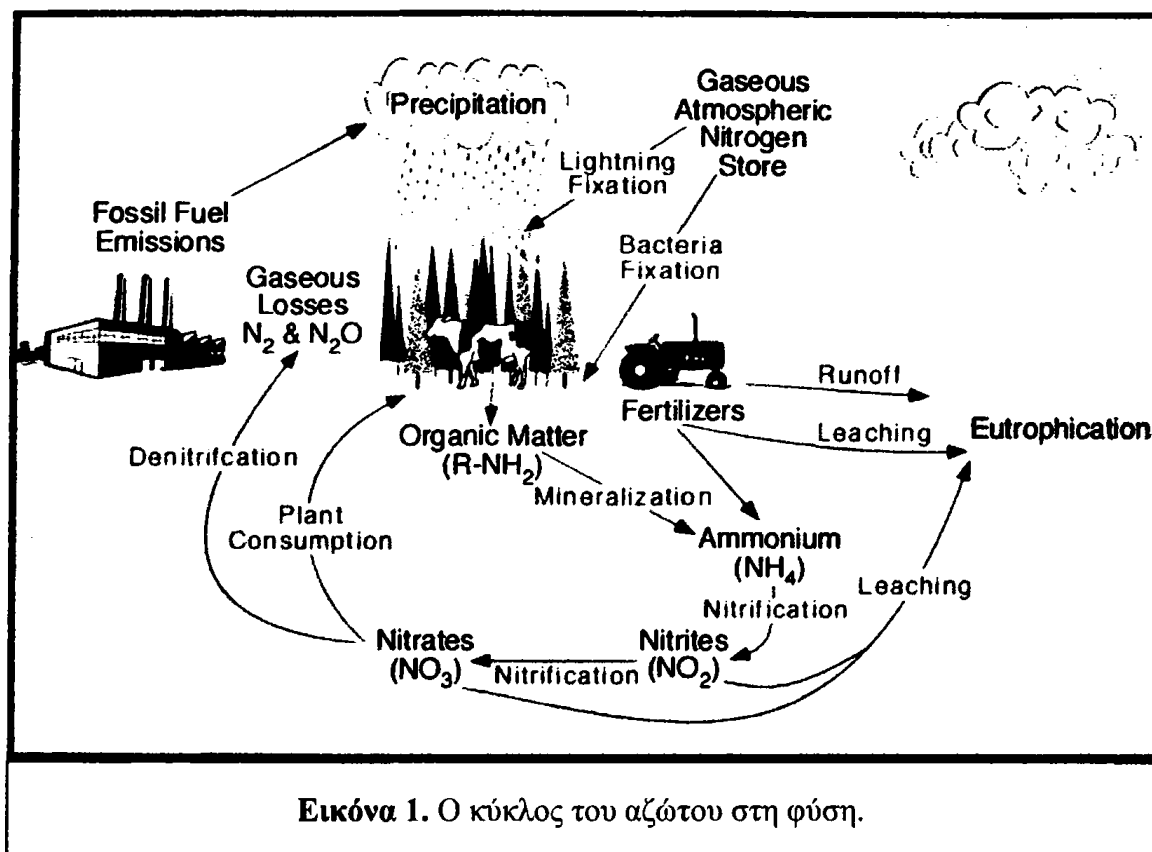
Ο κύκλος του αζώτου αποτελεί παράδειγμα ιδιαίτερα σύνθετου κύκλου και είναι πιθανότατα ο πληρέστερος όλων των κύκλων των θρεπτικών στοιχείων καθώς έχει πολλούς αυτορυθμιζόμενους μηχανισμούς (Εικόνα 1).

Περιλαμβάνει διάφορες αλλαγές από το στοιχειακό ατμοσφαιρικό άζωτο σε ανόργανο, σε οργανικό και αντίστροφα.

Όπως και στην περίπτωση του κύκλου του άνθρακα, η βασική δεξαμενή αποθήκευσης είναι η ατμόσφαιρα ενώ η δεξαμενή ανταλλαγής λειτουργεί ανάμεσα στους οργανισμούς και στο έδαφος. Σε αντίθεση όμως με τον κύκλο του άνθρακα η πρόσληψη του αζώτου από τα φυτά δεν μπορεί να γίνει άμεσα από τον αέρα. Προτού γίνει διαθέσιμο στην δεξαμενή ανταλλαγής πρέπει να πάρει τη μορφή χημικών ενώσεων όπως είναι τα νιτρικά άλατα. Η διαδικασία αυτή εμπεριέχει πολλούς και πολύπλοκους μηχανισμούς.

Οι πολύπλοκες αντιδράσεις που εμπλέκονται στην δέσμευση και στην αποδέσμευση του αζώτου στο σύστημα έδαφος-φυτό διασφαλίζονται από τη δράση διαφορετικών ομάδων βακτηρίων σε τρεις κύριες διαδικασίες: την **αζωτοδέσμευση**, την **νιτροποίηση** και την **απονιτροποίηση**. Οι διαδικασίες αυτές φαίνονται και στην Εικόνα 1. Στη διαδικασία της αζωτοδέσμευσης οι μικροοργανισμοί μετατρέπουν το ατμοσφαιρικό άζωτο σε αμμωνία ή το ενσωματώνουν σε ορισμένους φυτικούς οργανισμούς (συμβιωτικά βακτήρια). Κατά την νιτροποίηση ορισμένα βακτήρια του εδάφους μετατρέπουν την αμμωνία που προέρχεται από την αποσύνθεση των οργανικών

υπολειμμάτων ζώων και φυτών σε νιτρικά τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν άμεσα από τους αυτότροφους οργανισμούς . Τέλος κατά την απονιτροποίηση μέρος του άζωτο που βρίσκεται στο έδαφος ή στα νερά υπό μορφή νιτρικών αποδεσμεύεται και επιστρέφει στην ατμόσφαιρα (απονιτροποιητικά βακτήρια)



1.1.1. Η δέσμευση του ατμοσφαιρικού αζώτου (αζωτοδέσμευση)

Μέσω της δράσης εξειδικευμένων οργανισμών

Η χρησιμοποίηση του N από τους ζωντανούς οργανισμούς για την κάλυψη των αναγκών τους, μέσα από τις τεράστιες δεξαμενές του αέρα ή των νερών δεν είναι μια εύκολη διαδικασία, επειδή ελάχιστες κατηγορίες μικροοργανισμών είναι σε θέση να δεσμεύσουν το άζωτο στη μορφή αυτή και να το χρησιμοποιήσουν άμεσα.

Λειτουργούν είτε μόνοι τους στο έδαφος (π.χ. αζωτοβακτήρια) είτε συμβιωτικά με ένα φυτό, κυρίως με φυτά της οικογένειας των ψυχανθών όπως είναι το τριφύλλι, το μπιζέλι, ο βίκος κ.τ.λ. Τα βακτήρια (π.χ. rhizobium) δεσμεύουν το άζωτο σχηματίζοντας εξογκώματα στις ρίζες, γνωστά ως ριζοφυμάτια. Μέσα στα ριζοφυμάτια παράγονται μέσω της αζωτοδεσμευτικής διαδικασίας νιτρικά ιόντα τα οποία είτε χρησιμοποιούνται από τα φυτά είτε αποβάλλονται στο έδαφος. Για το λόγο αυτό η

καλλιέργεια των ψυχανθών είναι πολύ σημαντική στις αμειψισπορές που γίνονται με στόχο τη διατήρηση της γονιμότητας του εδάφους και τον εμπλουτισμό τους με άζωτο, όταν τα φυτά ενσωματώνονται στο έδαφος λίγο πριν την περίοδο της άνθισής τους.

Μέσω της δράσης των ηλεκτρικών εκκενώσεων

Η ηλεκτρική δραστηριότητα κατά τη διάρκεια των καταιγίδων προκαλεί τη μετατροπή του ατμοσφαιρικού αζώτου σε νιτρικά ιόντα που πέφτουν στο έδαφος με την βροχή. Αυτός ο τύπος δέσμευσης είναι ελάχιστονος σημασίας, όταν συγκρινόμενος με τον αντίστοιχο που οφείλεται στις βιολογικές δραστηριότητες συνεισφέρει κατά ένα πολύ μικρό μόνο ποσοστό στην συνολική ποσότητα νιτρικών που ανακυκλώνονται και κυκλοφορούν στα οικοσυστήματα.

1.1.2. Παράγοντες που επηρεάζουν τη δέσμευση του αζώτου μέσω των βακτηρίων στο έδαφος.

- Το **μολυβδαίνιο** είναι απαραίτητο στοιχείο για τη δέσμευση του αζώτου από τα αζωτοδευμευτικά βακτήρια.
- Κάτω από **pH 4.5** η δέσμευση σταματάει.
- Η δέσμευση αναχαιτίζεται με την **προσθήκη αζωτούχων λιπασμάτων**.
- Η **θερμοκρασία του εδάφους** επιδρά στο ρυθμό δέσμευσης του αζώτου και είναι άριστη όταν κυμαίνεται μεταξύ 25-35°C.
- Ο **κλώνος του βακτηρίου**. Υπάρχουν ειδικοί κλώνοι που εμβολιάζονται στο σπόρο κάθε είδους ψυχανθών (εξειδίκευση στο είδος του φυτού).

Το επίπεδο του ολικού αζώτου στο έδαφος μπορεί να κυμαίνεται από 0,1% έως 1% ή περισσότερο, ενώ εκείνο του νιτρικού αζώτου βρίσκεται μεταξύ 2-20 ppm.

Η ποσότητα του νιτρικού αζώτου στα συνήθη εδάφη είναι πάντοτε μικρή και αποτελεί το προϊόν της ισορροπίας μεταξύ της ταχύτητας του σχηματισμού των νιτρικών και της απομάκρυνσής τους (προσλαμβάνονται κυρίως από τα φυτά και απομακρύνονται με τα νερά της έκπλυσης). Η περιεκτικότητα του εδάφους σε νιτρικά συνήθως παρουσιάζει ένα μέγιστο στις αρχές του καλοκαιριού κατόπιν ελαττώνεται και εμφανίζει ένα δεύτερο μέγιστο στις αρχές του φθινοπώρου.

1.1.3. Η αποικοδόμηση του οργανικού αζώτου στο έδαφος (νιτροποίηση)

Το άζωτο βρίσκεται στους ζωντανούς οργανισμούς, δεσμευμένο σε μεγαλομοριακές ενώσεις πλούσιες σε ενέργεια. Η διάσπαση αυτών των ενώσεων σε νιτρικά, προσφέρει

ενέργεια σε ορισμένους μικροοργανισμούς. Η διαδικασία αυτή της απελευθέρωσης ενέργειας ονομάζεται **αμμωνιοποίηση**. Αποτελείται από πολλά στάδια, που το κάθε ένα πραγματοποιείται με τη βοήθεια βακτηρίων.

Οι πρωτεΐνες μετατρέπονται αρχικά σε αμινοξέα από τα οποία απελευθερώνονται τα μεταλλικά στοιχεία. Η διαδικασία αυτή είναι γνωστή ως **ανοργανοποίηση**. Τα αμινοξέα αποδομούνται περαιτέρω προς αμμωνία ή ιόντα αμμωνίου (αμμωνιοποίηση). Στη συνέχεια ακολουθεί η **νιτροποίηση**, δηλαδή η μετατροπή των αμμωνιακών ιόντων σε νιτρώδη, με την συμμετοχή βακτηρίων του γένους *Nitrosomonas*.



Τα νιτρώδη του εδάφους, μετατρέπονται σε νιτρικά (με τη βοήθεια βακτηρίων του γένους *Nitrobacter*) τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν άμεσα από τους αυτότροφους οργανισμούς.



Και τα δύο είδη των εξειδικευμένων ομάδων βακτηρίων είναι υποχρεωτικά αερόβια, που σημαίνει ότι λειτουργούν μόνο παρουσία οξυγόνου. Επιπλέον είναι αυτότροφα, δηλαδή μπορούν να χρησιμοποιήσουν διάφορα ανόργανα υλικά που μπορούν να οξειδωθούν ως δότες ηλεκτρονίων, για τη παραγωγή της απαιτούμενης σε αυτά μεταβολικής ενέργειας. Στην περίπτωση μας ως δότες ηλεκτρονίων χρησιμοποιούνται τα αμμωνιακά και νιτρώδη ιόντα.

Και τα δύο στάδια της νιτροποίησης απελευθερώνουν ένα σημαντικό ποσό ελεύθερης ενέργειας που είναι περίπου το ίδιο και για τα δύο στάδια.

1.1.4. Η μετατροπή των νιτρικών του εδάφους σε ατμοσφαιρικό άζωτο (απονιτροποίηση).

Απονιτροποίηση είναι η διαδικασία αναγωγής των νιτρικών ιόντων σε νιτρώδη, στη συνέχεια σε οξείδια του αζώτου και τελικά σε άζωτο κατά το παρακάτω σχήμα:



Απουσία οξυγόνου, τα νιτρικά χρησιμοποιούνται από διάφορους μικροοργανισμούς (βακτήρια) σαν ένας εναλλακτικός δέκτης ηλεκτρονίων. Τα βακτήρια αυτά (*Pseudomonas*, *Bacillus*, *Micrococcus* και *Achromobacter*) είναι αναερόβια και

ετερότροφα δηλαδή λαμβάνουν ενέργεια και άνθρακα από την οξείδωση των οργανικών ουσιών. Τα απονιτροποιά βακτήρια ζουν σε μέρη όπως είναι οι εκβολές των ποταμών, οι βυθοί των εύφορων λιμνών, τμήματα του θαλάσσιου βυθού και βαλτώδη εδάφη.

Επίσης είναι συνηθισμένη η αναγωγή των νιτρικών σε αέριο N_2O . Το N_2O είναι ένα σχετικά αδρανές αέριο που δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τα φυτά. Η βιοχημεία του σχηματισμού του δεν έχει ακόμα ερμηνευθεί αλλά φαίνεται ότι προκύπτει από πλευρικές δράσεις κατά την απονιτροποίηση. Σαν αέριο το N_2O συνήθως απελευθερώνεται από το νερό προς την ατμόσφαιρα. Πρέπει να σημειωθεί ότι υπάρχουν αποδείξεις ότι το N_2O σχηματίζεται και κατά την οξείδωση της αμμωνίας σε νιτρικά στα επιφανειακά νερά των ωκεανών. Το υποξείδιο του αζώτου, όπως και τα άλλα οξείδια του έχουν σημαντική συμβολή στην ατμοσφαιρική ρύπανση. Να σημειωθεί ότι η αναλογία του στον αέρα είναι περίπου 0.31 ppm και σύμφωνα με μελέτες, ο ρυθμός αύξησης του είναι 0.25% κάθε χρόνο.

Για να πραγματοποιηθεί η απονιτροποίηση στο έδαφος θα πρέπει να επικρατούν οι ακόλουθες συνθήκες:

- πρέπει να υπάρχει οργανική ύλη για να αποικοδομηθεί.
- ο αέρας του εδάφους πρέπει να περιέχει λιγότερο από 10% οξυγόνο ή λιγότερο από 0.2 mg/l O_2 στο υδατικό διάλυμα.
- θερμοκρασία από 2 έως 50°C, με ευνοϊκότερη τη θερμοκρασία 25 - 35°C
- τα πολύ όξινα εδάφη (pH<5) παρεμποδίζουν τη γρήγορη απονιτροποίηση και δημιουργούν συνθήκες όπου το κυρίαρχο προϊόν της αναγωγής των νιτρικών να είναι το N_2O .

Γενικά στο έδαφος, όταν τα επίπεδα του οξυγόνου είναι πολύ χαμηλά, το τελικό προϊόν της απονιτροποίησης είναι τα αέριο άζωτο (N_2). Αξίζει όμως να σημειωθεί, ότι κάτω από τις μεταβαλλόμενες συνθήκες αερισμού του εδάφους δημιουργούνται επίσης τα αέρια οξείδια του αζώτου N_2O και NO . Η αναλογία ανάμεσα στα διάφορα αέρια προϊόντα της απονιτροποίησης εξαρτάται από το pH, τη θερμοκρασία, την έλλειψη του οξυγόνου και τη συγκέντρωση των νιτρικών και νιτρωδών. Για παράδειγμα η παραγωγή του N_2O ευνοείται όταν η συγκέντρωση των νιτρικών και νιτρωδών είναι υψηλή και η συγκέντρωση του οξυγόνου δεν είναι πολύ χαμηλή. Σε πολύ όξινες συνθήκες σχεδόν ολοκληρωτικά σχηματίζεται N_2O . Το NO βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα και κυρίως σε όξινες συνθήκες.

1.1.5. Η διέλευση των νιτρικών μέσα από την τροφική αλυσίδα

Τα νιτρικά χρησιμοποιούνται από τα φυτά για τη σύνθεση των πρωτεϊνών τους. Προσλαμβάνονται είτε απευθείας από τα ριζοφυμάτια εάν υπάρχουν, είτε από το έδαφος. Τα νιτρικά που αφομοιώνονται από τα φυτά περνούν στο οικοσύστημα μέσω της τροφικής αλυσίδας.

Μέσα σε κάθε ετερότροφο επίπεδο υπάρχει πάντα μερική απώλεια αζώτου κατά την έκκριση νιτρικών ουσιών με τα ούρα και τα περιττώματα. Το αζωτούχο περιεχόμενο της οργανικής ύλης επιστρέφει τελικά στο αβιοτικό τμήμα του οικοσυστήματος όταν αποσυντίθενται οι νεκροί φυτικοί και ζωικοί ιστοί αλλά και τα απορρίμματα.

1.1.6. Η απομάκρυνση των νιτρικών του εδάφους μέσω της έκπλυσης

Εάν τα νιτρικά δεν απορροφηθούν από τα φυτά μπορεί να ξεπλυθούν από το έδαφος μέσω των βροχών. Με τον τρόπο αυτό τα νιτρικά μεταφέρονται στα ποτάμια και τελικά χάνονται στις λίμνες και στα ρηχά θαλάσσια ιζήματα.

Σε ορισμένες περιοχές, όπως για παράδειγμα έξω από τις ακτές του Περού υπάρχουν θαλάσσια ρεύματα που αναμιγνύουν το νερό και εμπλουτίζουν τα θαλάσσια οικοσυστήματα. Τα νιτρικά μπορεί να περάσουν στις θαλάσσιες τροφικές αλυσίδες και να επιτρέψουν στη στεριά με τα περιττώματα που πέφτουν από τα θαλασσοπούλια, ακολουθώντας τον παρακάτω κύκλο:

$\text{NO}_3^- \rightarrow \text{εδαφικό νερό} \rightarrow \text{λίμνες, θάλασσες και ωκεανοί} \rightarrow \text{πλαγκτόν} \rightarrow \text{ψάρια} \rightarrow \text{πουλιά} \rightarrow \text{NO}_3^- \text{ εδάφους}$

Τα περιττώματα αυτά, γνωστά με το όνομα Γκουανό αποτελούσαν κάποτε μια πολύ βασική πηγή αζωτούχου λίπανσης.

Από το άζωτο που είναι δεσμευμένο στο πλαγκτόν και τους υδρόβιους οργανισμούς ένα μέρος του δεν επιστρέφει στα χερσαία οικοσυστήματα αλλά εναποτίθεται στον βυθό της θάλασσας και μένει εκεί αδραντοποιημένο. Η απώλεια αυτή αντισταθμίζεται εν μέρει από την απελευθέρωση αερίου αζώτου από τα ηφαίστεια.

Η χρήση των συνθετικών νιτρικών λιπασμάτων σε τεράστιες ποσότητες έχει επιταχύνει τη διαδικασία απώλειας των νιτρικών με την έκπλυση και έχει δημιουργήσει μια εν δυνάμει ανισορροπία στο σύστημα (φαινόμενα ευτροφισμού).

1.2. ΠΡΟΣΛΗΨΗ ΤΟΥ ΑΖΩΤΟΥ

Αν και πιστεύεται ότι η μεγαλύτερη πηγή αζώτου είναι η ατμόσφαιρα (περίπου $3,8 \cdot 10^{15}$ τόνοι μοριακού αζώτου) εντούτοις τα μεγαλύτερα ποσά είναι δεσμευμένα στο στερεό φλοιό της γης και τα ιζήματα (περίπου $18 \cdot 10^{15}$ τόνοι). Παρά τις μεγάλες ποσότητες αζώτου στο έδαφος ελάχιστα ποσά απελευθερώνονται (και από αυτά πάλλι πολύ μικρά ποσοστά είναι διαθέσιμα στα φυτά). Για τους αυτότροφους οργανισμούς η βασικότερη πηγή αζώτου είναι τα νιτρικά άλατα του εδάφους, μορφή με την οποία συνήθως απελευθερώνεται και διατίθεται στα φυτά. Το εδαφικό άζωτο που χρησιμοποιείται από τα φυτά προέρχεται κυρίως από τα χημικά λιπάσματα και δευτερευόντως από οργανικές ουσίες που ενσωματώνονται στο έδαφος και αποσυντίθενται ή από τη δράση ορισμένων μικροοργανισμών που προσλαμβάνουν ατμοσφαιρικό άζωτο και σχηματίζουν πρωτεΐνες και πιθανά άλλες αζωτούχες ουσίες μέσα στο σώμα τους.

Υπάρχουν δυο τύποι μικροοργανισμών που είναι υπεύθυνοι για τη δέσμευση του αζώτου στο έδαφος .

1.2.1. Οι μη συμβιωτικοί οργανισμοί (οργανισμοί που ζουν ελεύθεροι στη φύση)

Στους μικροοργανισμούς αυτούς υπάγονται:

- Κλοστρίδια. Είναι αναερόβιοι οργανισμοί που βρίσκονται συνήθως στα δασικά εδάφη.
- Αζωτοβακτήρια. Είναι αερόβιοι οργανισμοί που συναντώνται γενικά σε $pH > 4,0$
- Κυανοπράσινα φύκη.

1.2.2. Οι συμβιωτικοί οργανισμοί

Είναι κυρίως είδη του *rhizobium s.p.* (αζωτοδεσμευτικά βακτήρια) που συμβιούν με τα φυτά της οικογένειας των ψυχανθών.

Το άζωτο δεσμεύεται μέσω των βακτηρίων αυτών στα φυμάτια των ριζών όπου μετατρέπεται σε αμμωνιακό.

Πριν όμως μεταβολιστεί πρέπει να αναχθούν σε NH_3 . Η διαδικασία αυτή ονομάζεται αναγωγή του αζώτου και συνίσταται βασικά από τα εξής δύο στάδια:

α) αναγωγή του NO_3 σε NO_2 και

β) αναγωγή του NO_2 σε NH_3

Ο μηχανισμός, με τον οποίο γίνεται η αφομοίωση των NO_3 ιόντων στους ιστούς των πράσινων φυτών και κυρίως στα φύλλα απαιτεί την παρουσία φωτός.

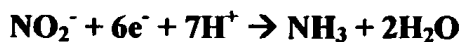
Τα δύο ένζυμα που συμμετέχουν στη διαδικασία αυτή είναι η ρεδουκτάση των νιτρικών (nitrate reductase) και η ρεδουκτάση των νιτρωδών (nitrite reductase).

Η ρεδουκτάση των νιτρικών καταλύει την αναγωγή των NO_3^- σε NO_2^- ιόντα και πραγματοποιείται μέσα στο κυτόπλασμα, μεταφέροντας δύο ηλεκτρόνια από το NADH ή NADPH στο N των νιτρικών ιόντων, κατά το σχήμα :



Ιδιαίτερο βάρος έχει δοθεί στη σημασία της δράσης του ενζύμου, καθότι από αυτό εξαρτάται η σύνθεση των πρωτεϊνών αλλά και η συσσώρευση των νιτρικών στα φύλλα των φυτών.

Αμέσως μετά τον σχηματισμό τους, τα νιτρώδη ιόντα που παράγονται ανάγονται σε αμμωνία μέσω ενός άλλου ενζυμικού συστήματος το οποίο ονομάζεται ρεδουκτάση των νιτρωδών (nitrite reductase), σύμφωνα με την αντίδραση:



Τέλος η αμμωνία (η οποία είναι τοξική για τα κύτταρα) μεταβολίζεται άμεσα και τα προϊόντα του μεταβολισμού τους χρησιμοποιούνται για την βιοσύνθεση των αζωτούχων ενώσεων στα κύτταρα.

1.2.3. Βιομηχανική αζωτοδέσμευση

Η βιομηχανική αζωτοδέσμευση είναι ένας ακόμα τρόπος δέσμευσης του ατμοσφαιρικού αζώτου, ο οποίος οφείλεται αποκλειστικά στην ανθρώπινη δραστηριότητα. Συγκεκριμένα, κατά τη διαδικασία παραγωγής λιπασμάτων δεσμεύεται ατμοσφαιρικό άζωτο σε συνθήκες μεγάλης πίεσης και θερμοκρασίας, και μετατρέπεται τελικά σε αμμωνία ή νιτρική αμμωνία, η οποία χρησιμοποιείται ως λίπασμα στις γεωργικές καλλιέργειες. Η βιομηχανική δέσμευση του αζώτου είναι τόσο έντονη ώστε το άζωτο που δεσμεύεται από την ατμόσφαιρα είναι πλέον περισσότερο από το άζωτο που απελευθερώνεται στην ατμόσφαιρα από τα απονιτροποιητικά βακτήρια. Είναι χαρακτηριστικό ότι πάνω από το μισό της συνολικής αζωτοδέσμευσης οφείλεται στη σύγχρονη γεωργία, είτε εξαιτίας της βιομηχανικής αζωτοδεύσεως, είτε εξαιτίας της αύξησης καλλιέργειας ψυχανθών όπως η σόγια. Αυτό σημαίνει ότι η συγκέντρωση αζώτου στην ατμόσφαιρα θα αρχίσει πιθανά να μειώνεται. Δεν αποκλείεται όμως η περίσσεια αμμωνιακών αλάτων στα γήινα οικοσυστήματα να προκαλέσει τελικά αύξηση της δράσης των απονιτροποιητών και έτσι να αποκατασταθεί η ποσοτική ισορροπία του ατμοσφαιρικού αζώτου.

1.3. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΑΖΩΤΟΥ ΣΤΑ ΦΥΤΑ

Τα αζωτούχα λιπάσματα παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον στη γεωργία, αφού βρέθηκε ότι η αύξηση και η παραγωγικότητα των φυτών επηρεάζεται κατά μεγάλο ποσοστό από τη διαθεσιμότητα του αζώτου. Η έλλειψη του αζώτου είναι από τα πιο συνήθη φαινόμενα, που παρατηρούνται στις καλλιέργειες επηρεάζοντας άμεσα την παραγωγικότητα των φυτών. Επειδή συμμετέχει στην πρωτεϊνοσύνθεση, αλλά κυρίως στη δομή της χλωροφύλλης, τα συμπτώματα της έλλειψής του εμφανίζονται υπό μορφή χλώρωσης. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται κυρίως στα ηλικιωμένα κατώτερα φύλλα τα οποία κιτρινίζουν και πέφτουν. Τα νεώτερα φύλλα μπορεί να μην εμφανίζουν αρχικά αυτά τα συμπτώματα, επειδή το άζωτο είναι ευκίνητο στοιχείο και μετακινείται εύκολα από τα παλαιότερα προς τα νεώτερα φύλλα που το έχουν ανάγκη. Έτσι η έλλειψη του αζώτου σε ένα φυτό μπορεί να προσδίδει ελαφρώς πράσινο χρώμα στα ανώτερα φύλλα και κίτρινο στα κατώτερα. Παράλληλα με την χλώρωση αναπτύσσονται ανθοκυανίνες στους μίσχους και κατά μήκος των νεύρων του πλατύσματος των φύλλων. Ένα άλλο επίσης σύμπτωμα έλλειψης αζώτου είναι η αναστολή της αύξησης των μερών του φυτού και κυρίως των πλευρικών κλάδων επειδή αδρανοποιούνται οι πλευρικοί οφθαλμοί. Αντίθετα αύξηση της ποσότητας του αζώτου συνεπάγεται εντονότερη αύξηση του βλαστού και των φύλλων με ταυτόχρονη όμως βράχυνση της ρίζας.

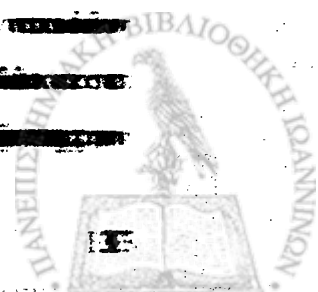
1.3.1. Σχέση χορηγούμενου αζώτου και φυτικής αύξησης

Από πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στο πεδίο αυτό διαπιστώθηκε ότι από όλα τα θρεπτικά στοιχεία που χρησιμοποιούνται για τη βελτίωση του εδάφους το άζωτο προκαλεί τις πιο εντυπωσιακές μεταβολές στην παραγωγικότητα. Η διαπίστωση αυτή ισχύει για την πλειονότητα των καλλιεργούμενων ειδών. Παρόλο που η παραγωγικότητα επηρεάζεται από την απουσία αζωτούχων θρεπτικών ουσιών, εντούτοις η αιτία αυτή δεν πρέπει να θεωρείται και η μοναδική αφού η σύσταση του εδάφους, οι συνθήκες του περιβάλλοντος και τα είδη που καλλιεργούνται, αποτελούν επίσης καθοριστικούς παράγοντες.

Είναι γνωστό επίσης πως οι απαιτήσεις των φυτών σε άζωτο ποικίλουν μεταξύ των ειδών. Διαπιστώθηκε ότι οι απαιτήσεις αυτές κυμαίνονται γενικά μεταξύ 2 και 5% του ξηρού βάρους των φυτών. Όταν η παροχή αζώτου είναι μικρότερη της άριστης (τροφοπενία αζώτου) η αύξηση επιβραδύνεται, ενώ παράλληλα αρχίζουν να εκδηλώνονται πρόωρα συμπτώματα γήρατος των παλαιότερων φύλλων. Αύξηση στη χορηγούμενη ποσότητα του αζώτου έχει ως αποτέλεσμα την επιβράδυνση του γήρατος

THE TWO MOST IMPORTANT ASPECTS OF THE CONSTITUTION ARE THE PROTECTION OF THE INDIVIDUAL FROM THE ABUSE OF POWER BY THE GOVERNMENT AND THE PROTECTION OF THE GOVERNMENT FROM THE ABUSE OF POWER BY THE INDIVIDUAL. THE FIRST OF THESE ASPECTS IS THE PROTECTION OF THE INDIVIDUAL FROM THE ABUSE OF POWER BY THE GOVERNMENT. THE SECOND OF THESE ASPECTS IS THE PROTECTION OF THE GOVERNMENT FROM THE ABUSE OF POWER BY THE INDIVIDUAL.

H U S S I A N O T T E R M I N A T I O N V I C T I M S O T H E A S I A T I C K I L L O T H E K O R E A N V I C T I M S O T H E C O M M U N I S T
 O P P R E S S I O N I N T E R N A T I O N A L I E C O M M U N I S T S T A N D A R D T H I S C O M M I T T E E I F W I L L T H E A R R I V E T H E
 V I C T I M S T H E S I M I L A R O T H E C O M M U N I S T I N T E R N A T I O N A L I E C O M M U N I S T S T A N D A R D
 V I C T I M S (H I C H I N T E R N A T I O N A L I E C O M M U N I S T S T A N D A R D V I C T I M S T H E S I M I L A R O T H E C O M M U N I S T
 T H E S I M I L A R I N T E R N A T I O N A L I E C O M M U N I S T S T A N D A R D V I C T I M S T H E S I M I L A R O T H E C O M M U N I S T
 S T A N D A R D V I C T I M S T H E S I M I L A R O T H E C O M M U N I S T S T A N D A R D V I C T I M S T H E S I M I L A R O T H E C O M M U N I S T



μεταφορά του O_2 στο αίμα. Επιπλέον η παρουσία υψηλής συγκέντρωσης νιτρωδών στο στομάχι έχει ενοχοποιηθεί και για ορισμένες περιπτώσεις καρκίνου κυρίως μέσω της παραγωγής των καρκινογόνων νιτροζαμινών.

Η χρόνια κατανάλωση υψηλής συγκέντρωσης νιτρικών μπορεί να προκαλέσει σοβαρά προβλήματα υγείας για παράδειγμα καρκινογενέσεις και τερατογενέσεις. Τα νιτρώδη στο στομάχι αντιδρώντας με διάφορες αμίνες παράγουν τις ενεχόμενες για πολλές περιπτώσεις καρκίνου νιτροζαμίνες.

Διατροφικά πειράματα ταυτόχρονης κατανάλωσης λαχανικών (πλούσιων σε νιτρικά) και ψαριών (με υψηλή συγκέντρωση αμινών) στα ίδια γεύματα απέδειξαν σημαντικά αυξημένη παραγωγή των καρκινογόνων νιτροζαμινών. Μελέτες της επίδρασης των υπολειμμάτων νιτρικών του πόσιμου νερού στον όγκο και στη λειτουργία του θηροειδούς αδένος σε ανθρώπινους πληθυσμούς που εκτέθηκαν σε διαφορετικά επίπεδα νιτρικών (στο νερό που κατανάλωναν) έδειξαν την ανάπτυξη υπερτροφίας του θηροειδούς σε ομάδες που καταναλώναν υψηλές συγκεντρώσεις νιτρικών και ιδιαίτερα σε αυτές που ξεπερνούσαν τα 50 mg/lit.

1.4.1.1. Νιτρικά και μεθαιμογλοβιναιμία

Η μεθαιμογλοβιναιμία είναι ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα στην ανθρώπινη υγεία που συνδέεται με την συγκέντρωση νιτρικών στα νερά και στα τρόφιμα.

Τα νιτρικά δεν προκαλούν φυσιολογικά προβλήματα στην ανθρώπινη υγεία εκτός αν αναχθούν σε νιτρώδη.

Ένα μέρος των νιτρικών που εισέρχονται μέσω της διατροφής και του νερού στο στομάχι μετατρέπονται *in vivo* μέσω βακτηρίων σε νιτρώδη. Παρουσία νιτρωδών η αιμογλοβίνη (η ένωση που μεταφέρει οξυγόνο στο αίμα) μετατρέπεται σε μεθαιμογλοβίνη, χάνοντας αυτή της την ιδιότητα .

Στο αίμα των ενηλίκων ,τα ένζυμα μετατρέπουν συνεχώς την μεθαιμογλοβίνη πάλι σε αιμογλοβίνη, ώστε τα επίπεδα της πρώτης να μην ξεπερνούν το 1%. Αντίθετα στα βρέφη, που έχουν χαμηλότερα επίπεδα των απαραίτητων ενζύμων (περίπου 60%), τα επίπεδα της μεθαιμογλοβίνης είναι συνήθως 1 με 2%.

Πάνω από αυτά τα επίπεδα προκαλείται μεθαιμογλοβιναιμία. Τα βρέφη καταναλώνουν επιπλέον μεγάλες ποσότητες νερού σε σχέση με το βάρος τους και ιδιαίτερα όταν το νερό χρησιμοποιείτε ως διαλύτης της στερεάς τροφής ή των χυμών. Για τους λόγους αυτούς είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα και προσβάλλονται ευκολότερα από τους ενήλικες.

Μεθαιμογλοβιναιμία ορίζεται η κατάσταση στην οποία τα ερυθρά αιμοσφαίρια χάνουν την ικανότητα τους να μεταφέρουν ικανοποιητικές ποσότητες O_2 στα σωματικά κύτταρα. Τα συμπτώματά που προκαλούν είναι κυάνωση γύρω από το στόμα, τα χέρια και τα πόδια, προβλήματα αναπνοής, διάρροια κ.λ.π. Τα δείγματα αίματος ενός βρέφους με αυτά τα συμπτώματα είναι καφέ και σε ποιο βαριές περιπτώσεις ακολουθεί λήθαργος, απώλεια συνείδησης και θάνατος.

Μετά την διάγνωση η μεθαιμογλοβίνη μπορεί να αντιστραφεί, αν και είναι πιθανό η ανοξία να έχει ήδη προκαλέσει μόνιμες βλάβες, κυρίως εγκεφαλικές. Η χρήση νερού με χαμηλά νιτρικά μπορεί να επαναφέρει την μεθαιμογλοβίνη σε αιμογλοβίνη σε δυο με τρεις ημέρες. Σε βαριές περιπτώσεις χρησιμοποιείται διάλυμα methylene blue .

Τα όρια που έχουν τεθεί από την (EPA) –Environmental protection Agency των 10 mg/l ή 10 ppm $NO_3 - N$ είναι ασφαλή για το πόσιμο νερό τόσο για τους ενήλικες όσο και για τα βρέφη. Εκτός από τα βρέφη ευαισθησία παρουσιάζεται και στις έγκυες γυναίκες, σε αυτές που θηλάζουν και σε ορισμένους ενήλικες με ιδιαίτερα προβλήματα. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται στις ποσότητες πράσινων λαχανικών που καταναλώνονται από τις ευαίσθητες ομάδες με δεδομένο ότι το 80 με 90% των εισροών νιτρικών προέρχεται από τα λαχανικά και το άλλο 10-20 % από το νερό και το συντηρημένο κρέας.

Περιπτώσεις μεθαιμοσφαιριναιμίας σε βρέφη έχουν αναφερθεί τόσο στις ΗΠΑ όσο και στην Ευρώπη και σε όλες η συγκέντρωση νιτρικών στο πόσιμο νερό ήταν πολύ υψηλότερες των ορίων ασφάλειας .

Επίσης περιπτώσεις μεθαιμοσφαιριναιμίας έχουν αναφερθεί σε βρέφη που διατρέφονται με αλεσμένα πράσινα λαχανικά .

Το μητρικό γάλα δεν περιέχει μεγάλες συγκεντρώσεις νιτρικών κάτω από φυσιολογικές συνθήκες διατροφής. Στην Γερμανία συστήνεται τόσο στις εγκύους όσο και στις θηλάζουσες μητέρες η αποφυγή κατανάλωσης μεγάλων ποσοτήτων νωπών λαχανικών. Επίσης η διατροφή των βρεφών με νωπά λαχανικά πρέπει να αποφεύγεται.

Τεχνολογικές μέθοδοι μείωσης των νιτρικών στις τροφές έχουν αναπτυχθεί με την χρήση βιταμινών, ιχνοστοιχείων και υδατανθράκων. Το μεγαλύτερο μέρος των νιτρικών απομακρύνεται από τα λαχανικά μετά το βρασμό τους στο νερό .

1.4.2. Ανώτατα επιτρεπτά όρια συγκέντρωσης νιτρικών στα λαχανικά

Η ανησυχία για τις πιθανές επιπτώσεις των νιτρικών στην ανθρώπινη υγεία οδήγησε την Ευρωπαϊκή Κοινότητα να προτείνει μια σειρά κανονισμών, από το 1993 έως και

σήμερα, οι οποίοι εξειδικεύουν τα μέγιστα επιτρεπτά όρια της συγκέντρωσης νιτρικών σε 2 βασικά φυλλώδη λαχανικά, το μαρούλι και το σπανάκι. Τα όρια που προτάθηκαν στον Κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1822/2005 της Επιτροπής των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων φαίνονται στον πίνακα 1.

9.11.2005

EL

Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης

L 293/13

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Το τμήμα 1 του παραρτήματος I του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 466/2001 αντικαθίσταται από το ακόλουθο:

«Τμήμα 1: Νιτρικά άλατα

Προϊόν	Μέγιστο επίπεδο (mg NO ₃ /kg)	Μέθοδος δειγματοληψίας	Μέθοδος ανάλυσης αναφοράς
1.1. Νωπά σπανάκια (*) (<i>Spinacia oleracea</i>)	Συγκομιδής από 1ης Οκτωβρίου έως 31 Μαρτίου 3 000 Συγκομιδής από 1ης Απριλίου έως 30 Σεπτεμβρίου 2 500	Οδηγία 2002/63/ΕΚ (2)	
1.2. Σπανάκια συντηρημένα, κατεψυγμένα ή βελτίδιας ψύξης	2 000	Οδηγία 2002/63/ΕΚ	
1.3. Νωπά μαρούλια (<i>Lactuca sativa</i> L.) (μαρούλια προστατευόμενης και ελεύθερης καλλιέργειας) εξαιρεμένου του μαρουλιού που αναφέρεται στο σημείο 1.4.	Συγκομιδής από 1ης Οκτωβρίου έως 31 Μαρτίου: Μαρούλια που καλλιεργήθηκαν κάτω από κάλυψη 4 500 (3) Μαρούλια που καλλιεργήθηκαν στην ελεύθερη ατμόσφαιρα 4 000 (3) Συγκομιδής από 1ης Απριλίου έως 30 Σεπτεμβρίου: Μαρούλια που καλλιεργήθηκαν κάτω από κάλυψη 3 500 (3) Μαρούλια που καλλιεργήθηκαν στην ελεύθερη ατμόσφαιρα 2 500 (3)	Οδηγία 2002/63/ΕΚ. Εντούτοις, ο ελάχιστος αριθμός μονάδων ανά εργαστηριακό δείγμα είναι 10	
1.4. Μαρούλια τύπου «iceberg» (4)	Μαρούλια που καλλιεργήθηκαν κάτω από κάλυψη 2 500 (3) Μαρούλια που καλλιεργήθηκαν στην ελεύθερη ατμόσφαιρα 2 000 (3)	Οδηγία 2002/63/ΕΚ. Εντούτοις, ο ελάχιστος αριθμός μονάδων ανά εργαστηριακό δείγμα είναι 10	
1.5. Βρεφικές τροφές και επεξεργασμένα τρόφιμα με βάση τα δημητριακά για βρέφη και μικρά παιδιά (5) (6)	200	Οδηγία 2002/63/ΕΚ (διατάξεις όπως προβλέπονται για μεταποιημένες τροφές φυτικής προέλευσης και για μεταποιημένες τροφές ζωικής προέλευσης)	

(1) Τα μέγιστα επίπεδα για τα νωπά σπανάκια δεν εφαρμόζονται για τα νωπά σπανάκια που πρόκειται να υποβληθούν σε επεξεργασία και τα οποία μεταφέρονται χύμα απευθείας από τον αγρό στην μονάδα επεξεργασίας.

(2) ΕΕ L 187 της 16.7.2002, σ. 30.

(3) Σε περίπτωση απουσίας της κατάλληλης επισήμανσης, αναφέρονται την μέθοδο παραγωγής, εφαρμόζεται το επίπεδο που ισχύει για την περίπτωση μαρουλιών καλλιεργημένων σε ελεύθερη ατμόσφαιρα.

(4) Περιγράφεται στον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1543/2001 της Επιτροπής, της 27ης Ιουλίου 2001, για τον καθορισμό της εμπορικής προδιαγραφής που εφαρμόζεται στα μαρούλια, στα καυσαρά αντίδια και στα πλατύφυλλα αντίδια (ΕΕ L 203 της 28.7.2001, σ. 9).

(5) Παιδικές τροφές για βρέφη και μικρά παιδιά και μεταποιημένες τροφές με βάση τα δημητριακά, όπως ορίζεται στο άρθρο 1 της οδηγίας 96/5/ΕΚ, Ευρώπης της Επιτροπής, της 16ης Φεβρουαρίου 1996, για τις μεταποιημένες τροφές με βάση τα δημητριακά και τις παιδικές τροφές για βρέφη και μικρά παιδιά (ΕΕ L 49 της 28.2.1996, σ. 17). Τα μέγιστα επίπεδα θα πρέπει να εφαρμόζονται στα προϊόντα όπως προτείνονται έτοιμα προς κατανάλωση ή όπως γίνεται η αναπύκνυσή τους σύμφωνα με τις οδηγίες των παραγωγών.

(6) Η Επιτροπή θα αναθεωρήσει τα μέγιστα επίπεδα των νιτρικών αλάτων στα τρόφιμα για βρέφη και μικρά παιδιά μέχρι την 1η Απριλίου 2006 λαμβάνοντας υπόψη την πρόοδο των επιστημονικών και τεχνολογικών γνώσεων.

Πίνακας 1 Τα ανώτατα επιτρεπτά όρια συγκέντρωσης νιτρικών στα λαχανικά που προτάθηκαν με τον Κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1822/2005 της Επιτροπής των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων

Τα ανώτατα επιτρεπτά όρια συγκέντρωσης νιτρικών στα λαχανικά που προτάθηκαν με τον Κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1822/2005 της Επιτροπής των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων είναι ψηλότερα κατά την διάρκεια του χειμώνα. Αυτό συμβαίνει επειδή η συσσώρευση των νιτρικών στα φύλλα είναι υψηλότερη κάτω από συνθήκες μειωμένης ηλιοφάνειας. Τα νιτρικά που απορροφώνται από το ριζικό σύστημα μεταφέρονται στα φύλλα των φυτών όπου μεταβολίζονται μέσω της ρεδουκτάσης των νιτρικών και της ρεδουκτάσης των νιτρωδών (ένζυμα φωτοενεργοποιούμενα) σε νιτρώδη και αμμωνία αντίστοιχα, η οποία στην συνέχεια μεταβολίζεται άμεσα σε α-κετογλουταρικό οξύ και από εκεί σε αζωτούχες ενώσεις. Ο μειωμένος φωτισμός του χειμώνα έχει σαν αποτέλεσμα την χαμηλή δραστηριότητα των παραπάνω ενζύμων που οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα νιτρικών στα φύλλα. Το φαινόμενο αυτό είναι ιδιαίτερα έντονο στις χώρες της Β. Ευρώπης σε σχέση με το νότιο τμήμα της όπου επικρατεί αρκετή ηλιοφάνεια κατά την διάρκεια του χειμώνα. Τα ανώτατα επιτρεπτά όρια που έχουν τεθεί με βάση τις χώρες της Β. Ευρώπης δεν συναντώνται εύκολα στις μεσογειακές χώρες. Ιδιαίτερα στην Ελλάδα δεν έχουν βρεθεί δείγματα που να ξεπερνούν τα ανώτατα επιτρεπτά όρια και κατά μέσο όρο οι μετρούμενες συγκεντρώσεις νιτρικών είναι χαμηλότερες από αυτά.

1.4.3. Το φαινόμενο του ευτροφισμού

Η διάθεση των επεξεργασμένων αστικών και βιομηχανικών αποβλήτων σε υδάτινους αποδέκτες, καθώς και η χρήση λιπασμάτων πλούσιων σε νιτρικά και φωσφορικά άλατα, τα οποία δεν αφομοιώνονται από τα φυτά και παρασύρονται με τα νερά της βροχής στις λίμνες στα ποτάμια και στις θάλασσες, δημιουργούν τις κατάλληλες συνθήκες για την ανάπτυξη και επιτάχυνση του φαινομένου του ευτροφισμού.

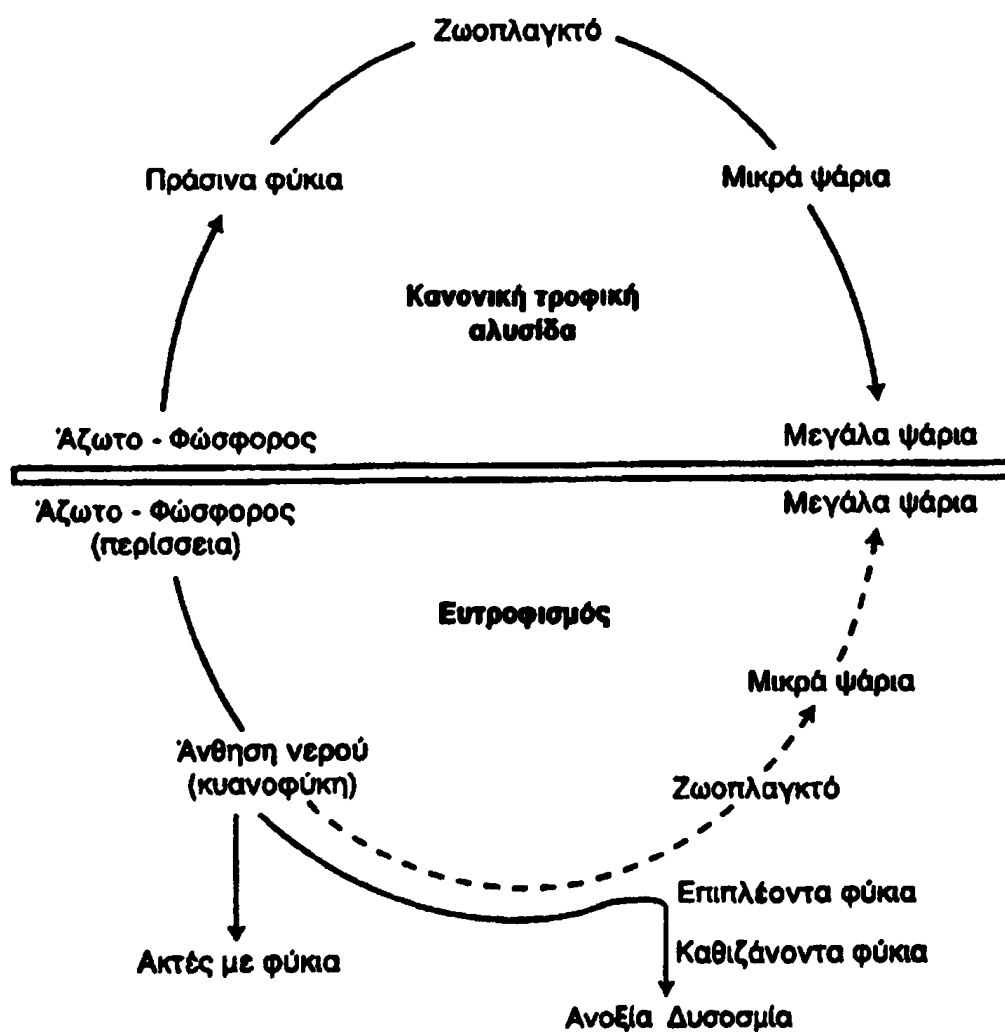
Το φαινόμενο του ευτροφισμού παρουσιάζεται εδώ και χιλιάδες χρόνια στη φύση ως φυσική διεργασία, κατά την οποία ένας υδάτινος φορέας εμπλουτίζεται σε θρεπτικά άλατα. Η διεργασία αυτή επιταχύνθηκε από τις ανθρώπινες δραστηριότητες κυρίως με τη μεγάλη χρήση χημικών λιπασμάτων.

Η Ευρωπαϊκή Ένωση προσπαθεί να αντιμετωπίσει το πρόβλημα με διάφορα προγράμματα, ελέγχοντας και παρατηρώντας την παρουσία του φαινομένου σε κάθε χώρα ξεχωριστά. Δείγματα ευτροφισμού στον Ελληνικό χώρο μπορεί να γίνουν αντιληπτά στις λίμνες των Ιωαννίνων, της Κερκίνης, στο Παγασητικό κόλπο κ.α

1.4.3.1. Διεργασία του ευτροφισμού

Οι αυτότροφοι οργανισμοί (παραγωγοί) που παρουσιάζονται στα υδάτινα οικοσυστήματα, έχουν τη δυνατότητα να μετατρέπουν ανόργανες ενώσεις όπως CO_2 , NO_3^- και PO_4^{3-} σε διάφορες οργανικές ενώσεις π.χ. πρωτεΐνες. Χαρακτηριστικοί αυτότροφοι οργανισμοί είναι τα άλγη που υπάρχουν στα νερά (φυτοπλαγκτόν, φύκη κ.ά.). Οι ετερότροφοι οργανισμοί (καταναλωτές) καταναλώνουν οργανικές ουσίες που παράγουν οι αυτότροφοι και παράγουν δικές τους πολύπλοκες ενώσεις που αποτελούν τη βιομάζα τους (ζωοπλαγκτόν, μικρά ψάρια κ.ά.).

Ο εμπλουτισμός των νερών σε θρεπτικά συστατικά αζώτου και φωσφόρου ανατρέπει τη φυσιολογική ροή της τροφικής αλυσίδας και δημιουργεί εκρηκτική αύξηση των αλγών (Εικόνα 2). Τα είδη των αλγών (κυανοφύκη) που κατά κανόνα σχηματίζονται είναι ακατάλληλα ως τροφή του ζωοπλαγκτού και παράλληλα καταπνίγουν την ανάπτυξη άλλων οργανισμών.



Εικόνα 2: Ανατροπή της ισορροπίας της τροφικής αλυσίδας λόγω ευτροφισμού

Η αύξηση των πληθυσμών των υδρόβιων φωτοσυνθετικών οργανισμών οδηγεί σε ανάλογη αύξηση των καταναλωτών και των αποδομητών και κατά συνέπεια σε αύξηση των απαιτήσεων τους σε οξυγόνο ώστε να καλυφθούν οι ανάγκες της αναπνοής τους. Στη συνέχεια οι αποδομητές θα χρησιμοποιήσουν όλο σχεδόν το διαλυμένο στο νερό οξυγόνο για να ανοργανοποιήσουν τη νεκρή κυρίως βιομάζα που θα συσσωρευτεί, γεγονός που μπορεί να προκαλέσει το θάνατο άλλων οργανισμών από έλλειψη οξυγόνου.

Επίσης η υπεραύξηση των παραγωγών (καλαμιών, φυκών κ.α.) στην επιφάνεια του νερού, ελαττώνει την είσοδο του φωτός στα κατώτερα στρώματα, γεγονός που μειώνει ή και αναστέλλει τη φωτοσύνθεση και επομένως την παραγωγή οξυγόνου κάτω από την επιφάνεια. Έτσι, δευτερογενώς, δημιουργείται ακόμη μεγαλύτερο πρόβλημα έλλειψης οξυγόνου για τα ψάρια πολλά από τα οποία οδηγούνται σε ασφυξία.

Η εμφάνιση του νερού είναι θολή, φαιοπράσινη και γενικά δίνει την εικόνα του βρώμικου. Τα νεκρά φύκη κατατάσσονται στον πυθμένα, όπου αποικοδομούνται και προκαλούν ελάττωση του διαλυμένου οξυγόνου. Αυτό έχει ως άμεση συνέπεια την επικράτηση των αναερόβιων διασπάσεων που οδηγούν στη δημιουργία δυσοσμίας (μυρωδιά H_2S), και τη παρατήρηση νεκρών ψαριών στην επιφάνεια.

1.4.3.2. Είδη ευτροφισμού

Ο ευτροφισμός εμφανίζεται συχνότερα σε στάσιμα νερά, όπως οι λίμνες, και όχι σε κινούμενα (ποτάμια και εκβολές). Στα νερά των ποταμών και λιμνών εξαρτάται κατά κύριο λόγο από τα άλατα του φωσφόρου. Αντίθετα, στη θάλασσα, ως περιοριστικός παράγοντας θεωρούνται οι ενώσεις του αζώτου.

Ανάλογα με τη συγκέντρωση των θρεπτικών συστατικών οι λίμνες κατατάσσονται σε 4 βαθμίδες τροφισμού.

Ολιγοτροφικές: Είναι καθαρές λίμνες, φτωχές σε θρεπτικά συστατικά και ελάχιστη παραγωγή φυτοπλαγκτού. Στο τέλος της θερμικής στρωματοποίησης ο βαθμός κορεσμού του διαλυμένου O_2 στον πυθμένα ανέρχεται στο 70%.

Μεσοτροφικές: Είναι λίμνες με μικρή προσφορά σε θρεπτικά συστατικά και μέτρια παραγωγή φυτοπλαγκτού. Ο βαθμός κορεσμού του διαλυμένου O_2 κυμαίνεται μεταξύ 30-70%.

Ευτροφικές: Είναι λίμνες πλούσιες σε θρεπτικά συστατικά. Η παραγωγή του φυτοπλαγκτού είναι μεγάλη και η ορατότητα μικρή. Ο βαθμός κορεσμού του διαλυμένου O_2 στον πυθμένα κυμαίνεται από 0-30%.

Πολυτροφικές: Είναι λίμνες με πολύ μεγάλη και συνεχή προσφορά σε θρεπτικά συστατικά. Το καλοκαίρι παρατηρείται παντελής έλλειψη O_2 και κατά διαστήματα εκλύεται H_2S ή άλλες δύσοσμες ουσίες. Η ορατότητα είναι ελάχιστη.

1.4.3.3. Αίτια ανάπτυξης φαινομένου

Οι κυριότερες αιτίες του συνεχώς αυξανόμενου εμπλουτισμού των νερών σε θρεπτικά συστατικά αζώτου και φωσφόρου είναι :

- οι αγροτικές,
- οι βιομηχανικές δραστηριότητες
- και τα οικιακά απόβλητα.

Ο ευτροφισμός επιταχύνεται από τη χρήση λιπασμάτων και απορρυπαντικών και ακόμη τη διάθεση λυμάτων και αποβλήτων που περιέχουν μεγάλες ποσότητες νιτρικών και φωσφορικών αλάτων.

Συγκεκριμένα, το φορτίο του φωσφόρου έχει σχεδόν διπλασιαστεί σαν αποτέλεσμα της χρήσης απορρυπαντικών πλούσιων σε φωσφορικά άλατα. Επιπλέον, αυξήθηκε το περιεχόμενο σε φωσφόρο των φυτικών και ζωικών τροφών, προερχόμενο από τα υψηλά επίπεδα λίπανσης, καθώς επίσης λόγω της χρήσης ενώσεων του φωσφόρου στην επεξεργασία των τροφών.

Η αναστροφή αυτής της τάσης μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση απορρυπαντικών ελευθέρων σε φωσφορικά άλατα. Παράλληλα, αν εφαρμοστεί σωστά η εδαφική επεξεργασία των λυμάτων μπορεί να συνεισφέρει στην απομάκρυνση των φωσφορικών. Μεγάλη συνεισφορά στην ελάττωση του φωσφόρου μπορεί να δοθεί από τη γεωργία με τη μείωση της υπερβολικής χρήσης φωσφορικών λιπασμάτων.

Η παρουσία αζώτου είναι αποτέλεσμα της συνεχώς αυξανόμενης χρήσης νιτρικών λιπασμάτων στη γεωργία. Η προσθήκη NO_3^- στο έδαφος σε συνδυασμό με ικανοποιητικά επίπεδα θερμοκρασίας, υγρασίας και υψηλά επίπεδα βροχοπτώσεων ή αρδευτικού νερού αυξάνουν σημαντικά τη συγκέντρωση NO_3^- στα υπόγεια νερά και την απορροή του εδάφους που καταλήγει στις λίμνες.

Το όριο της συγκέντρωσης των νιτρικών ιόντων πάνω από το οποίο είναι πιθανό να εμφανιστεί ο ευτροφισμός σε γλυκά νερά έχει τεθεί από την Ε.Ε. στα 50 mg/L.

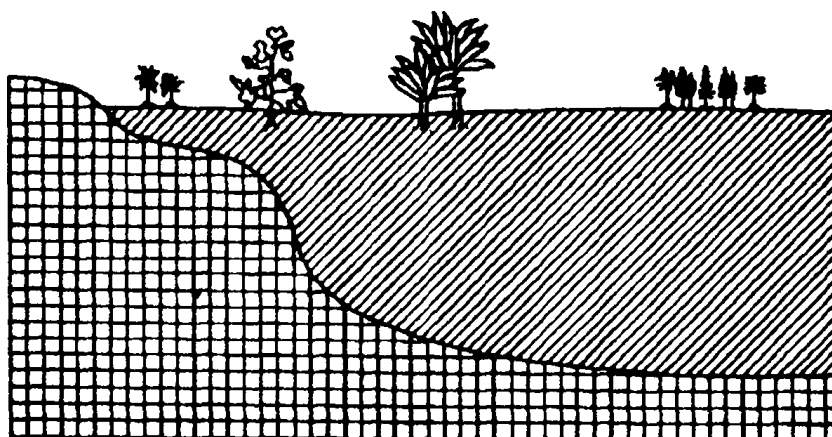
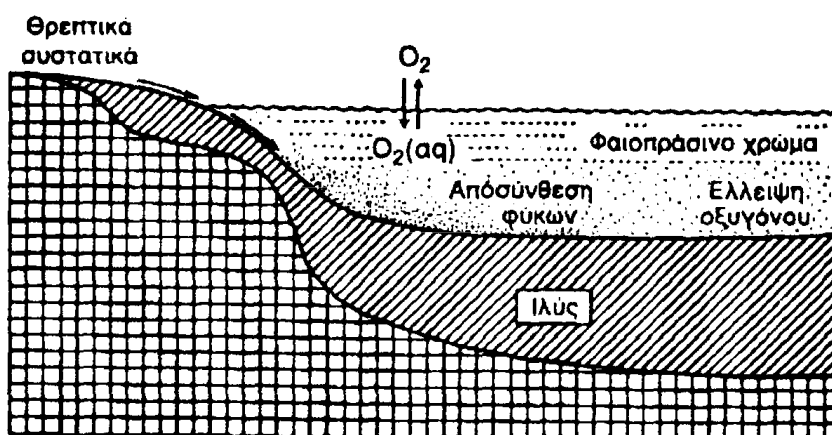
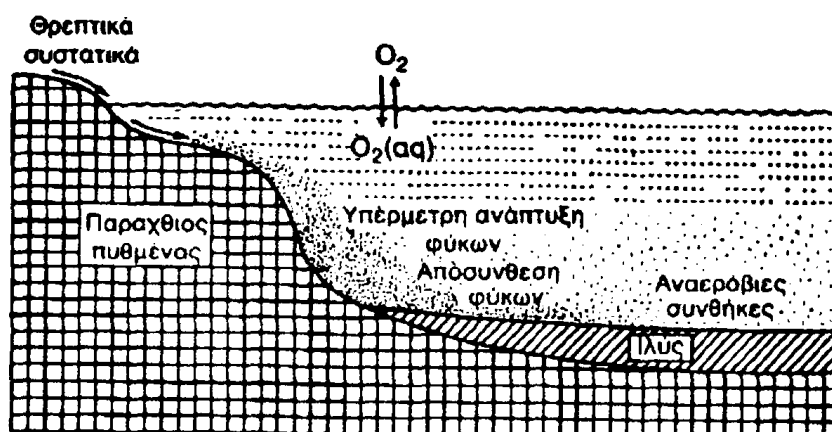
1.4.3.4. Συνέπειες του ευτροφισμού

Διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, τις οικολογικές και τις οικονομικές. Οι *οικολογικές συνέπειες* στους υδρόβιους οργανισμούς είναι οι εξής:

- Αυξημένη παραγωγικότητα φυτοπλαγκτού.
- Αύξηση των βακτηρίων.
- Αύξηση των αλγών με αποτέλεσμα τη μείωση επαρκούς φωτισμού.
- Ανάπτυξη αναερόβιων συνθηκών με τη μείωση του διαλυμένου οξυγόνου, με αποτέλεσμα το θάνατο ψαριών και τη παραγωγή H_2S στο νερό και τον πυθμένα.
- Μείωση του χώρου ανάπτυξης των ψαριών και των οργανισμών που χρησιμοποιούνται για την τροφή τους.
- Τα είδη των αλγών (κυανοφύκη) που αναπτύσσονται είναι ακατάλληλα ως τροφή του ζωοπλαγκτού και παράλληλα καταπνίγουν την ανάπτυξη άλλων οργανισμών.

Οι *οικονομικές συνέπειες* είναι οι ακόλουθες.

- Ακατάλληλο νερό για πόση και ψάρεμα
- Νερό πλούσιο σε NO_3^- προκαλεί καρκίνο και έλκος
- Αύξηση των δαπανών για τον καθαρισμό της πλούσιας σε άλγη επιφάνειας του νερού ώστε να γίνει πόσιμο.
- Το νερό γίνεται ακατάλληλο για μπάνιο λόγω θολερότητας, φυκών που επιπλέουν και ανάπτυξης μικροοργανισμών και καλαμιών.
- Προβλήματα υγείας αλλεργικής φύσης.
- Μείωση παραγωγής ψαριών.
- Εμπόδια στη ροή των αρδευτικών και αποχετευτικών καναλιών.
- Αυξημένος κίνδυνος καταστροφών από πλημμύρες λόγω υπερχειλίσης.
- Εμποδίζεται η ναυσιπλοΐα
- Προβλήματα στις υδροηλεκτρικές εγκαταστάσεις.
- Εάν ο ευτροφισμός δεν διακοπεί, είναι δυνατό μετά από πολλά χρόνια μια λίμνη να μετατραπεί σε έλος και στη συνέχεια σε στεριά (Εικόνα 3).



Εικόνα 3. Μετατροπή λίμνης σε έλος λόγω ευτροφισμού

1.4.3.5. Προσπάθεια ελέγχου του ευτροφισμού

Σε παγκόσμια κλίμακα, ο σημαντικότερος παράγοντας που καθορίζει την ταχύτητα του ευτροφισμού είναι η ηλιακή ακτινοβολία, ειδικά σε τροπικές περιοχές. Ωστόσο, σε Ευρώπη και Βόρεια Αμερική η ισορροπία θρεπτικών συστατικών είναι ο

σημαντικότερος παράγοντας. Έτσι, η αποκατάσταση μιας λίμνης βασίζεται στον έλεγχο του φορτίου των θρεπτικών συστατικών, το οποίο μπορεί να επιτευχθεί με:

1. Μείωση των θρεπτικών συστατικών με έλεγχο των πηγών,
2. Απομάκρυνση των θρεπτικών συστατικών από το νερό

Οι τεχνικές αποκατάστασης μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες:

- προληπτικές μέθοδοι και
- μέθοδοι αντιμετώπισης

Οι πρώτες επιδρούν μειώνοντας την εισαγωγή θρεπτικών συστατικών στο νερό, ενώ οι δεύτερες απομακρύνουν τα θρεπτικά συστατικά από το νερό και έτσι τα αποτελέσματα είναι πιο άμεσα.

α. Προληπτικές μέθοδοι

1. Έλεγχος των εκροών

Αφορά στην ποσότητα των υλικών που εκρέει στα νερά. Εφαρμόζεται σε οικιακά και βιομηχανικά απόβλητα. Ο κύριος έλεγχος γίνεται στο B.O.D. και τα αιωρούμενα στερεά. Τα μέτρα ελέγχου θρεπτικών συστατικών αφορούν τα PO_{4-3} των απορρυπαντικών.

2. Απομάκρυνση - Ανενεργοποίηση θρεπτικών συστατικών

Απομάκρυνση των θρεπτικών συστατικών από το νερό πριν φθάσουν στις λίμνες. Είναι η πιο αποτελεσματική μέθοδος και επιτυγχάνεται εμποδίζοντας την εκροή των θρεπτικών συστατικών στο νερό.

3. Πρακτικές χρήσης της γης

Τα τελευταία χρόνια στη γεωργία και τη βιομηχανία επιβάλλονται όλο και αυστηρότερα μέτρα ελέγχου της ρύπανσης που προκαλούν.

4. Τροποποίηση προϊόντων

Το πιο αντιπροσωπευτικό παράδειγμα είναι η μείωση των PO_{4-3} στα απορρυπαντικά, ως αποτέλεσμα οικολογικού ανασχεδιασμού (ecodesign), ανάλυσης κύκλου ζωής (LCA), συμμόρφωση με περιβαλλοντικές προδιαγραφές για απόκτηση οικολογικής σήμανσης (ecolabel).

β. Μέθοδοι αντιμετώπισης

1. Αλλαγή κατεύθυνσης

Αυτή η τεχνική εμποδίζει τα πλούσια σε θρεπτικά συστατικά νερά να εισέλθουν στη λίμνη αλλάζοντας την κατεύθυνσή τους. Η μέθοδος αυτή απλά μεταθέτει το πρόβλημα.

2. Αραιώση

Γίνεται με αραιώση των ευτροφικών νερών με άλλα φτωχότερα σε θρεπτικά συστατικά.

3. Εκβάθυνση

Στις ρηχές λίμνες, η ανάδευση της ιλύος του πυθμένα μιας λίμνης είναι η σημαντικότερη αιτία για την εκδήλωση του ευτροφισμού, ενώ στις στρωματοποιημένες λίμνες αυτό συμβαίνει μόνο σε περίπτωση αναστροφής. Η εκβάθυνση των ρηχών λιμνών επιτρέπει τη στρωματοποίηση και μειώνει το βαθμό ανάδευσης.

4. Απομάκρυνση της ιλύος

Η απομάκρυνση της ιλύος από τον πυθμένα μιας λίμνης γίνεται ώστε να αποφευχθεί η επαναδιάλυση των PO_4 που περιέχονται σ' αυτή. Το κόστος είναι πολύ υψηλό.

6. Χημικές τεχνικές

Προστίθενται διάφορες χημικές ουσίες που καταβυθίζουν τα θρεπτικά συστατικά ή τα μετατρέπουν σε λιγότερο βιολογικά διαθέσιμες μορφές.

1.4.4. Τα νιτρικά στο συντηρημένο κρέας

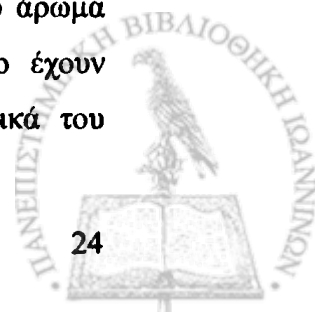
Για πολλούς αιώνες η συντήρηση του κρέατος γινόταν με την προσθήκη αλάτων. Τα άλατα εμποδίζουν την ανάπτυξη των βακτηρίων είτε άμεσα είτε έμμεσα μέσω της αφυδάτωσης που προκαλούν στο κρέας (τα περισσότερα βακτήρια απαιτούν ένα ελάχιστο ποσό υγρασίας για να επιβιώσουν και να αναπτυχθούν).

Καθώς διαδόθηκε η χρήση των αλάτων ως συντηρητικών του κρέατος, προτιμήθηκαν αυτά τα οποία προσέδιδαν ορισμένα επιθυμητά χαρακτηριστικά στο χρώμα και στην γεύση.

Στις αρχές του τελευταίου αιώνα διαπιστώθηκε ότι η παρουσία νιτρικών σε ορισμένα άλατα προσέδιδε καλύτερη γεύση και χρώμα στο κρέας. Αργότερα διαπιστώθηκε ότι τα νιτρικά κατά την διάρκεια της συντήρησης μετατρέπονται σε νιτρώδη από τα βακτήρια και ότι τα ίδια τα νιτρικά δεν έχουν καμιά επίδραση στο χρώμα και στην γεύση. Τα νιτρώδη χρησιμοποιούνται πιο εκτεταμένα στο βιομηχανικά συντηρούμενο κρέας ως νιτρώδες νάτριο.

Σήμερα στο συντηρούμενο κρέας προστίθενται μια σειρά από ουσίες όπως: κοινό αλάτι (NaCl) που προσδίδει γεύση, ζάχαρη, καθώς και άλλες ουσίες που προσδίδουν την χαρακτηριστική γεύση κάθε προϊόντος.

Επίσης τα περισσότερα προϊόντα καπνίζονται για να πάρουν χαρακτηριστικό άρωμα και γεύση και τέλος προστίθενται νιτρώδη (NaNO_2), τα οποία όχι μόνο έχουν αντιβακτηριδιακή δράση αλλά βελτιώνουν σημαντικά και τα χαρακτηριστικά του



κρέατος. Τα νιτρώδη κατά την διάρκεια της συντήρησης μετατρέπονται σε νιτρικό οξύ το οποίο αντιδρά με την μεθαιμογλοβίνη (χρωστική που προσδίδει το κόκκινο χρώμα στο κρέας) και την οξειδώνει με αποτέλεσμα το βαθύ έντονο ρόζ ή κόκκινο χρώμα. Τα νιτρώδη βελτιώνουν εκτός από το χρώμα και την γεύση, επικαλύπτοντας ανεπιθύμητες γεύσεις οι οποίες δημιουργούνται κατά την διάρκεια της συντήρησης. Τέλος προστίθεται και ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C) ή ερυθροβικό οξύ, τα οποία εμποδίζουν τον σχηματισμό νιτροζαμινών.

1.4.4.1. Συγκέντρωση και τοξικότητα των νιτρικών-νιτρωδών στο συντηρημένο κρέας

Η μέγιστη επιτρεπόμενη συγκέντρωση νιτρικών, νιτρωδών ή συνδυασμού τους δεν μπορεί να ξεπερνά τα 200 ppm υπολογιζόμενα ως NaNO_2 στο τελικό προϊόν: $\text{ppm} = \text{mgr NaNO}_2 / 1000 \text{ gr}$ συντηρούμενου κρέατος.

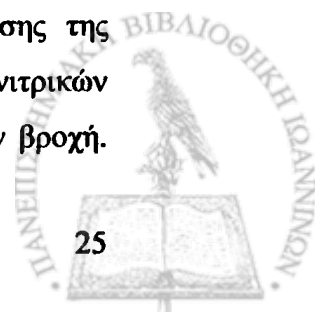
Στις περισσότερες περιπτώσεις προστίθεται και βιταμίνη C (ασκορβικό Na ή ισοασκορβικό Na) μέχρι 550 ppm

Όσον αφορά την τοξικότητα των νιτρωδών σύμφωνα με τον αμερικάνικο οργανισμό FDA (Food and Drug Administration) η θανατηφόρα δόση νιτρικού νατρίου για τους ενήλικες έχει υπολογισθεί σε 30-35 gr όταν καταναλωθούν σε μια δόση και η αντίστοιχη θανατηφόρα δόση για τα νιτρώδη σε 22-23 mg/kg βάρος του σώματος. Χαμηλότερες δόσεις μπορεί να προκαλέσουν μεθαιμογλοβιναιμία (ιδιαίτερα στα βρέφη). Δεν έχει συνδεθεί η κατανάλωση συντηρημένου κρέατος με τον καρκίνο και αυτό επειδή η εισροή νιτρικών και νιτρωδών από προϊόντα συντηρημένου κρέατος αποτελεί περίπου μόνο το 10% της συνολικής εισροής (90% από λαχανικά νερό και άλλες πηγές).

Έχει αποδειχθεί ότι η προσθήκη στην συντήρηση και βιταμίνης C ή ερυθροβικού οξέως μειώνει στο ελάχιστο την πιθανότητα σχηματισμού νιτροζαμινών. Γι' αυτό το λόγο οι ανιχνευόμενες νιτροζαμίνες στο συντηρούμενο κρέας είναι ελάχιστες και κυρίως εμφανίζονται στο υπερβολικά ψημένο κρέας.

1.4.5. Τοξικότητα των νιτρικών-νιτρωδών στα ζώα

Στις περιόδους ανομβρίας η συγκέντρωση των νιτρικών στο έδαφος μπορεί να αυξηθεί δραματικά λόγω της μείωσης της έκπλυσής τους από το έδαφος προς τα βαθύτερα στρώματα, της μείωσης της πρόσληψής τους από τα φυτά και της αύξησης της αποσύνθεσής της οργανικής ύλης. Μετά το τέλος της ξηρασίας η πρόσληψη νιτρικών από ορισμένα φυτά μεγιστοποιείται, ιδιαίτερα την πρώτη εβδομάδα μετά την βροχή.



Εάν τα ζώα αφεθούν να βοσκήσουν άφθονα αυτά τα φυτά η δηλητηρίαση από τα νιτρικά-νιτρώδη μπορεί να είναι καταστροφική.

Τα νιτρικά από μόνα τους δεν είναι πάντοτε τοξικά για τα ζώα. Στα μηρυκαστικά μετατρέπονται στο στομάχι τους σε νιτρώδη και μετά σε αμμωνία από τα μικρόβια ως εξής:

Νιτρώδη της Τροφής



Μηρυκαστικά: Νιτρικά της τροφής → νιτρώδη → αμμωνία

Άλλα ζώα : νιτρικά της τροφής → νιτρώδη της τροφής

Εν τούτοις τα νιτρικά εάν καταναλωθούν σε μεγάλες συγκεντρώσεις από τα ζώα μπορεί να προκαλέσουν καυστικά φαινόμενα στο στομάχι και διάρροια. Τα νιτρώδη είναι πολύ πιο τοξικά. Παράγονται από τα νιτρικά κατά την διάρκεια της πέψης ή προέρχονται από φυτική τροφή αλλοιωμένη από βακτήρια και μύκητες (αναμμένα χλωρά χόρτα). Απορροφώνται από το αίμα μετατρέποντας την αιμογλοβίνη σε μεθαιμογλοβίνη (ανοξία). Πολλά ζώα αντέχουν ακόμη και σε μετατροπή του 50% της αιμογλοβίνης τους χωρίς σημάδια ασθένειας. Πάνω όμως από το 80% προκαλείται θάνατος.

Πολλά φυτά έχουν υψηλές συγκεντρώσεις νιτρικών και το φαινόμενο αυτό εντείνεται από την υπερλίπανση.

Περισσότερα από 80 φυτά, σπόροι και ριζώματα είναι γνωστά για την πρόκληση δηλητηρίασης νιτρικών-νιτρωδών στα ζώα. Τέτοια φυτά είναι το σόργο, το καλαμπόκι, η σόγια, το κριθάρι, το σιτάρι, τα ζαχαρότευτλα, ο καπνός κ.λ.π.

Η συγκέντρωση νιτρικών αυξάνει σε αυτά τα φυτά λόγω ξηρασίας, συννεφιάς ή παγωνιάς και τήξης και εξαρτάται από το είδος του φυτού. Συνήθως είναι υψηλότερη στα νεαρά φυτά και στους κορμούς σε σχέση με τα φύλλα.

Το νερό όταν έχει μολυνθεί από λιπάσματα, κοπριά ζώων ή αποσυντιθέμενη οργανική ύλη μπορεί να είναι επίσης πηγή τοξικών επιπέδων νιτρικών. Συνδυασμός νιτρικών στην τροφή και το νερό των ζώων μπορεί επίσης προσθετικά να οδηγήσει σε δηλητηρίαση.

Η ευαισθησία των ζώων στην τοξικότητα των νιτρικών-νιτρωδών διαφέρει ανάλογα με το είδος του ζώου αλλά και ανάλογα με τη μορφή των αλάτων που καταναλώνουν με τη τροφή τους (νιτρικά ή νιτρώδη). Πιο ευαίσθητα στα νιτρώδη είναι τα γουρούνια και λιγότερο οι αγελάδες, τα πρόβατα και τελευταία τα άλογα.

Τα γουρούνια που δεν μηρυκάζουν δεν μετατρέπουν τα νιτρικά σε νιτρώδη στο στομάχι τους και έτσι δεν κινδυνεύουν εύκολα από τροφή πλούσια σε νιτρικά. Εν τούτοις

κινδυνεύουν πολύ από δηλητηρίαση λόγω κατανάλωσης νιτρωδών μέσω της τροφής, επειδή δεν μπορούν να τα μετατρέψουν σε αμμωνία.

Η δηλητηρίαση από νιτρικά-νιτρώδη προκαλεί δυσκολία αναπνοής, νευρικήτητα, εξασθένηση, μπλε σοκολατί χείλη, βαθύ σοκολατί αίμα, κώμα και θάνατο. Θεραπευτικά μπορεί να χορηγείται χλωρή τροφή με χαμηλά επίπεδα νιτρικών για να διαλύσει τα νιτρικά στο στομάχι. Επίσης θεραπευτικά μπορεί να χορηγηθεί το methylene blue (κυανούν του μεθυλενίου), που αντιδρά με τη μεθαιμογλοβίνη επαναφέροντάς τη στη μορφή της αιμογλοβίνης, αν και έχει απαγορευθεί η χρήση της σε ζώα που προορίζονται για διατροφή.

2. Ο ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΗΣ ΦΥΤΙΚΟΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ

Τα φυτά παράγουν μια μεγάλη ποικιλία οργανικών ενώσεων που φαίνονται να μην έχουν άμεση σχέση με τον πρωτογενή μεταβολισμό και την κανονική αύξηση και ανάπτυξη των φυτών. Οι ουσίες αυτές ονομάζονται δευτερογενείς μεταβολίτες, δευτερογενή προϊόντα ή φυσικά προϊόντα. Φαίνεται να μην παίζουν άμεσο ρόλο στις βασικές μεταβολικές πορείες, όπως η φωτοσύνθεση, η αναπνοή, η μεταφορά μεταβολιτών, η πρωτεϊνοσύνθεση, η αφομοίωση, η διαφοροποίηση ή η σύνθεση υδατανθράκων, πρωτεϊνών και λιπιδίων. Φαίνεται επίσης να έχουν σχετικά περιορισμένη διάδοση στο βασίλειο των φυτών.

Σήμερα έχει αποδειχθεί ότι ο βασικός ρόλος των δευτερογενών μεταβολιτών (λόγω της τοξικότητας) είναι η προστασία των φυτών από τους διάφορους παθογόνους ή φυτοφάγους εχθρούς τους. Λόγω της βιολογικής τους δραστηριότητας κατά των φυτοφάγων εχθρών και μικροβίων, πολλές από αυτές τις ουσίες παράγονται σήμερα σε εμπορική μορφή ως φυτοπροστατευτικές ουσίες ή ως φαρμακευτικά προϊόντα.

Η παραγωγή ορισμένων δευτερογενών μεταβολιτών σχετίζεται επίσης και με την έντονη οξειδωτική καταπόνηση των φυτών (αύξηση των τοξικών για τα κύτταρα ενεργών μορφών οξυγόνου, ROS).

Οι δευτερογενή μεταβολίτες ή δευτερογενή φυτικά προϊόντα, είναι οι ουσίες που βιοσυντίθενται κατά τις μεταβολικές διαδικασίες των υδατανθράκων, των λιπών και των αμινοξέων. Ο όρος δευτερογενή προϊόντα προσδίδεται στην βιοσύνθεσή τους και όχι στην σημασία τους για τα φυτά. Σήμερα είναι γνωστά περίπου 10.000 τέτοια δευτερογενή προϊόντα, πολλά από τα οποία παίζουν βασικούς οικολογικούς ρόλους σε ένα νέο πεδίο έρευνας, την «οικολογική βιοχημεία».

2.1. Σπουδαιότερες ομάδες δευτερογενών μεταβολιτών

Τα δευτερογενή φυτικά προϊόντα μπορούν να καταταγούν σε τρεις ομάδες, ανάλογα με τον τρόπο βιοσύνθεσής τους:

- Τερπένια
- Φαινόλες
- Αζωτούχες ενώσεις ή αλκαλοειδή

2.1.1. Τερπένια

Τα τερπένια ή τερπενοειδή ή ισοτερπενοειδή αποτελούν την πιο πολυάριθμη ομάδα των δευτερογενών προϊόντων, είναι προϊόντα λιπιδικής φύσεως αδιάλυτα στο νερό και βιοσυντίθενται από το Ακετυλό-CoA μέσω του μονοπατιού του μεβαλονικού οξέως. Ο βασικός τους σκελετός είναι ένα μόριο υδρογονάνθρακα με 5 άτομα άνθρακα, που προέρχονται από την σταδιακή συμπύκνωση τριών μορίων Ακετυλό-CoA. Η σειρά αυτή των αντιδράσεων ονομάζεται βιοσυνθετική οδός του μελαβονικού οξέως. Όλα τα τερπένια προέρχονται από την συνένωση περισσότερων της μιας μονάδων ανθρακικών ενώσεων με πέντε άτομα άνθρακα (C5) που έχουν τον σκελετό του ισοπρενίου (ισοπεντανίου). Ανάλογα με τον αριθμό των C5 μονάδων που περιέχουν στο μόριό τους ταξινομούνται σε μονοτερπένια μονοτερπένια (C3), σεσκιτερπένια (C15), διτερπένια (C20), τροτερπένια (με 30 άτομα C), τετρατερπένια (με 40 άτομα C) και σε πλυτερπένια [(C5)*n*, *n*>20].

Πολλά τερπένια έχουν καθορισμένη λειτουργία στον φυσικό μεταβολισμό και από αυτή την άποψη μπορούν να θεωρηθούν πρωτογενείς μάλλον παρά δευτερογενείς μεταβολίτες. Για παράδειγμα, τα σεσκιτερπένια είναι μια πρόδρομη μορφή του αμπισισικού οξέως (ABA), ενώ τα διτερπένια αποτελούν ενδιάμεση μορφή για την βιοσύνθεση του γιββερελικού οξέους (GA). Τα στεροειδή είναι τριτερπένια τα οποία αποτελούν βασικά συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών. Τα καροτενοειδή (καροτένια και ξανθοφύλλες) είναι τετρατερπένια που λειτουργούν ως δευτερογενείς χρωστικές στη φωτοσύνθεση και προστατεύουν τους φωτοσυνθετικούς ιστούς από την φωτοοξειδωση.

Πολλά μονοτερπένια και τα παράγωγά τους έχουν έντονες τοξικές ιδιότητες για πολλά έντομα, όπως τα πυρεθρινοειδή, με έντονη εντομοκτόνο δράση (παράλυση του νευρικού συστήματος κλπ.). οι ρητίνες είναι ετερογενή μίγματα ρητινικών οξέων (C₂₀H₃₀O₂), λιπαρών οξέων, εστέρων των οξέων αυτών, αλκοόλης και κυρών. Τις συναντάμε στα κωνοφόρα (πεύκα κλπ) όπου τα μονοτερπένια συγκεντρώνονται στους ρητινοφόρους πόρους του κορμού, των κλαδιών και των βελονών. Είναι τοξικές για κάποια έντομα και δεν έχει αποδειχθεί κάποιος ρόλος τους στον φυτικό μεταβολισμό.

Μερικά φυτά περιέχουν μίγματα πτητικών τερπενίων που ονομάζονται αιθέρια έλαια και συναντώνται στα όργανα πολλών αρωματικών και μη φυτών., όπως η μενθόλη (αιθέριο έλαιο της μέντας) και το λιμονένιο (αιθέριο έλαιο της λεμονιάς). Τα αιθέρια έλαια εξάγονται από τα φυτά με απόσταξη και παρουσιάζουν μεγάλο εμπορικό ενδιαφέρον.

Γνωστό σεσκιτερπένιο είναι η φαρνεζόλη, το βασικό συστατικό του αρώματος των κρίνων.

Στις αδενώδης τρίχες των Compositae (π.χ. ηλίανθος, αρτεμισία κ.α.) παράγονται οι λακτόνες, ισχυρά απωθητικά πολλών φυτοφάγων εντόμων και θυλαστικών. Στο βαμβάκι παράγεται η γκοσυπόλη, που προσδίδει αντοχή έναντι των εντόμων και πρόσφατα αποτελεί ισχυρό ανδρο-αντισυλληπτικό συστατικό.

Η φυτόλη και οι γιββερελίνες είναι διτερπένια ενώ η φορβόλη (τοξική και ερεθιστικό του δέρματος) παράγεται από τα φυτά της οικογενείας Euphorbiaceae.

Στην κατηγορία των τριτερπενίων περιλαμβάνονται δομικώς ποικίλα προϊόντα όπως τα στεροειδή, η χοληστερόλη, η εργοστερόλη, οι φυτοεκδόσες (που προκαλούν ανωμαλίες στην έκδυση των εντόμων).

Πολυτερπένια είναι το καουτσούκ (latex) και η γουταρπένια (υψηλού μοριακού βάρους).

2.1.2. Φαινόλες

Είναι οργανικές ενώσεις με έναν τουλάχιστον αρωματικό δακτύλιο (C_6) στο μόριό τους, με ένα ή περισσότερα υδροξύλια. Μέσω αντιδράσεων συμπύκνωσης, προσθήκης ή πολυμερισμού του βασικού αρωματικού δακτυλίου, προκύπτει ένας μεγάλος αριθμός παραγώγων. Οι φαινόλες απαντώνται στην φύση πολλές φορές υπό μορφή γλυκοζιτών μάλλον παρά σε ελεύθερη κατάσταση και συνεπώς πολλές φαινόλες αποτελούν το άγλυκο τμήμα των γλυκοζιτών.

Οι πιο γνωστές φαινόλες είναι η φαινόλη, η κατεχόλη η υδροκινόνη και η φλωρογλυκόλη. Οι φυτικές φαινόλες παρουσιάζουν ετερογένεια ως προς την διαλυτότητά τους: ορισμένες διαλύονται μόνο σε οργανικούς διαλύτες, άλλες είναι υδατοδιαλυτές (κυρίως καρβοξυλικά οξέα και γλυκοζίτες), ενώ άλλες είναι ισχυρά αδιάλυτα ισομερή.

Σε σχέση με την χημική τους ποικιλότητα οι φαινόλες έχουν αμυντικούς ρόλους κατά των φυτοφάγων και παθογόνων οργανισμών, λειτουργούν για μηχανική υποστήριξη, για την προσέλκυση επικονιαστών και την διασπορά των καρπών. Σημαντικό ρόλο παίζουν επίσης στο φαινόμενο της αλληλοπάθειας (μείωση της αύξησης των γειτονικών φυτών ανταγωνιστών).

Οι φυτικές φαινόλες βιοσυντίθενται με αρκετά διαφορετικές πορείες. Δυο είναι οι βιοσυνθετικές οδοί: του σικιμικού οξέως και του μαλονικού οξέως.

Το μονοπάτι του σικιμικού οξέως είναι το πιο σημαντικό, αρχίζει από απλούς υδατάνθρακες και προχωρά προς τα αρωματικά αμινοξέα φαινυλαλανίνη, τυροσίνη και θρυπτοφάνη. Το άλλο μονοπάτι, του μαλονικού οξέως, είναι μικρότερης σημασίας για τα ανώτερα φυτά και δίνει διάφορα φαινολικά οξέα, κυρίως στους μύκητες και τα βακτήρια. Το μονοπάτι του σικιμικού οξέως έχει βρεθεί στα φυτά, τους μύκητες και τα βακτήρια αλλά δεν υπάρχει στους ζωικούς οργανισμούς. Έτσι τα ζώα δεν μπορούν να βιοσυνθέσουν τα τρία αυτά αρωματικά αμινοξέα (φαινυλαλανίνη κ.α.) και τα προμηθεύονται έτοιμα από το φυτικό βασίλειο.

Από το μονοπάτι του σικιμικού οξέως σχηματίζονται:

- a. Αρωματικά αμινοξέα θρυπτοφάνη, φαινυλαλανίνη και τυροσίνη,
- b. Κινναμωνικά οξέα που προέρχονται από την φαινυλαλανίνη και την τυροσίνη,
- c. Τα φαινυλοκαρβοξυλικά οξέα και
- d. Οι π-βενζοκινόνες όπως η πλαστοκινόνη και η ουβικινόνη.

Το ζιζανιοκτόνο Round up μπλοκάρει το μονοπάτι του σικιμικού οξέως, εμποδίζοντας την βιοσύνθεση της φαινυλαλανίνης, της τυροσίνης και της θρυπτοφάνης.

Δευτερογενή προϊόντα της φαινυλαλανίνης και της τυροσίνης

Πολλές ομάδες δευτερογενών φαινολικών προϊόντων προέρχονται από αυτά τα δύο αμινοξέα όπως τα οξέα: κινναμωνικό, π-κουμαρικό, φερουλικό, χλωρογενικό, πρωτοκατεχολικό και γαλλικό.

Η φαινυλαλανίνη με απαμίνωση μετατρέπεται σε κινναμωνικό οξύ που με υδροξυλίωση δίνει το π-κουμαρικό, ενώ η τυροσίνη με απαμίνωση μετατρέπεται απευθείας σε π-κουμαρικό. Από το π-κουμαρικό στη συνέχεια σχηματίζονται τα οξέα καφεϊκό, φερουλικό, υδροξυ-φερουλικό και σιναπικό.

Το χλωρογενικό προέρχεται από την εστεροποίηση του κινικού οξέως με το καφεϊκό και η συγκέντρωσή του είναι ιδιαίτερα υψηλή στα φυτά, π.χ. στην πατάτα και στους κόκκους του ξηρού καφέ μπορεί να φθάσει το 13% του βάρους του. Η οξειδωση του χλωρογενικού οξέως δίνει διάφορες κινόνες, υπεύθυνες για το σκούρο καφέ χρώμα της επιφάνειας πρόσφατα κομμένης πατάτας.

Μια άλλη ομάδα φυτικών ενώσεων που προέρχονται από το μονοπάτι του σικιμικού οξέως είναι οι κουμαρίνες. Τουλάχιστον 1.000 κουμαρίνες υπάρχουν στην φύση, όπως η ουμπελλιφερόνη και η σκοπολετίνη. Η ίδια η κουμαρίνη και η σκοπολετίνη είναι αναστολείς της βλάστησης των σπερμάτων και της κυτταρικής επιμήκυνσης.

2.1.2.1. Πολυμερή των φαινολών

1. Λιγνίνη

Μετά την κυτταρίνη η λιγνίνη είναι η πιο διαδεδομένη οργανική ουσία στα φυτά. Έχει υπολογισθεί ότι το 15-20% του άνθρακα που δεσμεύεται στην βιόσφαιρα ενσωματώνεται σε αυτό το άκαμπτο πολυμερές συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος που προσδίδει μηχανική ακαμψία και στήριξη.

2. Ταννίνες

Επίσης σημαντικό πολυμερές των φυτικών φαινολών. Το όνομά τους προέρχεται από την κέλτικη λέξη “tan”, που σημαίνει βελανιδιά, στα φύλλα της οποίας σχηματίζονται μεγάλες ποσότητες ταννινών. Βρίσκονται σε πολλά φυτικά είδη, κυρίως όμως σχηματίζονται μετά από τραυματισμό των φυτικών ιστών, οπότε προκαλείται οξείδωση των φαινολικών ενώσεων από τις πολυφαινολικές οξειδάσες, παράγοντας κινόνες οι οποίες πολυμεριζόμενες σχηματίζουν τις ταννίνες. Οι τελευταίες θεωρούνται προστατευτικές ουσίες έναντι των μικροοργανισμών, λόγω της ικανότητάς τους να σχηματίζουν αδιάλυτα σύμπλοκα με τις πρωτεΐνες (αντισηπτικές ιδιότητες). Χρησιμοποιούνται ευρύτατα στην βυρσοδεψία. Συνδεόμενες με τις πρωτεΐνες του κολλαγόνου του δέρματος προσδίδουν σε αυτό αντοχή έναντι της θερμοκρασίας, της σήψης και της διαπερατότητας του νερού.

2.1.3. Φλαβονοειδή

Ο βασικός ανθρακινικός σκελετός των φλαβονοειδών περιέχει δύο αρωματικούς δακτύλιους με 13 άτομα C. Ταξινομούνται σε διάφορες ομάδες που βασίζονται πρωτογενώς στον βαθμό οξείδωσης των ατόμων του άνθρακα της γέφυρας. Οι ομάδες που παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον είναι: ανθοκυανίνες, φλαβόνες και φλαβονόλες. Και οι τρεις αυτές ομάδες φλαβονοειδών βρίσκονται στα άνθη των φυτών μαζί με τα καροτενοειδή (κόκκινα τερπενοειδή συστατικά).

Τα φλαβονοειδή συμπεριλαμβάνουν μια ευρεία σειρά έγχρωμων χρωστικών με πιο σημαντικές τις ανθοκυανίνες που δίνουν έντονα χρώματα σε πάρα πολλά άνθη και καρπούς. Πολλά φρούτα και άνθη οφείλουν το χρώμα τους στις ανθοκυανίνες ενώ άλλα όπως ο καρπός της τομάτας και πολλά κίτρινα άνθη στα καροτενοειδή. Η εξέλιξη του χρώματος των ανθέων καθορίζεται από επιλεκτικές πιέσεις που ασκούνται από τις διάφορες χρωματικές προτιμήσεις των εντόμων και των ζώων.

Επιπλέον δύο μεγάλες ομάδες των φλαβονοειδών που βρίσκονται στα άνθη και σε άλλα μέρη του φυτού είναι οι φλαβόνες και οι φλαβονόλες. Μια βασική λειτουργία τους είναι ότι απορροφούν σε μικρά μήκη κύματος, μη ορατά από τον άνθρωπο, ορατά όμως από τις μέλισσες και τα έντομα. Σχηματίζουν μάλιστα ακτινωτά συμμετρικά ή κυκλικά σχήματα που ονομάζονται οδηγοί νέκταρος. Ο σχηματισμός τους προωθείται από το μπλε φως και φαίνεται ότι προστατεύουν τα κύτταρα από την υπεριώδη (UV) ακτινοβολία.

2.1.4. Αλκαλοειδή

Είναι αζωτούχοι οργανικοί δευτερογενείς μεταβολίτες που βιοσυντίθενται κυρίως από τα αμινοξέα ασπαρτικό οξύ, λυσίνη, ορνιθίνη, τυροσίνη και θρυπτοφάνη. Απαντώνται κατ' εξοχήν στα αγγειόσπερμα (20-30% των φυτών) και κατ' εξαίρεση σε βακτήρια, μύκητες, πτεριδόφυτα και γυμνοσπερμα.

Τα ήδη γνωστά αλκαλοειδή ανέρχονται σε 3.000. σχετικά λίγα φυτά, μεταξύ των οποίων τα μονοκότυλα και τα γυμνόσπερμα, περιέχουν αλκαλοειδή. Πιο συχνά περιέχονται σε ποώδη δικότυλα φυτά, ενώ κάθε φυτικό είδος τυπικά περιέχει μερικά μόνο αλκαλοειδή. Ορισμένα αλκαλοειδή απαντώνται και σε ζωικούς οργανισμούς.

Τα περισσότερα αλκαλοειδή βιοσυντίθενται μόνο της βλαστούς των φυτών, με εξαίρεση την νικοτίνη που παράγεται κατά αποκλειστικότητα μόνο της ρίζες του καπνού, απ' όπου και μεταφέρεται στα φύλλα.

Οι βιολογικές της επιδράσεις της ζωικούς οργανισμούς είναι γνωστές από την αρχαιότητα. Κάποια αλκαλοειδή επηρεάζουν το νευρικό σύστημα, είτε διεγείροντας το είτε παραλύοντάς το. Μερικά αυξάνουν την αρτηριακή πίεση ενώ άλλα την μειώνουν. Άλλα δρουν ως παυσίπονα, ως διεγερτικά κλπ. Σε μικρές δόσεις βρίσκουν ευρύτατη φαρμακολογική χρήση ή χρησιμοποιούνται ως διεγερτικά της η μορφίνη, η κωδεΐνη, η κινίνη η ατροπίνη, η εφεδρίνη, η κοκαΐνη, η νικοτίνη και η καφεΐνη.

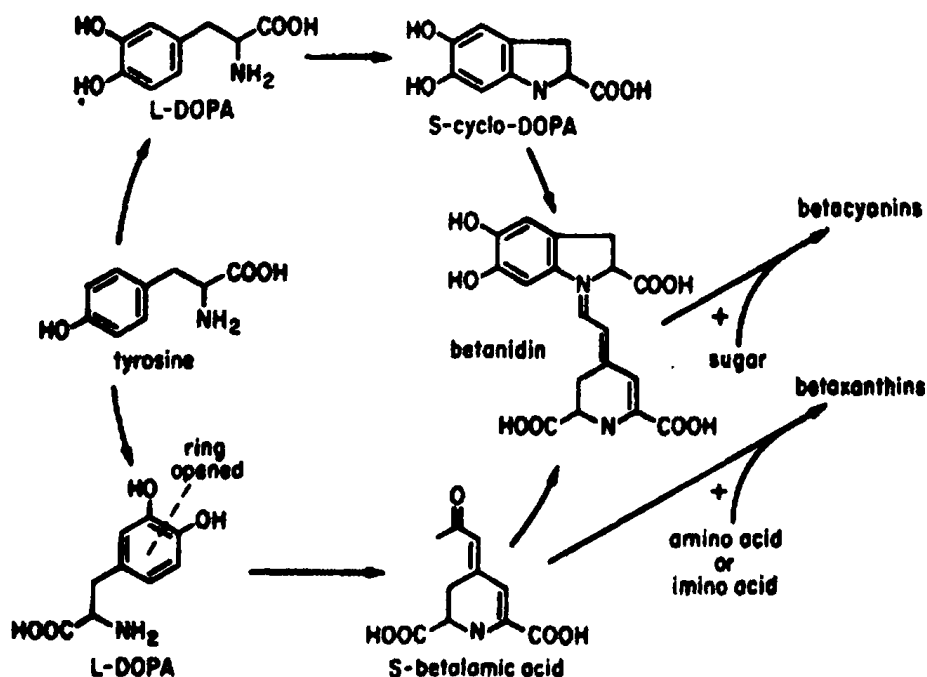
Τα τελευταία χρόνια καθιερώθηκε η κατάταξη των αλκαλοειδών με βάση την βιογένεσή της:

1. Αλκαλοειδή που προέρχονται από την ορνιθίνη. Έχουν ως βάση της βιοσύνθεσής της τον πενταμελή δακτύλιο της ορνιθίνης. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα αλκαλοειδή του καπνού (νικοτίνη, νορνικοτίνη και αναβασίνη), τα αλκαλοειδή της ομάδας του τροπανίου (ατροπίνη, κοκαΐνη) και τα αλκαλοειδή της πυρρολιζιδίνης.

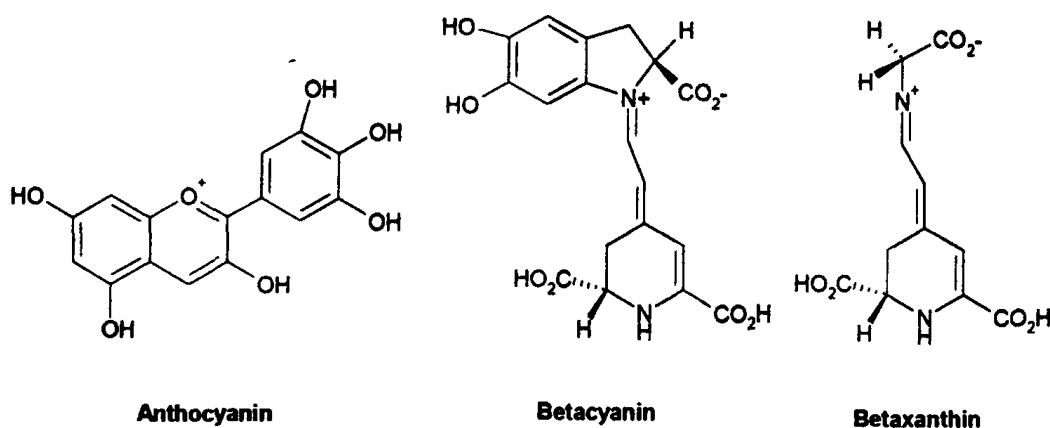
2. Αλκαλοειδή που προέρχονται από την λυσίνη. Χαρακτηριστικό της η ύπαρξη εξαμελούς ετεροκυκλικού δακτυλίου της πιπεριδίνης ή της κινολιζιδίνης, της αναβασίνης (αντικαπνιστικό φάρμακο, διεγερτικό των αναπνευστικών μυών), η λουπινίνη, η αναργυρίνη, η καδαβερίνη και η σπαρτείνη (διουρητικό, καρδιοτονωτικό).
3. Αλκαλοειδή που προέρχονται από την φαινυλαλανίνη ή την τυροσίνη. Τα αλκαλοειδή αυτά έχουν μεγάλη ποικιλία ως της την δομή της και ποικίλες ιδιότητες. Σπουδαιότερα αλκαλοειδή της ομάδας της είναι η νορμπελλαδίνη, η μπελλαδίνη, η γαλανθίνη (αναλγητικό), η κολχικίνη (ισχυρότατο δηλητήριο), η μορφίνη, η κωδεΐνη και η θηβαΐνη. Συνθετικό παράγωγο της μορφίνης είναι και η ηρωίνη.

3. ΜΠΕΤΑΛΑΪΝΕΣ

Οι μπεταλαΐνες προέρχονται από το αμινοξύ τυροσίνη, σε αντίθεση με τις ανθοκυανίνες που προέρχονται από το αμινοξύ φαινυλαλανίνη. Είναι υδατοδιαλυτές κίτρινες (μπεταξανθίνες) και ιώδεις (μπετακυανίνες) χρωστικές ουσίες που αντικαθιστούν τις ανθοκυάνες σε 10 φυτικές οικογένειες, που όλες τους είναι μέλη των Caryophyllales. Βρίσκονται επίσης σε μερικά είδη μυκήτων των γενών *Amanita* και *Hygrocybe*. Οι μπεταλαΐνες προσδίδουν το χρώμα τόσο στα άνθη όσο και στους καρπούς που εμφανίζουν ένα χρωστικό φάσμα που κυμαίνεται από κίτρινο και πορτοκαλί μέχρι κόκκινο και ιώδες. Σε μερικές περιπτώσεις προσδίδουν χρώμα και σε βλαστικά όργανα. Ο όρος Μπεταλαΐνη (Betalain) εισήχθη για να περιγράψει αυτές τις χρωστικές ουσίες ως παράγωγα του μπεταλαμικού οξέως (betalamic acid) (Wohlpart and Mabry, 1968) (εικόνα 4). Κατά το παρελθόν οι μπεταλαΐνες ονομάστηκαν λανθασμένα ως «αζωτούχες ανθοκυάνες» ενώ σήμερα αναφέρονται ως «χρωμοαλκαλοειδή» (chromoalkaloids), λόγω της παρουσίας ενός ατόμου αζώτου στο χρωμοφόρο τους. (Εικόνα 5).



Εικόνα 4. Η σύνθεση των μπεταλαΐνων γίνεται με την συμμετοχή του αμινοξέως της τυροσίνης μέσω της L-DOPA σε δύο υποκατηγορίες, τις μπετακυανίνες και τις μπεταξανθίνες.



Εικόνα 5. Η δομή των ανθοκυανινών, των μπετακυανινών και των μπεταξανθινών.

Οι μπεταλαΐνες λόγω των χρωστικών τους ιδιοτήτων βρίσκουν ευρεία εφαρμογή στην βιομηχανία τροφίμων. Οι άνθρωποι έρχονται συχνά σε επαφή με τις μπεταλαΐνες, είτε τρώγοντας παντζάρια ή βατόμουρα ή γιαούρτι χρωσμένο με χυμό παντζαριού, είτε θαυμάζοντας κάκτους ή τα άνθη της βουκαμβίλλιας.

Τα φυτά που παράγουν μπετακυανίνες, κυρίως της οικογένειας *Chenopodiaceae* (τεύτλα) και της οικογένειας *Amaranthaceae* χρησιμοποιούνται παραδοσιακά ως τροφή, φάρμακα ή σε τελετές θυσίας. Οι Αζτέκοι χρησιμοποιούσαν τα κόκκινα φύλλα του *amaranthus*, ως σύμβολο του ανθρώπινου αίματος κατά την διάρκεια τελετών θυσίας. Από εθνολογικές μελέτες στην Sri Lanka τα κόκκινα χρωσμένα φαγητά, περιλαμβάνοντας τα κόκκινα τεύτλα, θεωρούνταν αναγκαία για τις έγκυες γυναίκες. Τα τελευταία χρόνια επιβεβαιώνονται οι αντικαρκινικές ιδιότητες που αποδίδονται από παλιά στο ρίζωμα του κόκκινου τεύτλου. Στην Ευρώπη, την Ρωσία και την Ν. Αμερική τα κόκκινα τεύτλα που περιέχουν κυρίως μπεταλαΐνη έχουν μεγάλη οικονομική σημασία. Σήμερα χρησιμοποιούνται σαν σαλάτα (ωμά ή μαγειρεμένα), ως βασικό συστατικό στις σούπες ή πωλούνται κονσερβοποιημένα. Η χρήση του χυμού, ωμού ή επεξεργασμένου, ως πρόσθετη χρωστική στα τρόφιμα, στην Ευρώπη αντιστοιχεί σε μία παραγωγή 4.000 τόνων των χρόνων. Μεταξύ άλλων φυτικών χρωστικών-πρόσθετων στα τρόφιμα οι χυμοί των κάκτων *Opuntia ficus-indica*, *Myrtillocactus geometrizans* και *Hyllocereus polyrhizus*, είναι η κύρια πηγή χρωστικών (μπεταλαΐνων).

Στην γεωπονία τα φυτά που περιέχουν μπεταλαΐνες δεν βρίσκονται στην κορυφή των καλλιεργούμενων φυτικών ειδών. Παρ' όλα αυτά υπάρχει μία πολύ μεγάλη και

αυξανόμενη αγορά για τα Cactaceae και διάφορα είδη Bouganvillea, Amaranthus, Portulaca, Mesembryanthemum και Beta Vulgaris.

3.1. Χημεία των μπεταλαϊνών

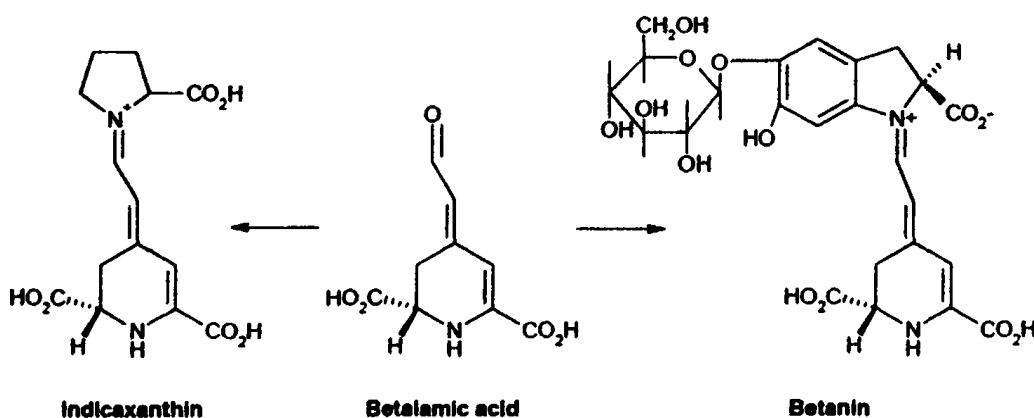
Η κύρια χρωστική ουσία του παντζαριού (red beet), η μπετανίνη (betanin), έχει χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο για τον προσδιορισμό της δομής και της βιοσύνθεσης των μπεταλαϊνών. Το κύριο χαρακτηριστικό όλων των μπεταλαϊνών είναι η παρουσία του χρωμοφόρου του μπεταλαμικού οξέως.

Το κίτρινο χρώμα ($\lambda_{\max}$ 424 nm) είναι αποτέλεσμα του συντονισμού μεταξύ των τριών διαδοχικών διπλών δεσμών.

Η μπεταξανθίνη παράγεται από την συνένωση ενός αμινοξέως ή μιας αμίνης με την αλδεϋδική ομάδα του μπεταλαμικού οξέως. Αυτή η δομή είναι υπεύθυνη για το έντονο κίτρινο ή πορτοκαλοκίτρινο χρώμα της μπεταξανθίνης, που παρουσιάζει την μέγιστη απορρόφηση στα 470-486 nm.

Οι μπετακυανίνες σχηματίζονται επίσης με την ένωση του μπεταλαμικού οξέως με ένα μόριο cyclo-DOPA (Εικόνα 6). Η τελευταία αρωματική δομή είναι υπεύθυνη για το ιώδες χρώμα αυτών των χρωστικών και προκαλεί μια ισχυρή μετατόπιση 60-70 nm ($\lambda_{\max}$ 534-554 nm).

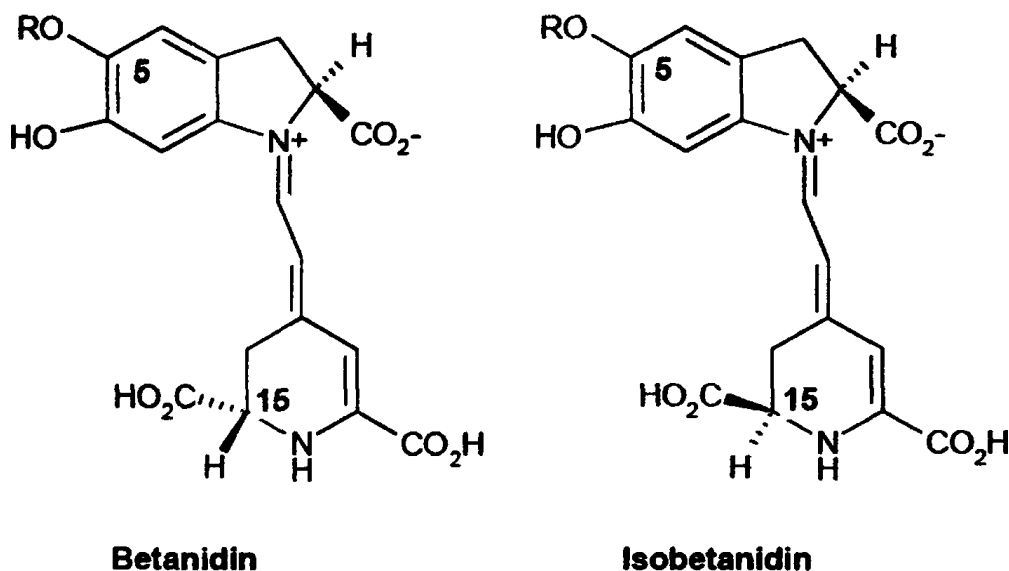
Οι βασικές δομές των μπετακυανινών και των μπεταξανθινών μπορούν να τροποποιηθούν με πολλούς τρόπους, όπως η γλυκόλυση ή η ακυλίωση, που είναι και οι πιο κοινές (Mabry, 2001, Strack et al. 2003).



Εικόνα 6. . Η χημική δομή του μπεταλαμικού οξέως, του κύριου χρωμοφόρου των μπεταλαϊνών.

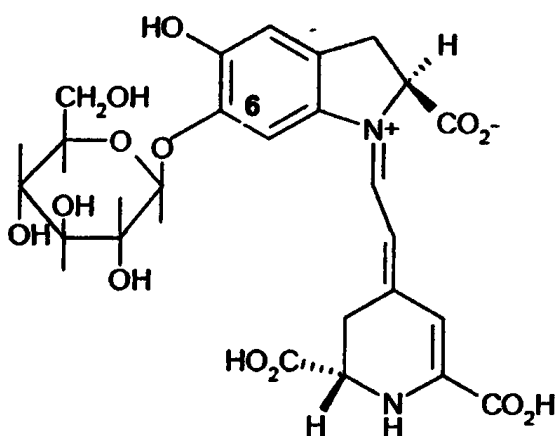
3.2. Μπετακυανίνες

Όλες οι μπετακυανίνες χρειάζονται δυο μόρια τυροσίνης ως πρόδρομα μόρια. Οι απλούστερες φυσικές μπετακυανίνες είναι τα μη-γλυκοζιτικά χρωμοφόρα μπετανιδίνη (betanidin) ή ισομπετανιδίνη (isobetanidin) που παράγονται από την συνένωση του μπεταλαμικού οξέως με το cyclo-DOPA. Τα δύο μόρια διαφέρουν μόνο στη διαμόρφωση στη θέση του άνθρακα C-15. Στο ρίζωμα του τεύτλου η αναλογία μεταξύ των δύο ενώσεων είναι περίπου 4 προς 1 (Εικόνα 7).

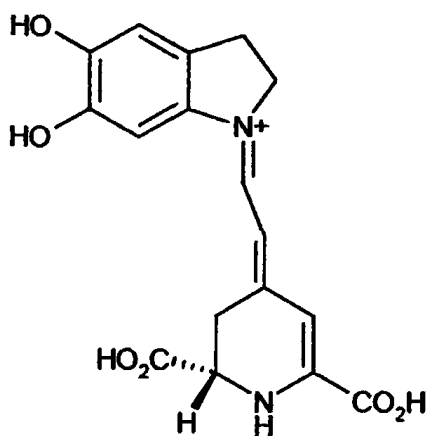


Εικόνα 7. Τα μη-γλυκοζιτικά χρωμοφόρα μπετανιδίνη και ισομπετανιδίνη και η διαμόρφωσή τους στην θέση του άνθρακα C-15.

Άλλες μπετακυανίνες προέρχονται από αυτά τη γλυκοζιλίωση ενός από τα υδροξυλικά γκρούπ του cyclo-DOPA των δύο αυτών ισομερών. Η γλυκοζιλίωση στην θέση 5 δίνει μπετανίνη (betanin) που είναι η σημαντικότερη χρωστική του παντζαριού. Μέχρι σήμερα, η μόνη γνωστή μη-γλυκοζυλιωμένη μπετακυανίνη ήταν η 2-descarboxy-betanidin (Εικόνα 8), η κύρια χρωστική ουσία των ανθέων του *Carpobrotus acinaciformis* (Aizoaceae). Πρόσφατα, μικρή ποσότητα αυτής της χρωστικής ανιχνεύθηκε επίσης στο κίτρινο τεύτλο (yellow beet) με την ταυτόχρονη παρουσία δύο νέων παρόμοιων χρωστικών, την 2-descarboxy-betanin και την 6'-O-malonyl-2-descarboxy-betanin.



Gomphrenin I



2-Descarboxy-betanidin

Εικόνα 8. Διάφοροι τύποι γλυκοζυλίωσης των μετακυανινών.

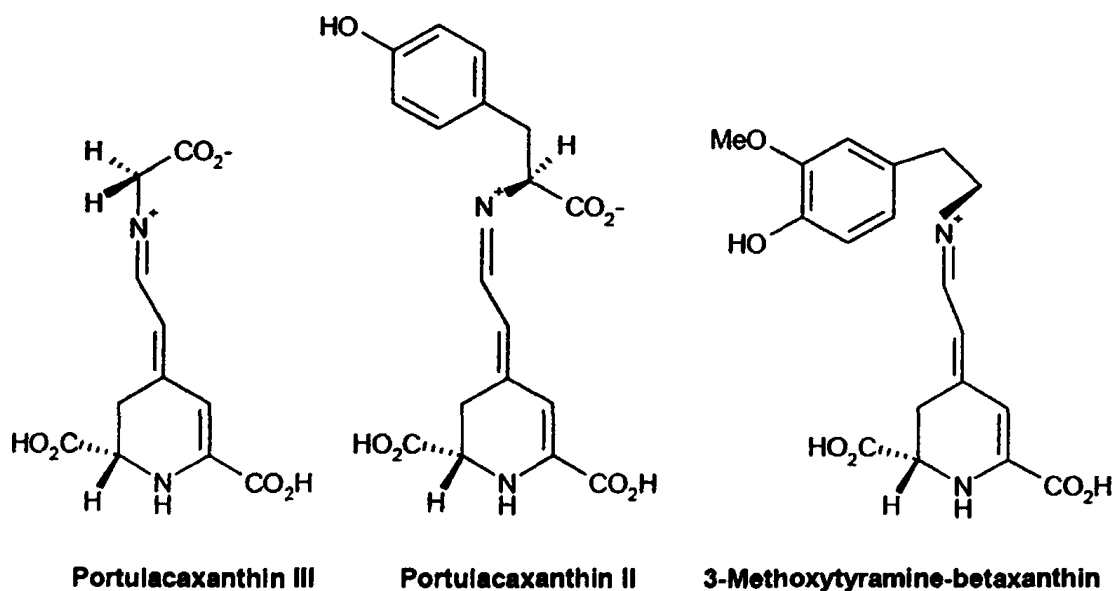
Η πλειοψηφία των μετακυανινών είναι ακυλιωμένες από το φερουλικό οξύ (ferulic acid) ή λιγότερο συχνά από το κινναμικό οξύ (cinnamic acid) μέσω εστεροποίησης του γλυκοζιτικού τους μέρους.

Ένας νέος τύπος ακυλιωμένης μετακυανίνης που περιέχει ένα αλειφατικό και ένα υδροξυκινναμικό αρωματικό ακύλιο έχει ανιχνευθεί στην *Phytolacca americana*. Αυτό το είδος της ακυλίωσης έχει επίσης παρατηρηθεί στις σύνθετες ανθοκυάνες.

3.3 Μπεταξανθίνες

Οι κίτρινες μπεταξανθίνες είναι ενώσεις-παράγωγα του μπεταλαμικού οξέως με μια αμίνη ή ένα αμινοξύ. Όλα τα πρωτεϊνικά αμινοξέα και οποιοδήποτε από τα 220 γνωστά μη-πρωτεϊνικά αμινοξέα που έχουν βρεθεί στα φυτά, μπορεί να συμμετάσχουν στα μόρια της μπεταξανθίνης. Επομένως πολυάριθμες μπεταξανθίνες μπορούν να βρεθούν στα φυτά, αλλά μόνο μερικές από αυτές έχουν χαρακτηριστεί πλήρως, οι περισσότερες από αυτές απαντώνται μόνο σε ίχνη.

Η ταξινόμηση των μπεταξανθινών διακρίνει τις προερχόμενες από ένα αμινοξύ ή από μια αμίνη. Η πρώτη απομονωμένη δομή ήταν η ινδικαξανθίνη (indicaxanthin) (Εικόνα 2) από τον καρπό του *Opuntia ficus-indica*. Κατά την διάρκεια των τελευταίων δεκαπέντε χρόνων πολυάριθμες νέες δομές μπεταξανθινών έχουν προσδιοριστεί (Εικόνα 9).



Εικόνα 9. Χημική δομή ορισμένων μπεταξανθινών.

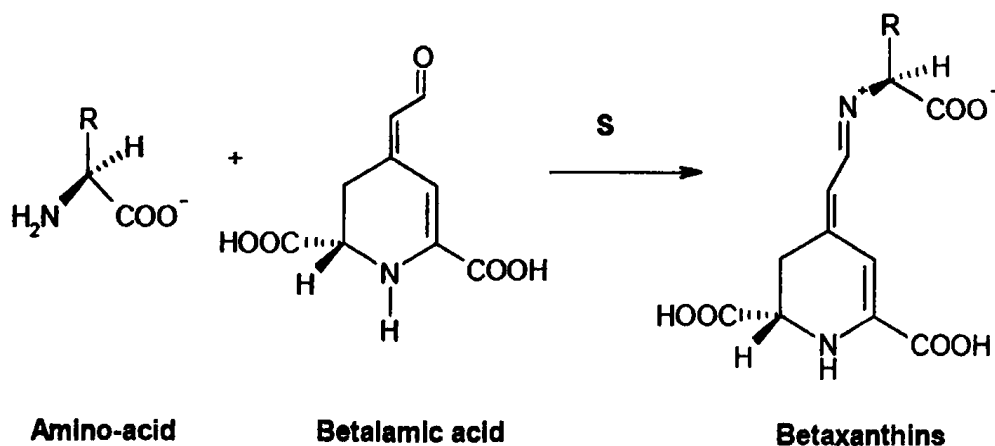
Στο *Portulaca grandiflora* προσδιορίστηκαν δύο χρωστικές, μία που περιέχει τυροσίνη (portulacaxanthin II) και μία που περιέχει γλυκίνη (portulacaxanthin III). Από την *Celosia argentea* (Amaranthaceae) έχουν απομονωθεί η tryptophan-betaxanthin και η πρώτη μεθυλιωμένη μπεταξανθίνη, 3-methoxytyramine-betaxanthin.

Πρόσφατα, επτά νέες χρωστικές από το φυτό *Opuntia ficus-indica* έχουν προσδιορισθεί, έξι από τις οποίες για πρώτη φορά στα φυτά. Αυτό φέρνει στο προσκήνιο το θέμα της επιλογής της μεθοδολογίας για τον προσδιορισμό των μπεταξανθινών όταν αυτές περιέχονται σε ίχνη.

Σύμφωνα με τον Stintzing, ο εμπλουτισμός του εκχυλίσματος των φυτών σε μπεταξανθίνες, μετά από το διαχωρισμό από τα σάκχαρα και τις πηκτίνες, δίνει ένα πιο λεπτομερές προφίλ κοντά στην «in vino» χημική ποικιλομορφία (Stintzing et al., 2002).

Διάφορες μπεταξανθίνες έχουν προσδιορισθεί επίσης στον μύκητα *Amanita muscaria*. Ο *A. muscaria* δεν περιέχει μπετακυανίνες αλλά κόκκινες και κίτρινες παραγόμενες ενώσεις του μπεταλαμικού οξέως, οι οποίες καλούνται musca-purpurin (λmax 540 nm) και musca-flavin (λmax 420 nm) αντίστοιχα.

Μπεταξανθίνες μπορούν εύκολα να παραχθούν μη-ενζυμικά «in vitro» με την ανάμειξη μπεταλαμικού οξέως και της επιθυμητής αμίνης σε ουδέτερο ή ελαφρώς όξινο pH, κάτι που γίνεται αυθόρμητα στο όξινο περιβάλλον του φυτικού χυμοτοπίου (Schliemann et al. 1999) (Εικόνα 10).



Εικόνα 10. Μη-ενζυμική σύνθεση μπεταξανθίνης σε ουδέτερο ή ελαφρώς όξινο περιβάλλον.

3.4. Η φυσιολογία των μπεταλαϊνών

Η σύνθεση των μπετακυανινών ή των μπεταξανθινών δεν απαιτεί φως στα περισσότερα είδη που έχουν εξεταστεί μέχρι τώρα, αν και το φως είναι ένας σημαντικός παράγοντας που ελέγχει τις ποσότητες των παραγόμενων χρωστικών ουσιών. Το φυτόχρωμα εμπλέκεται στην φωτοελεγχόμενη σύνθεση της amaranthin στο *Amaranthus paniculatus*, ένα από τα ελάχιστα είδη που έχουν μια απόλυτη απαίτηση στο φως. Σε σπορόφυτα του *Amaranthus tricolor* έχει αποδειχθεί ο φωτοέλεγχος. Αυτός ο φωτοέλεγχος περιλαμβάνει μπλε και κόκκινο φως και γίνεται πιθανώς με την μεσολάβηση του φυτοχρώματος και του κρυπτοχρώματος (cryptochrome) (Wohlpart and Mabry, 1968).

Οι Girod και Zryd (1987) παρατήρησαν στο *Beta vulgaris* την εμφάνιση χρωματισμένων κυττάρων σε πράσινους κάλλους όταν μεταφέρονταν από το αμυδρό φως σε περιβάλλον με υψηλή ένταση φωτισμού. Αυτή η διαφοροποίηση οφείλεται στην εξάρτηση από το φως (Girod and Zryd, 1987). Το μπλε φως προκαλεί τον χρωματισμό σε κάλλους του φυτού Grandiflora (Kishima et al., 1995).

3.5. Ιστοκαλλιέργεια

Η ιστοκαλλιέργεια και η καλλιέργεια ριζωμάτων από τα φυτά που παράγουν μεταλαϊνες έχουν καθιερωθεί, είτε για την βασική έρευνα πάνω στη διαδικασία βιοσύνθεσης τους, είτε με το σκοπό την παραγωγή των υψηλής ποιότητας ιωδών και κίτρινων χρωστικών ουσιών για την βιομηχανία τροφίμων. Η χαμηλή όμως τιμή αγοράς του εκχυλίσματος του παντζαριού έθεσε όρια στην πιθανή κατασκευή εργοστασίων παρασκευής τέτοιων χρωστικών ουσιών. Με σωστό χειρισμό όμως της ιστοκαλλιέργειας μπορεί να παραχθεί μεγάλη ποσότητα καθαρής χρωστικής ουσίας, η παραγωγή μετακυανινών μπορεί να αγγίξει τα 28 mg/gr ξηρού βάρους ιστού, που είναι πολύ παραπάνω από το περιεχόμενο του καλλιεργούμενου παντζαριού (Shin et al., 2002, Leathers et al. 1992).

3.6. Η αποδόμηση των μεταλαϊνών

Η in-vivo αποδόμηση των μεταλαϊνών είναι σημαντική για τον έλεγχο των επιπέδων τους και την ανακύκλωση του αζώτου μέσα στο φυτό. Από in-vitro και μετασυλλεκτικές μελέτες έχει αποδειχθεί ότι η μετανίνη αποδομείται σε μεταλαμικό οξύ και cyclo-DOPA-5-O-b-D γλυκοζίδιο (Schwartz and Von Elbe, 1983). Η αποδόμηση είναι αντιστρεπτή και μπορεί να συνοδεύεται από την σύνθεση μεταξανθίνης υπό την παρουσία της απαραίτητης αμίνης. Η αποδόμηση την μετανίνης σε μετανιδίνη πιθανώς καταλύεται από το ένζυμο β-γλυκοζιδαση (Zakharova and Petrova, 2000).

Οι υπεροξειδάσες πιστεύεται ότι περιλαμβάνονται στην αποδόμηση των μεταλαϊνών, αποχρωματίζοντας την μετανίνη και την μετανιδίνη παρουσία O₂. Η κινόνη της μετανιδίνης σχηματίσθηκε ως το μόνο προϊόν της ενζυματικής οξείδωσης της μετανιδίνης, ενώ το μεταλαμικό οξύ και αρκετά οξειδωμένα cyclo-DOPA-5-O-b-D πολυμερή γλυκοζίδια παρήχθησαν κατά την οξείδωση της μετανίνης.

4. ΤΟ ΠΑΝΤΖΑΡΙ

Τα τεύτλα *Beta Vulgaris* με $2\chi=18$ και $4\chi=36$ χρωματοσώματα, της οικογένειας Chenopodiaceae είναι φυτό αυτοφυές της Ευρώπης, όπως και της Βόρειας και Δυτικής Ασίας και γνωστό από την αρχαιότητα. Ο Θεόφραστος πιθανώς να αναφέρεται σε αυτό ως «τεύτλιον το μέλαν». Τα σακχαρότευτλα, τα κτηνοτροφικά τεύτλα και τα λαχανοκομικά τεύτλα ανήκουν στο ίδιο είδος.

Επίσης διακρίνονται τα παρακάτω βοτανικά είδη:

- *Beta vulgaris* var *maritima*, αυτοφυές και γνωστό ως άγριο σέσκουλο.
- *Beta vulgaris* var *cicla*, είναι το καλλιεργούμενο σέσκουλο.

Από νεότερη ταξινόμηση το παντζάρι κατατάσσεται στην βοτανική ποικιλία *Beta vulgaris* L. Koch.

Το παντζάρι καλλιεργείται για τη σαρκώδη γογγυλόριζα και για τα φύλλα του.

Το βρώσιμο τμήμα του ριζοκονδύλου αποτελείται από αλλεπάλληλους κύκλους ιστών, αγωγού και αποθηκευτικού ιστού. Οι λωρίδες του αποθηκευτικού ιστού είναι σχετικά ευρείες και σκοτεινές, ενώ του αγωγού ιστού σχετικά στενές και ανοιχτόχρωμες. Η εναλλαγή αυτή του χρώματος διαφέρει από ποικιλία σε ποικιλία, όπως και στην ίδια ποικιλία. Υψηλές θερμοκρασίες συντελούν σε μειωμένη ανάπτυξη χρώματος του ριζοκονδύλου.

Το τεύτλο έχει αρκετό ριζικό σύστημα με ρίζες 70-90 cm, με πολλές διακλαδώσεις κοντά στην πεπαχημένη ρίζα.

Το στέλεχος είναι μικρός δισκοειδής, όπως του καρότου. Τα φύλλα είναι απλά, σπειροειδώς τακτοποιημένα κοντά στο ρόδακα. Το χρώμα τους ποικίλλει από βαθύ ερυθρό μέχρι χλωροπράσινο. Υπάρχουν στομάτια στις δύο επιφάνειες του φύλλου την άνω και την κάτω. Τα φύλλα έχουν την ίδια ερυθρή χρωστική (μπετανίνη) η οποία χαρακτηρίζει τα τεύτλα.

Το φυτό είναι διετές. Κατά το δεύτερο έτος του φυτού σχηματίζεται ανθικό στέλεχος ύψους 1,5 μέτρου περίπου, διακλαδιζόμενο, επί του οποίου σχηματίζονται τα άνθη κατά ταξιανθίες.

Η ρίζα του παντζαριού αποτελείται από 86% νερό, 1% πρωτεΐνες και 9% υδατάνθρακες.

4.1. Η καλλιέργεια του *Beta vulgaris* L. Koch.

Εδαφοκλιματικές απαιτήσεις

Το φυτό είναι δυνατόν να καλλιεργηθεί οπουδήποτε, ευδοκimeί όμως σε κλίματα εύκρατα. Είναι αρκετά ανθεκτικό στο ψύχος ενώ καλλιεργούμενο κατά την ψυχρότερη εποχή δίνει γογγυλόριζα με εντονότερο ερυθρό χρώμα.

Καταλληλότερα για την καλλιέργεια του εδάφη είναι τα μέσης σύστασης ή ελαφρά, βαθιά και γόνιμα με pH 6-7 αν και ευδοκimeί επίσης και σε ελαφρώς αλκαλικά εδάφη. Επιθυμητή είναι η ύπαρξη αρκετής εδαφικής υγρασίας, όχι όμως υπερβολικής, η οποία επιδρά δυσμενώς στην ποιότητα του προϊόντος.

Σπορά

Η σπορά περιλαμβάνει 3 εφαρμογές από τον Δεκέμβριο έως τον Φεβρουάριο, κατευθείαν στο χωράφι, με πολλούς φρέσκους σπόρους. Για 1 στρέμμα χρειάζονται 1,25 κιλά σπόρου. Το έδαφος πριν την σπορά δουλεύεται και λιπαίνεται με ώριμα οργανικά λιπάσματα.

Άρδευση-Καλλιεργητικές φροντίδες

Κατά την διάρκεια ανάπτυξης της καλλιέργειας, γίνονται σκαλίσματα, ένα ή δύο αραιώματα, (ξεκινώντας όταν τα φυτά έχουν 3-4 φύλλα και έως ότου να βρεθούν σε απόσταση 25 εκ. το ένα από το άλλο) και συχνά ποτίσματα, γιατί σε ξερό έδαφος το φυτό ανθίζει.

Συγκομιδή

Η συγκομιδή του παντζαριού γίνεται βαθμιαία, ξεριζώνοντας τις ρίζες όταν αυτές ξεπροβάλλουν από το έδαφος και έχουν φθάσει περίπου τα δέκα εκατοστά. Οι ρίζες ομαδοποιούνται ανά 4 ή 6, πλένονται και μεταφέρονται στην αγορά.

4.2. Θρεπτικά στοιχεία και οφέλη για τον ανθρώπινο οργανισμό

Το παντζάρι είναι πλούσιο σε φώσφορο, σίδηρο, χαλκό, ιώδιο, θείο, ασβέστιο και μεταλλικά άλατα, βιταμίνη Β και κυρίως βιταμίνη Α. Όλα αυτά τα συστατικά το καθιστούν πολύτιμο για την ενδυνάμωση του αίματος.

Το χαρακτηριστικό του χρώμα οφείλεται στις μπεταλαΐνες, οι οποίες είναι υδατοδιαλυτές χρωστικές και ταξινομούνται στις κόκκινες μπετακυανίνες και στις κίτρινες μπεταξανθίνες. Η κύρια μπετακυανίνη είναι η μπετανίνη, που αποτελεί το 75 έως 95% των συνολικών χρωστικών του παντζαριού.

Οι μπεταλαΐνες είναι αντιοξειδωτικές ουσίες και γι αυτόν τον λόγο το παντζάρι θεωρείται πως έχει πιθανές αντικαρκινικές ιδιότητες. Χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα σε μεγάλη γκάμα τροφίμων στα οποία προσδίδουν το κόκκινο χρώμα τους αλλά και την



αντιοξειδωτική τους ικανότητα, καθιστώντας τες ένα φθηνό, ασφαλές και φυσικό συντηρητικό που όχι μόνο δεν βλάπτει τον οργανισμό αλλά τον ωφελεί.

Το παντζάρι είναι πλούσιο σε φυλλικό οξύ. Το φυλλικό οξύ είναι απαραίτητο για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων λόγω της συμμετοχής του στη σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων και απαραίτητο για την λειτουργία του νευρικού συστήματος. Επίσης, βοηθά στην αναγέννηση των ερυθρών αιμοσφαιρίων και γι αυτό η έλλειψή του προκαλεί μακροκυτταρική αναιμία.

Επιπλέον πρέπει να αναφερθεί πως το παντζάρι είναι πλούσιο σε κάλιο. Το κάλλιο ρυθμίζει τον όγκο των ενδοκυττάρων υγρών και επηρεάζει την σύσπαση των λείων μυικών ινών και έτσι είναι απαραίτητο για την διατήρηση του καρδιακού παλμού.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Στην εργασία αυτή θελήσαμε να διερευνήσουμε την επίδραση της συγκέντρωσης της αζωτούχου λίπανσης , χορηγούμενης υπό την μορφή N-NO_3^- στο θρεπτικό διάλυμα υδροπονικής καλλιέργειας:

1. στην ανάπτυξη και τις φυσιολογικές παραμέτρους των φύλλων των φυτών,
2. στην συγκέντρωση των ολικών φαινολικών και την κατανομή τους στα μέρη του φυτού (φύλλα, μίσχοι, ριζώματα),
3. στην συγκέντρωση της χρωστικής του παντζαριού, μπετακυανίνης, στα μέρη του φυτού (φύλλα, μίσχοι, ριζώματα),

με δεδομένο ότι μέχρι σήμερα έχει μελετηθεί η συγκέντρωση των φαινολικών και της μπετακυανίνης μόνο στην ρίζα των φυτών, η οποία χρησιμοποιείται σε παγκόσμια κλίμακα για τον κόκκινο χυμό της (Red beet juice).

5. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1. Ανάπτυξη της καλλιέργειας

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε πλαστικό θερμοκήπιο του ΤΕΙ Μεσολογγίου, από τις 10 Φεβρουαρίου έως τις 25 Απριλίου 2007. Η θερμοκρασία καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος κυμαινόταν από τους 15°C την νύχτα έως 30°C την ημέρα και επικρατούσαν συνθήκες φυσικού φωτισμού. Το θερμοκήπιο διαθέτει σύστημα δροσισμού υγρής επιφάνειας το οποίο και έμπαινε σε λειτουργία κατά τις θερμές ώρες της ημέρας.

Για το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν σπόροι παντζαριού (*Beta vulgaris* L.) οι οποίοι στην αρχή τοποθετήθηκαν μέσα στο θερμοκήπιο για 48 ώρες σε δίσκους με διηθητικό χαρτί το οποίο διαβρεχόταν κατά τακτά χρονικά διαστήματα. Αφού ενυδατώθηκαν οι σπόροι τοποθετήθηκαν σε σπορείο με υπόστρωμα περλίτη όπου ποτίζονταν με πλήρες θρεπτικό διάλυμα (Πίνακας 2), προκειμένου να αναπτυχθούν τα σπορόφυτα.

Μακροστοιχεία (mM)		Ιχνοστοιχεία (μM)	
KNO ₃	8	H ₃ BO ₃	45
Ca(NO ₃) ₂	4	MnCl ₂	9
MgSO ₄	2	ZnSO ₄	0,7
KH ₂ PO ₄	1	CuSO ₄	0,3
MgCl ₂	4	MoNa ₂ O ₄	0,1
NaFe-EDTA	0,4		

Πίνακας 2. Σύσταση πλήρες θρεπτικού διαλύματος υδροπονίας.

Μετά από τρεις εβδομάδες, όταν τα σπορόφυτα βρίσκονταν στο στάδιο του δεύτερου πραγματικού φύλλου, μεταφυτεύθηκαν σε έξι πλαίσια, κατασκευασμένα από ανοξείδωτο μέταλλο, διαστάσεων 100×15×15 cm. που ήταν εφοδιασμένα με σύστημα απορροής. Σε κάθε πλαίσιο φυτεύτηκαν 16 φυτά, σε υπόστρωμα περλίτη. Οι έξι διαφορετικές μεταχειρήσεις ποτίζονταν με θρεπτικό διάλυμα το οποίο διέφερε μόνο ως προς την συγκέντρωση των νιτρικών. Οι συγκεντρώσεις των NO₃ στις έξι μεταχειρίσεις είχαν ως εξής: 867, 560, 350, 260, 173 και 86 ppm. Η μείωση της συγκέντρωσης των νιτρικών, σε σχέση με το πλήρες θρεπτικό διάλυμα, έγινε με την μείωση των ποσοτήτων του KNO₃ και του Ca(NO₃)₂. Οι ελλείψεις σε ποσότητες σε ποσότητες K και Ca που προέρχονται από την μείωση των KNO₃ και Ca(NO₃)₂ αναπληρώνονται με



την προσθήκη KCl και K₂SO₄ στην περίπτωση του K και CaCl₂ και CaSO₄ στην περίπτωση του Ca.

Το θρεπτικό διάλυμα φυλασσόταν σε πλαστικά δοχεία των 20 λίτρων και το pH κυμαινόταν από 6,6 έως 6,9 καθ' όλη την διάρκεια της καλλιέργειας. Η χορήγηση των διαλυμάτων γινόταν με το χέρι και το διάλυμα δεν ανακυκλωνόταν.

5.2. Προσδιορισμός βιομάζας-Χλωροφυλλών

Πενήντα ημέρες μετά την έναρξη της εφαρμογής των διαφορετικών μεταχειρίσεων επιλέχθηκαν τρία φυτά από κάθε πλαίσιο ώστε να προσδιορισθεί η βιομάζα τους άλλα και η % περιεχόμενη υγρασία τους. Τα φυτά, αφού πλύθηκαν και στέγνωσαν, χωρίστηκαν στο υπέργειο και υπόγειο τμήμα τους και ζυγίστηκαν. Κατόπιν τοποθετήθηκαν σε πυριαντήριο με αέρα και σε θερμοκρασία 65°C . Εκεί παρέμειναν μέχρι να παρατηρηθεί σταθεροποίηση του βάρους τους μεταξύ δύο διαδοχικών ζυγίσεων (ανά 12 ώρες).

Ο υπολογισμός της περιεχόμενης υγρασίας έγινε με τον τύπο:

$$100 - (\Xi\eta\rho\acute{o} \text{ \textbf{B}\acute{a}\rho\omicron\varsigma} \times 100 / \text{N}\omega\pi\acute{o} \text{ \textbf{B}\acute{a}\rho\omicron\varsigma}).$$

Οι χλωροφύλλες μετρήθηκαν 40 ημέρες μετά την μεταφύτευση με το χλωροφυλλόμετρο SPAD-502 της Minolta (αυθαίρετες μονάδες).

5.3. Μέτρηση φυσιολογικών παραμέτρων

Η μέτρηση των φυσιολογικών παραμέτρων ξεκίνησε 40 ημέρες μετά την εφαρμογή των μεταχειρίσεων και πραγματοποιήθηκε με την χρήση του φορητού οργάνου μέτρησης της φωτοσύνθεσης LCI Portable Photosynthesis System (ADC BioScientific ltd. England). Μετρήθηκε η ταχύτητα φωτοσύνθεσης ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$), η ταχύτητα διαπνοής ($\text{mmol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$) και η στοματική αγωγιμότητα του CO₂ ($\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$).

Για τις μετρήσεις επιλέχθηκαν ώριμα φύλλα της ίδιας ηλικίας και οι μετρήσεις επαναλήφθηκαν την ίδια ώρα της ημέρας. Οι μετρήσεις επαναλήφθηκαν πέντε φορές.

5.4. Προσδιορισμός φαινολικών

Τα φυτά συλλέγονταν τις πρωινές ώρες από το θερμοκήπιο, κλείνονταν αεροστεγώς σε πλαστικές σακούλες και μεταφέρονταν στο ψυγείο του εργαστηρίου. Κάθε φυτό πριν την εκχύλιση, πλενόταν με νερό βρύσης, κατόπιν με απιονισμένο, και χωριζόταν σε τρία μέρη: έλασμα, μίσχο και ρίζωμα.

Οι εκχυλίσες έγιναν σε πορσελάνινο γουδί, με 1 gr φυτικού ιστού και 10 ml διάλυμα εκχύλισης το οποίο περιείχε Μεθανόλη : Απιονισμένο νερό : Φορμικό οξύ σε αναλογία 50 : 48,5 : 1,5 αντίστοιχα (Mazza et al. 1999).

Κατά την εκχύλιση αλλά και καθ' όλη την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας τα διαλύματα καθώς και τα εκχυλίσματα διατηρούνταν στον πάγο και στο σκοτάδι. Μετά την εκχύλιση το εκχύλισμα τοποθετήθηκε σε πλαστικό σωλήνα φυγοκέντρου 25 ml και ακολούθως φυγοκεντρήθηκε σε ψυχόμενη φυγόκεντρο Centra MP4R (IEC, USA) στα 10.000g για 10 λεπτά στους 4°C. Μετά την φυγοκέντρωση το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα και ακολούθησε αραίωση, με το διάλυμα μεθανόλης το οποίο χρησιμοποιήθηκε και κατά την εκχύλιση, 1/10 για όλα τα δείγματα. Το υπερκείμενο αυτό διάλυμα χρησιμοποιήθηκε για τις μετρήσεις στο φασματοφωτόμετρο. Συγκεκριμένα, για τα φύλλα ακολουθήθηκαν δυο αραιώσεις, η πρώτη 1/10 για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών, ταρταρικών εστέρων και φλαβονοειδών, ενώ για τον προσδιορισμό των μπετακυανινών η αραίωση ήταν 4/10.

Τα δείγματα αφήνονταν σε ηρεμία για 15 min και κατόπιν ακολουθούσαν οι μετρήσεις στο φασματοφωτόμετρο.

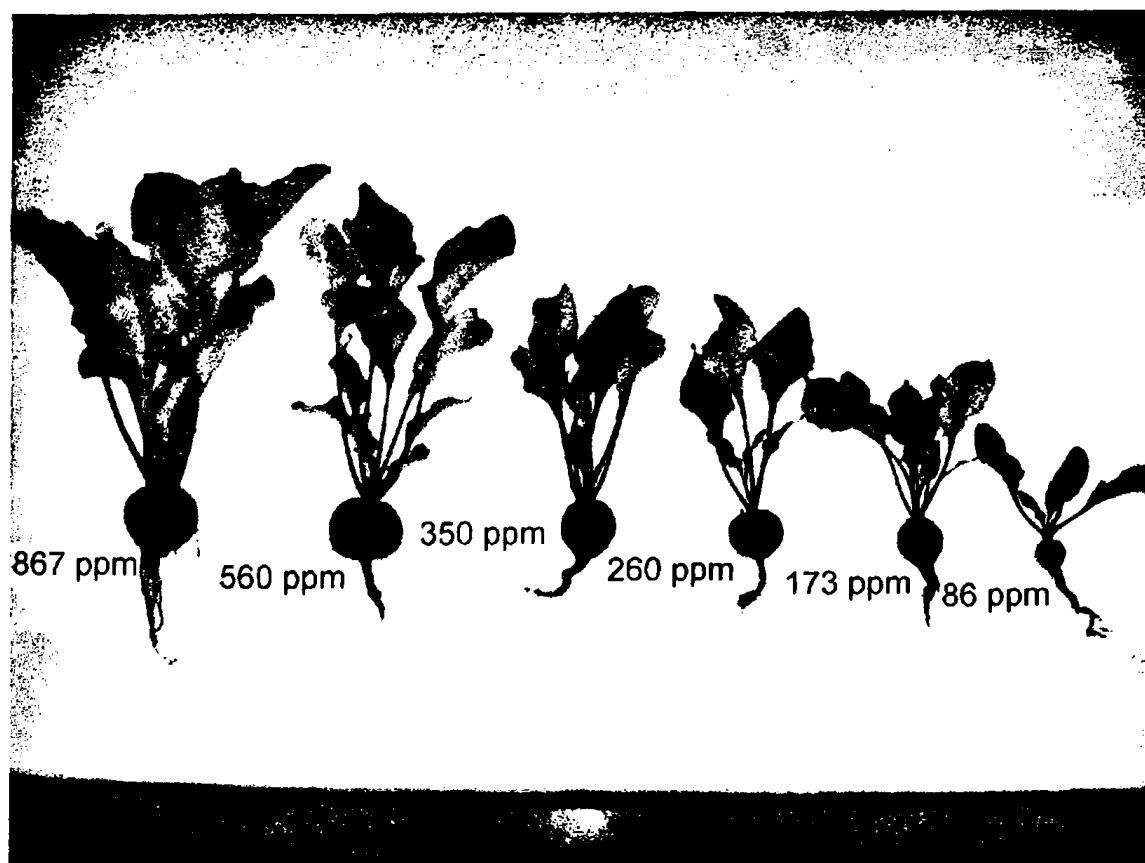
Για τον ποιοτικό και τον ποσοτικό προσδιορισμό των φαινολικών ουσιών χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο UV-1601 της Shimadzu.

Λάβαμε φάσμα από τα 190nm έως τα 900 nm μέσα στο οποίο και περιλαμβάνονται οι περιοχές απορρόφησης των ολικών φαινολικών (280 nm), ταρταρικών εστέρων (320 nm), φλαβονολών (360 nm) και μπεταλαϊνών (535 nm).

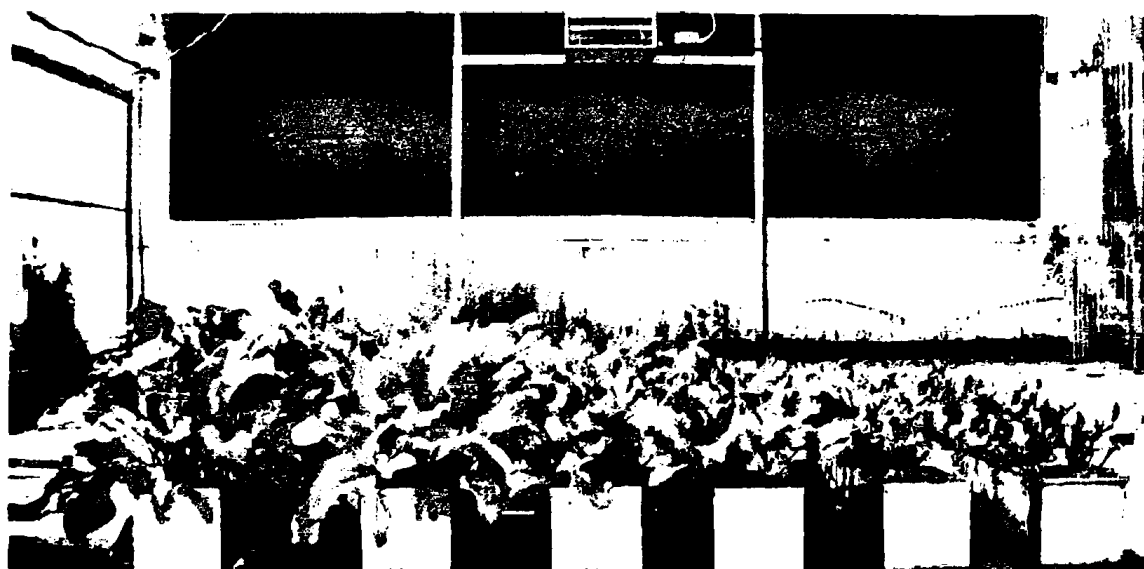
Τα πρότυπα διαλύματα για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ολικών φαινολικών, ταρταρικών εστέρων, φλαβονολών και μπεταλαϊνών παρασκευάστηκαν με την προσθήκη 10 mg Gallic acid (Sigma, USA), Caffeic acid (Sigma, USA), Quercetin (Extrasynthese, France) και 500 mg Betanin (Red Beet extract diluted with Dextrin, TCI EUROPE, BELGIUM) σε 100 ml διαλύματος εκχύλισης αντίστοιχα.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η συγκέντρωση των νιτρικών ιόντων στο θρεπτικό διάλυμα παίζει πρωτεύοντα ρόλο στην ανάπτυξη των φυτών του παντζαριού. Όπως φαίνεται από τις εικόνες 1 και 2, η ανάπτυξη των φυτών περιορίζεται σταδιακά καθώς μειώνονται τα χορηγούμενα νιτρικά, ιδιαίτερα κάτω από την συγκέντρωση των 560 ppm και μάλιστα στην χαμηλότερη συγκέντρωση (86 ppm) το χρώμα των φύλλων από πράσινο έχει γίνει ερυθρό-ιώδες (υπερίσχυση ποσοτικά των μετακυανινών σε σχέση με τις χλωροφύλλες).



Εικόνα 11 Φυτά παντζαριού στα οποία διακρίνονται οι διαφορές στην ανάπτυξη, τόσο στο υπέργειο τμήμα τους όσο και στο υπόγειο, σε σχέση με την χορηγούμενη ποσότητα νιτρικών στο θρεπτικό διάλυμα. Στην μεταχείριση των 86 ppm διακρίνεται και η αλλαγή του χρώματος των φύλλων από πράσινο σε ερυθρό-ιώδες.



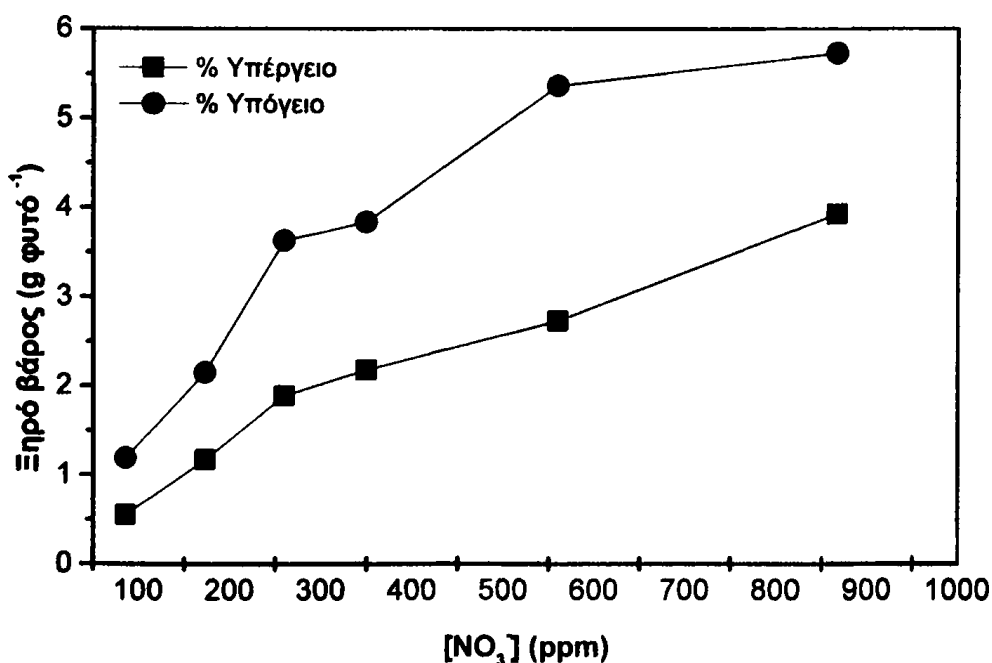
867 ppm, 560 ppm, 350 ppm, 260 ppm, 173 ppm, 86 ppm

Εικόνα 2 Φυτά παντζαριού στα πλαίσια καλλιέργειάς τους. Διακρίνονται οι συγκεντρώσεις των νιτρικών στο θρεπτικό διάλυμα, οι οποίες μειώνονται από αριστερά προς τα δεξιά. Διακρίνονται οι διαφορές στην ανάπτυξη του υπέργειο τμήματός τους.

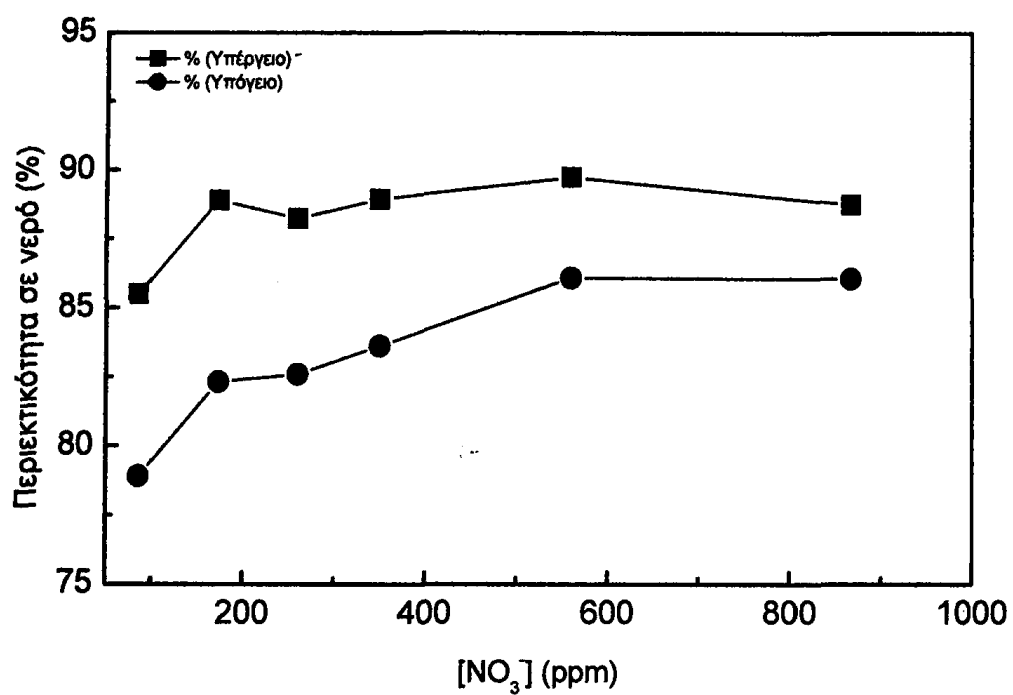
6.1. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΩΝ ΝΙΤΡΙΚΩΝ ΙΟΝΤΩΝ ΤΟΥ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΜΑΖΑΣ ΚΑΙ ΣΤΗΝ % ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ ΣΕ ΝΕΡΟ.

Η μείωση της συγκέντρωσης των νιτρικών ιόντων στο θρεπτικό διάλυμα είχε αρνητική επίδραση στην παραγωγή ξηρής βιομάζας, τόσο του υπέργειου τμήματος των φυτών, όσο και του ριζικού συστήματος (Εικόνα 13). Η μείωση του ξηρού βάρους ήταν εντονότερη στις χαμηλές συγκεντρώσεις νιτρικών, και ιδιαίτερα στις συγκεντρώσεις των 173 και 86 ppm. Η αναλογία ξηρής μάζας υπέργειου/υπόγειου μειώθηκε σταδιακά όσο ελαττωνόταν και η συγκέντρωση των νιτρικών στο θρεπτικό διάλυμα. Έτσι στα 867 ppm NO_3^- ο λόγος ξηρού βάρους υπέργειου/ρίζας ήταν 0,68 ενώ στα 86 ppm NO_3^- βρέθηκε 0,46.

Επιπλέον η % περιεκτικότητα των φυτών σε νερό, τόσο του υπέργειου όσο και του υπόγειου τμήματος έδειξε μία μικρή σχετικά μείωση καθώς μειώνονταν τα χορηγούμενα νιτρικά, η οποία στην χαμηλότερη συγκέντρωση ήταν ιδιαίτερα μεγάλη, 86 % για το υπέργειο και 75% για το υπόγειο μέρος των φυτών (Εικόνα 14).



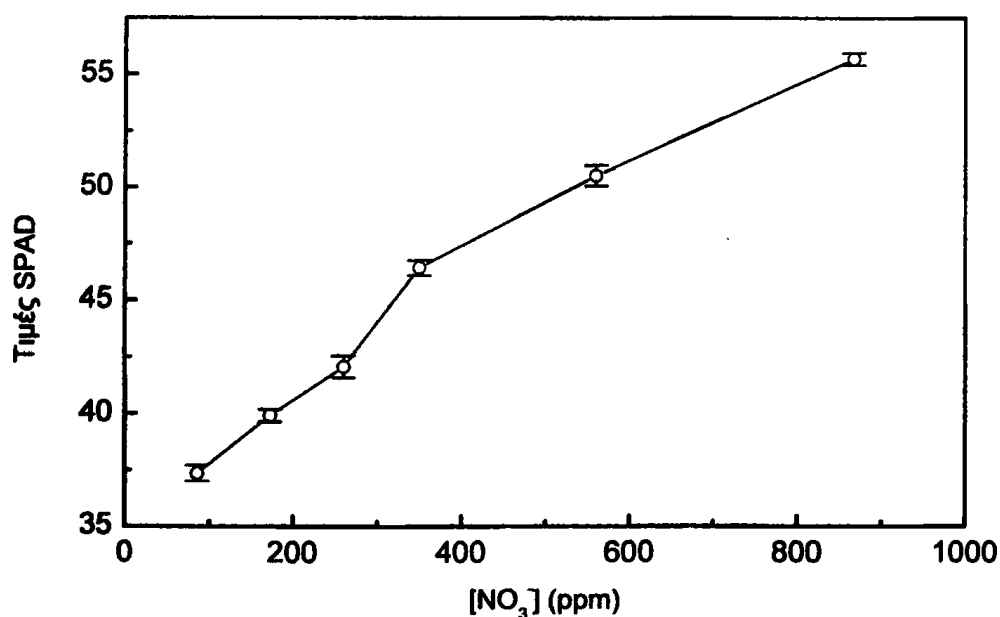
Εικόνα 13. Επίδραση της συγκέντρωσης των νιτρικών του θρεπτικού διαλύματος στην παραγωγή βιομάζας.



Εικόνα 14. Επίδραση της συγκέντρωσης των νιτρικών του θρεπτικού διαλύματος στην % περιεκτικότητα των ιστών σε νερό.

6.2. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΩΝ ΝΙΤΡΙΚΩΝ ΙΟΝΤΩΝ ΤΟΥ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ ΣΤΗΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΤΩΝ ΧΛΩΡΟΦΥΛΛΩΝ ΣΤΑ ΦΥΛΛΑ.

Στην Εικόνα 15 εμφανίζεται η συσχέτιση της συγκέντρωσης των νιτρικών του θρεπτικού διαλύματος με την συγκέντρωση των συνολικών χλωροφυλλών στα φύλλα των φυτών (total chlorophylls=Chla+Chlb). Παρατηρείται μια συνεχής αύξηση των χλωροφυλλών που κυμαίνεται σε τιμές SPAD (αυθαίρετες μονάδες) από 37 στα 86 ppm έως και 56 στα 867 ppm NO_3^- .



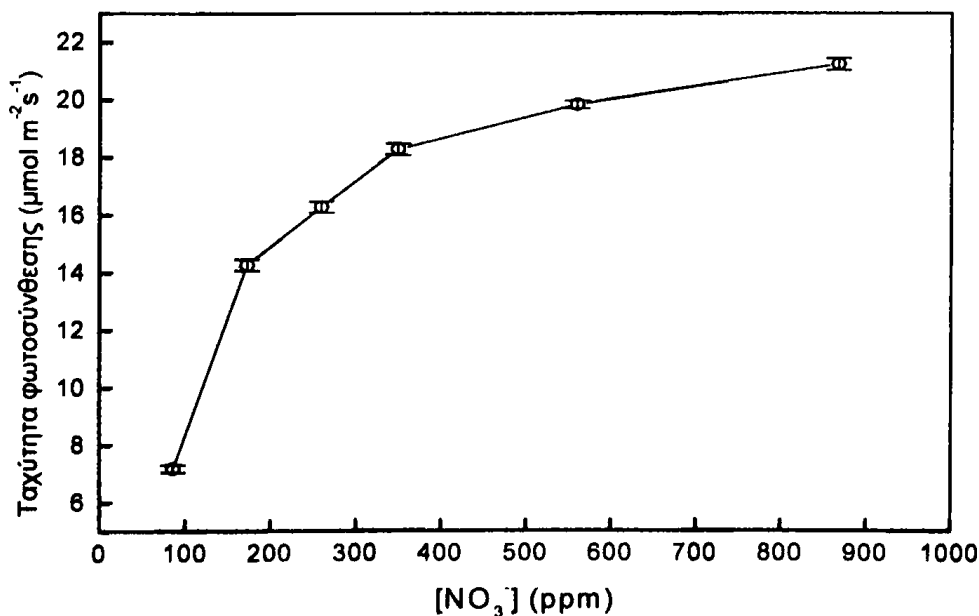
Εικόνα 15. Επίδραση της συγκέντρωσης των νιτρικών του θρεπτικού διαλύματος στην συγκέντρωση των συνολικών χλωροφυλλών

6.3. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΩΝ ΝΙΤΡΙΚΩΝ ΙΟΝΤΩΝ ΤΟΥ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ ΣΤΙΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ ΤΩΝ ΦΥΛΛΩΝ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ.

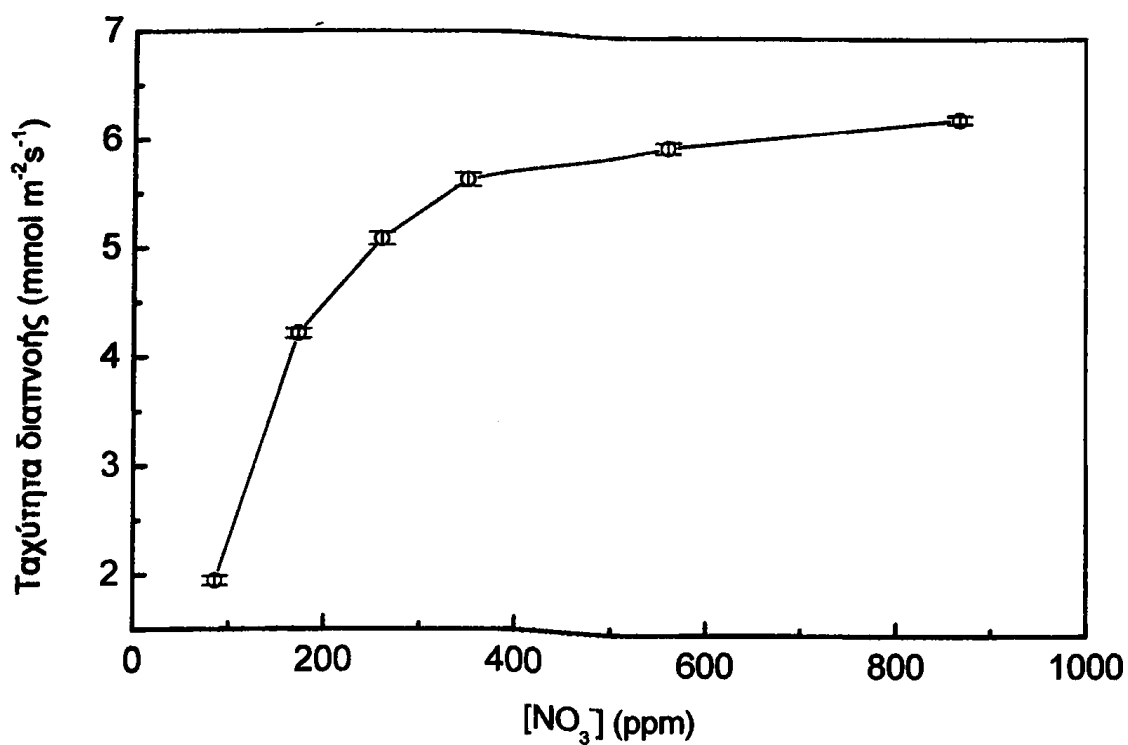
Όπως φαίνεται από την εικόνα 16 η αφομοίωση του CO_2 στα φύλλα των φυτών σε σχέση με την χορηγούμενη ποσότητα νιτρικών στο θρεπτικό διάλυμα ακολουθεί μια εκθετική αύξηση. Είναι ιδιαίτερα έντονη στις χαμηλές συγκεντρώσεις NO_3^- (από 86 έως και 350 ppm), ενώ πάνω από τα 350 ppm η αύξηση αυτή είναι οριακή. Η ελάχιστη φωτοσυνθετική ταχύτητα ($7,18 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) μετρήθηκε στα 86 ppm NO_3^- ενώ η μέγιστη ($21,22 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) στην μεταχείριση με την υψηλότερη συγκέντρωση νιτρικών (867 ppm).

Στην εικόνα 17 αποκαλύπτεται ότι υπάρχει παρόμοια θετική συσχέτιση μεταξύ της χορήγησης νιτρικών ιόντων και της ταχύτητας της διαπνοής. Η ελάχιστη διαπνοή ($0,08 \text{ mmol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) παρατηρήθηκε στην χαμηλότερη συγκέντρωση νιτρικών (86 ppm) και η μέγιστη στην αντίστοιχη υψηλότερη συγκέντρωση νιτρικών ιόντων (867 ppm).

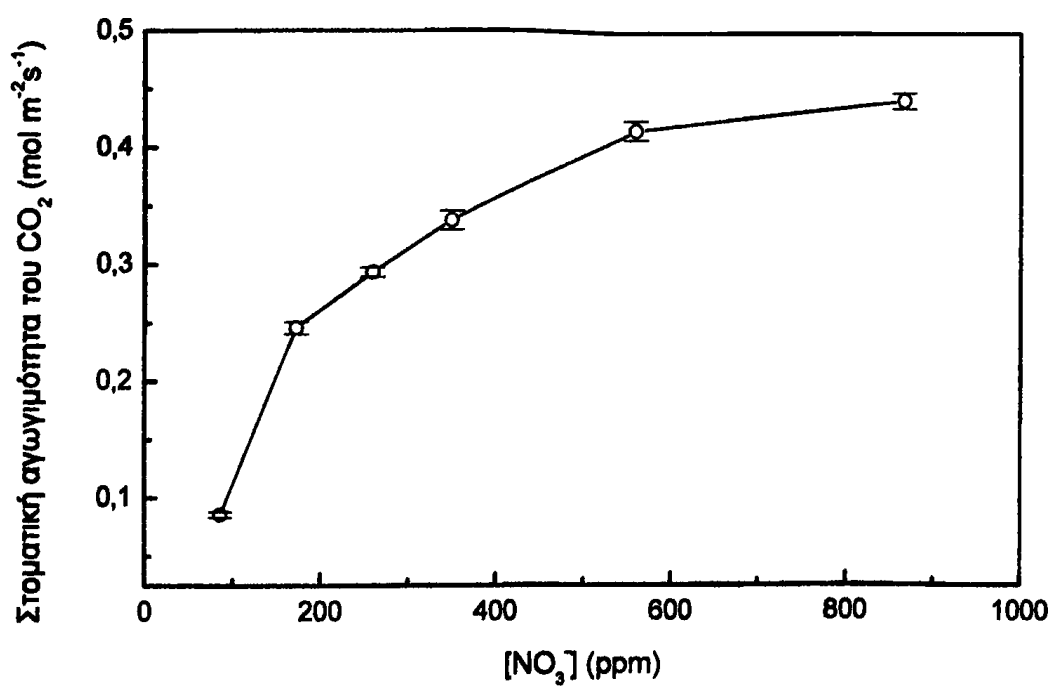
Τέλος η μέτρηση της στοματικής αγωγιμότητας του CO_2 στα φύλλα έδειξε ότι υπάρχει εκθετική συσχέτιση μεταξύ των σημειούμενων τιμών της στοματικής αγωγιμότητας και της συγκέντρωσης των χορηγουμένων νιτρικών ιόντων στο θρεπτικό διάλυμα μέχρι και τα 350 ppm, η οποία γίνεται οριακή από τα 560 μέχρι και τα 867 ppm (εικόνα 18). Η μέγιστη τιμή στοματικής αγωγιμότητας ($0,44 \text{ mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) βρέθηκε στα 867 ppm NO_3^- ενώ η ελάχιστη ($0,08 \text{ mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) στα 86 ppm NO_3^- αντίστοιχα.



Εικόνα 16. Επίδραση της συγκέντρωσης των νιτρικών του θρεπτικού διαλύματος στην ταχύτητα φωτοσύνθεσης.



Εικόνα 17. Επίδραση της συγκέντρωσης των νιτρικών του θρεπτικού διαλύματος στην ταχύτητα διαπνοής.



Εικόνα 18. Επίδραση της συγκέντρωσης των νιτρικών του θρεπτικού διαλύματος στην στοματική αγωγιμότητα του CO₂

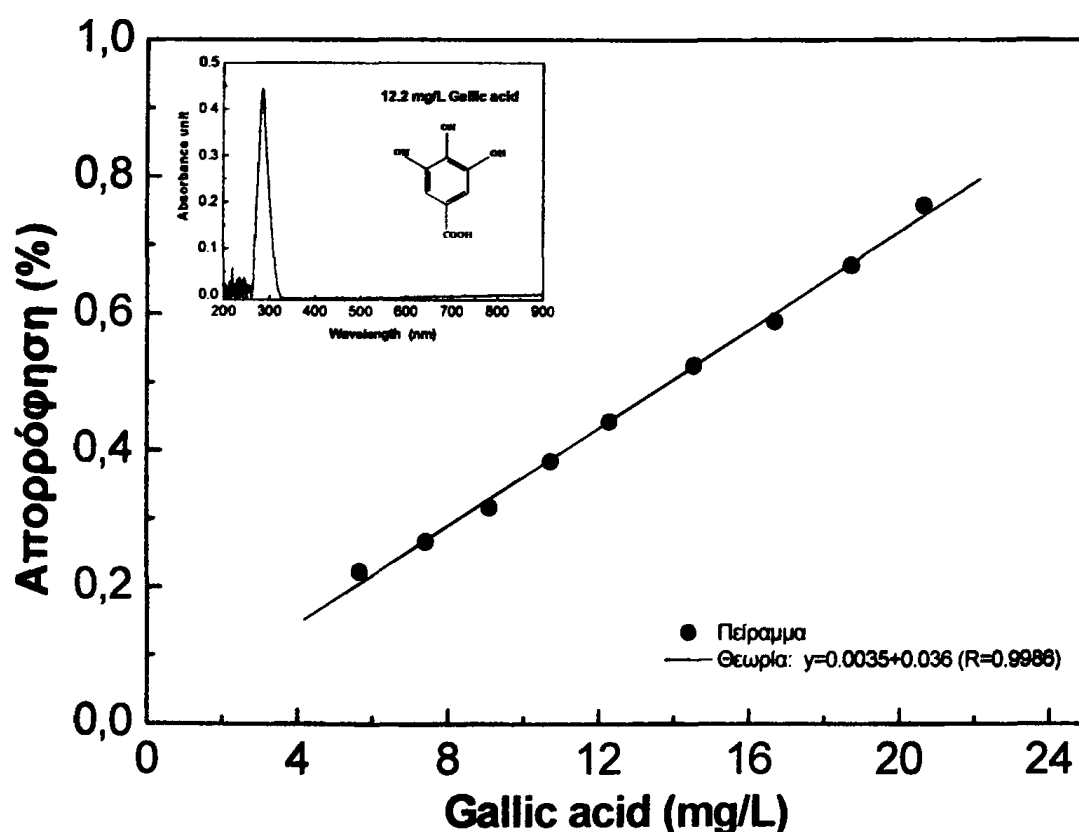
6.4. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ

α. Πρότυπες καμπύλες

α1. Πρότυπη καμπύλη προσδιορισμού των ολικών φαινολικών

Με την μέθοδο της σταθερής προσθήκης (standard addition), μέσω διαδοχικών αραιώσεων από stock διάλυμα Gallic acid 100 ppm, προέκυψε η πρότυπη καμπύλη της Εικόνας 19, η οποία περιγράφεται μέσω της ακόλουθης εξίσωσης ευθείας $y=0,0035+0,036$ και με συντελεστή συσχέτισης θεωρίας-πειράματος $R=0,9986$.

Μέσω αυτής της καμπύλης έγινε ο ποσοτικός προσδιορισμός των ολικών φαινολικών ουσιών στα δείγματά μας σε μήκος κύματος 280 nm (Mazza et al. 1999).

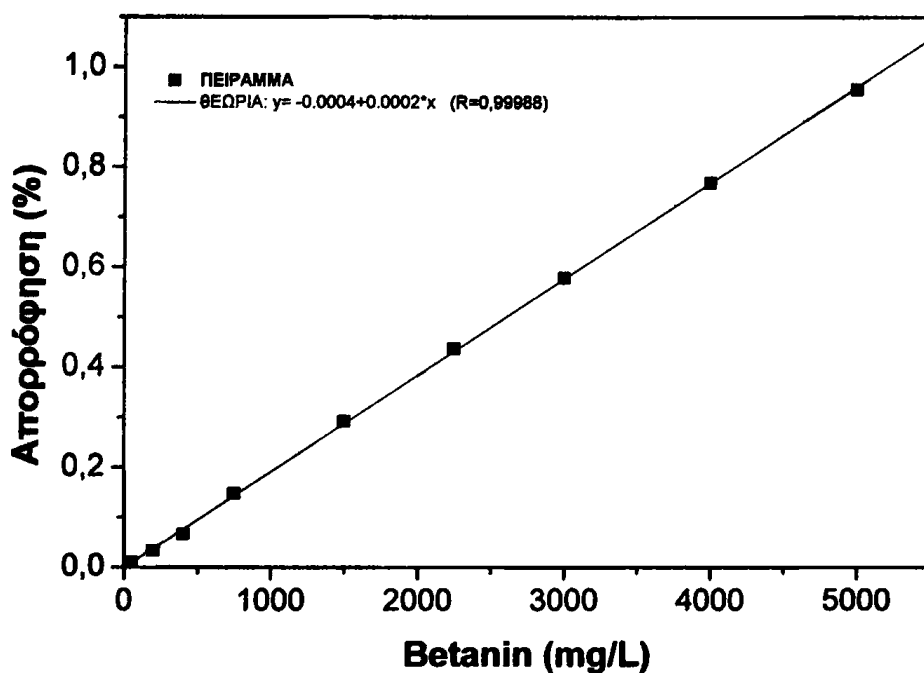


Εικόνα 19. Πρότυπη καμπύλη προσδιορισμού ολικών φαινολικών. Στο ένθετο της εικόνας παρουσιάζεται το μόριο του Gallic acid καθώς και το φάσμα απορρόφησης στα 280 nm μέσα σε πρότυπο διάλυμα Methanol:H₂O: Formic acid σε αναλογία 50:48,5:1,5.

α2. Πρότυπη καμπύλη προσδιορισμού των μπετακυανινών.

Με την μέθοδο της σταθερής προσθήκης (standard addition) από stock διάλυμα Betanin 5.000 ppm προέκυψε η πρότυπη καμπύλη της Εικόνας 20, με εξίσωση ευθείας $y=0,00004+0,002x$ και με συντελεστή συσχέτισης θεωρίας $R=0,99988$.

Μέσω της καμπύλης αυτής έγινε ο ποσοτικός προσδιορισμός των μπετακυανινών στα δείγματά μας σε μήκος κύματος 535 nm (Mazza et al. 1999).



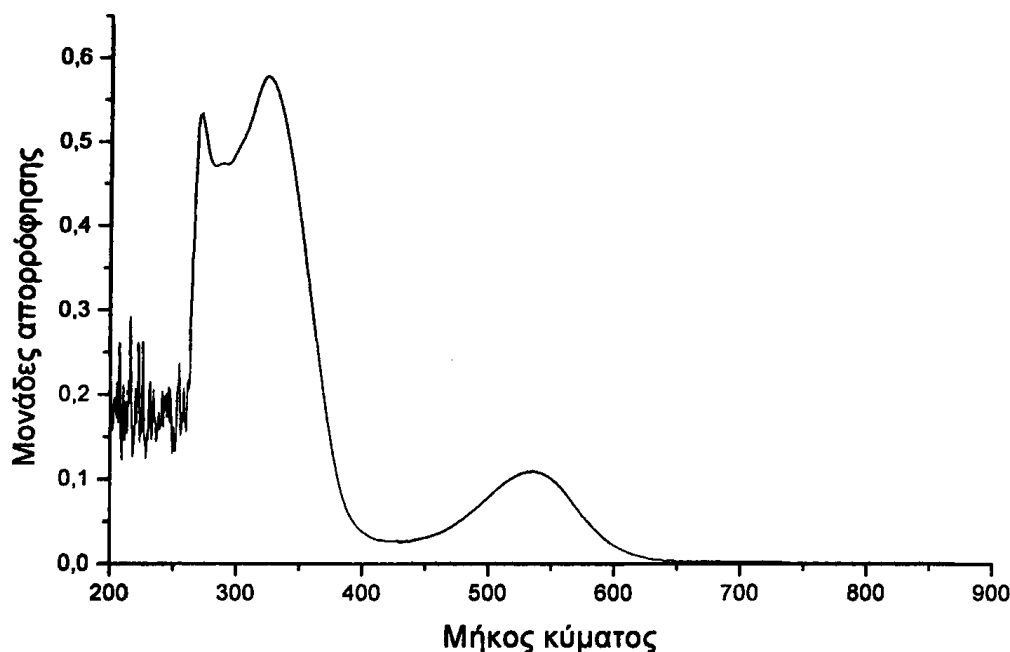
Εικόνα 20. Πρότυπη καμπύλη προσδιορισμού μπετακυανινών.

α3. Πρότυπες καμπύλες προσδιορισμού ταρταρικών εστέρων και φλαβονοειδών.

Με την ίδια ακριβώς διαδικασία και την χρησιμοποίηση πρότυπων ουσιών Caffeic acid και Quercetin, για την παρασκευή stock διαλυμάτων συγκέντρωσης 100 ppm, προέκυψαν οι πρότυπες καμπύλες για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ταρταρικών εστέρων (320 nm) και των φλαβονοειδών (360 nm) αντίστοιχα (Mazza et al. 1999).

β. Περιγραφή φασμάτων απορρόφησης ορατού-υπεριώδους (UV/VIS)

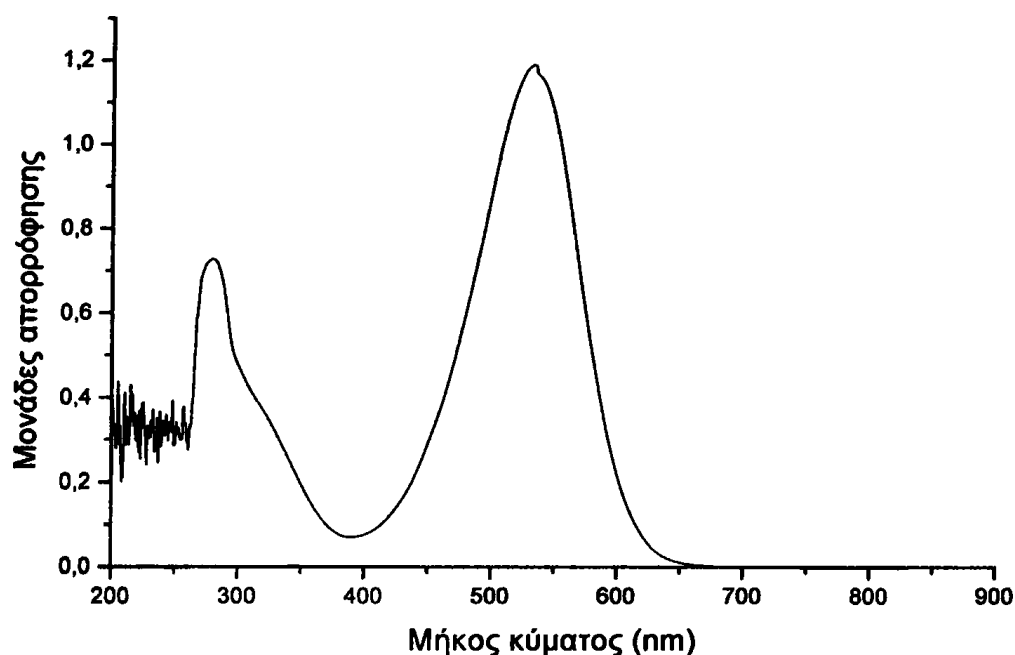
β1. Φάσμα απορρόφησης εκχυλίσματος των φύλλων



Εικόνα 21. Φάσμα απορρόφησης φύλλων των φυτών που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό διάλυμα συγκέντρωσης νιτρικών 86 ppm.

Στην Εικόνα 21 παρουσιάζεται το φάσμα απορρόφησης των φύλλων του παντζαριου, στην χαμηλότερη συγκέντρωση νιτρικών του θρεπτικού διαλύματος (86 ppm). Σύμφωνα με την παραπάνω εικόνα παρατηρούμε μια ενεργή φασματική περιοχή από 260 nm έως 650 nm. Μέσα σε αυτήν την περιοχή διακρίνουμε τρεις έντονες απορροφήσεις (κορυφές) στα 280 nm, στα 320 nm και στα 535 nm. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία οι κορυφές στα 280 nm αντιστοιχεί στα ολικά φαινολικά, η κορυφή στα 320 nm στους ταρταρικούς εστέρες και η κορυφή στα 535 nm στις μετακυανίνες. Οι σχετικές απορροφήσεις στα 280 και στα 320 nm φαίνονται να είναι πολύ μεγαλύτερες σε σχέση με την απορρόφηση στα 535 nm.

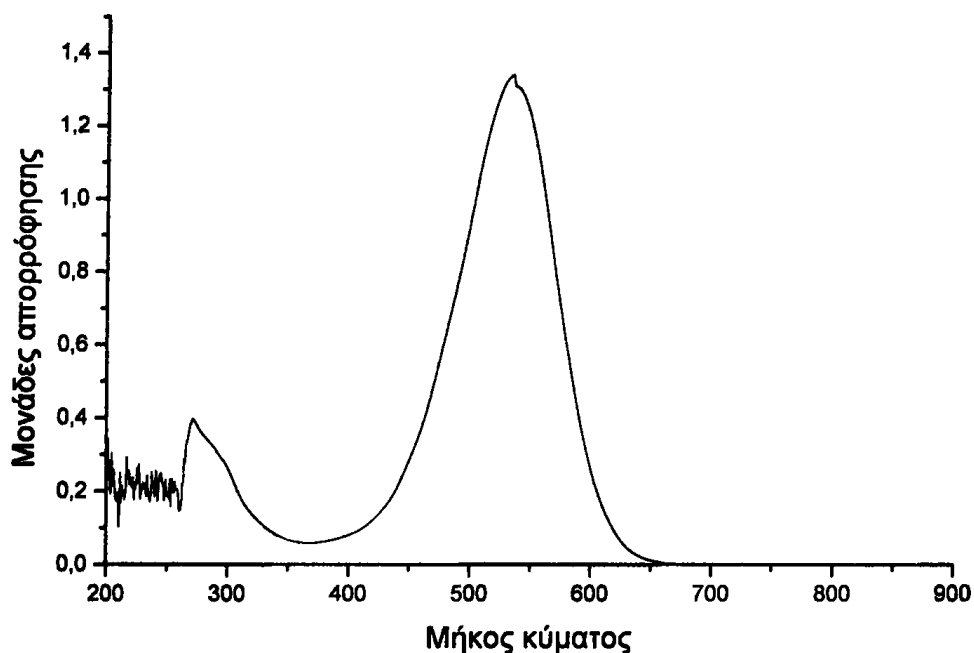
β2. Φάσμα απορρόφησης εκχυλίσματος των μίσχων



Εικόνα 22. Φάσμα απορρόφησης μίσχων των φυτών που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό διάλυμα συγκέντρωσης νιτρικών 86 ppm.

Στην εικόνα 22 παρουσιάζεται το φάσμα απορρόφησης των μίσχων του παντζαριού. Σύμφωνα με την παραπάνω εικόνα παρατηρούμε μια ενεργή φασματική περιοχή από τα 260 nm έως τα 650 nm. Μέσα σε αυτήν την περιοχή διακρίνουμε δύο έντονες απορροφήσεις (κορυφές) στα 280 nm και στα 535 nm. Όπως προαναφέρθηκε σύμφωνα με την βιβλιογραφία η κορυφή στα 280 nm αντιστοιχεί στα ολικά φαινολικά και η κορυφή στα 535 nm στις μπετακυανίνες. Παρατηρούμε πως η κορυφή των ταρταρικών εστέρων που βρισκόταν στα 320 nm στο φάσμα των φύλλων είναι ελλατωμένη και πως η σχετική απορρόφηση στα 535 nm έχει αυξηθεί και έχει ξεπεράσει την απορρόφηση των ολικών φαινολικών στα 280 nm.

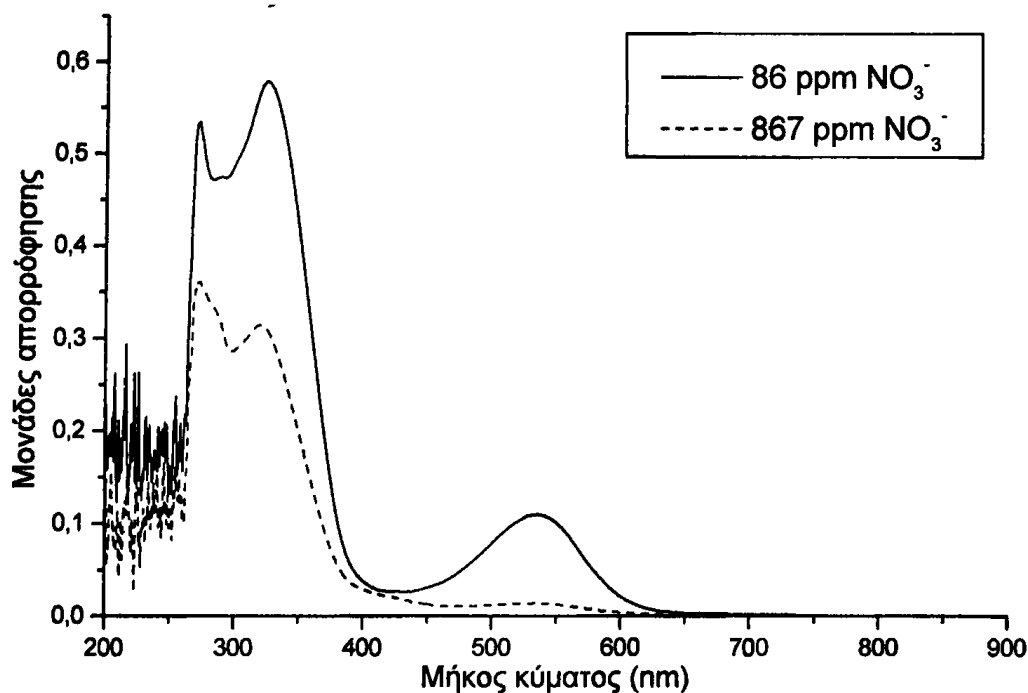
β3. Φάσμα απορρόφησης εκχυλίσματος των ριζωμάτων



Εικόνα 23. Φάσμα απορρόφησης των ριζωμάτων φυτών που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό διάλυμα συγκέντρωσης νιτρικών 86 ppm.

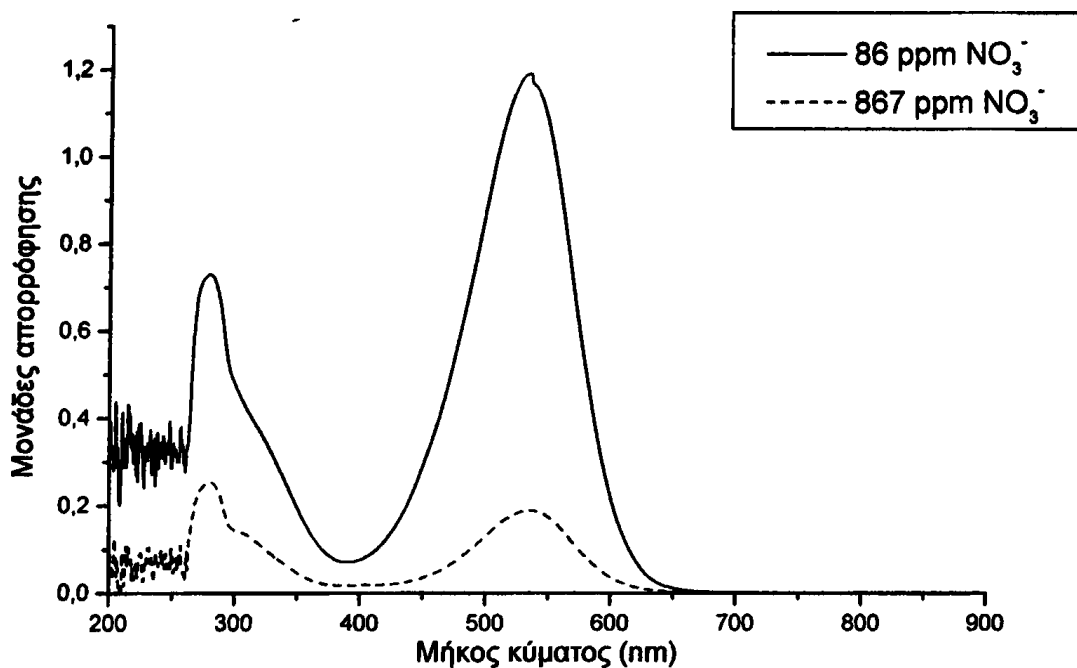
Στην Εικόνα 23 παρουσιάζεται το φάσμα απορρόφησης των ριζωμάτων του παντζαριού. Σύμφωνα με την παραπάνω εικόνα παρατηρούμε μια ενεργή φασματική περιοχή από τα 260 nm έως τα 650 nm. Μέσα σε αυτήν την περιοχή διακρίνουμε δύο έντονες απορροφήσεις (κορυφές) στα 280 nm και στα 535 nm. Παρατηρούμε πως η σχετική απορρόφηση στα 535 nm έχει παραμείνει σχεδόν αμετάβλητη αλλά η απορρόφηση των ολικών φαινολικών στα 280 nm έχει μειωθεί ακόμη περισσότερο.

γ. Επίδραση της συγκέντρωσης των νιτρικών ιόντων του θρεπτικού διαλύματος στα φάσματα απορρόφησης.



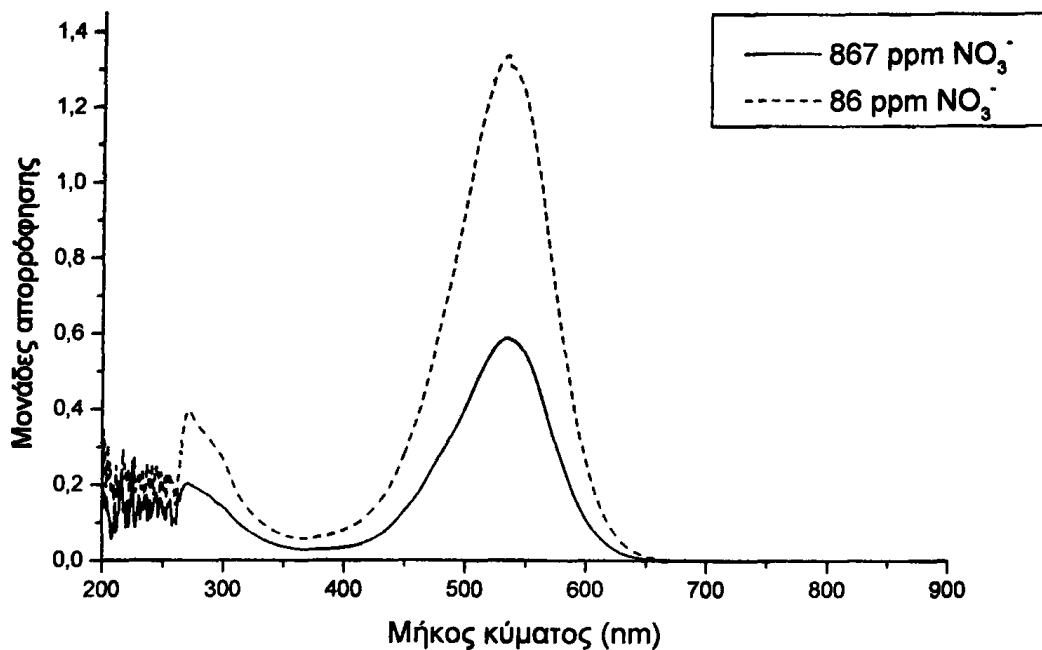
Εικόνα 24. Φάσματα απορρόφησης δειγμάτων φύλλων που προέρχονται από τις μεταχειρίσεις με την υψηλότερη και την χαμηλότερη συγκέντρωση νιτρικών ιόντων στο θρεπτικό διάλυμα.

Στην Εικόνα 24 παρουσιάζονται τα φάσματα απορρόφησης δύο δειγμάτων που προέρχονται από τα ελάσματα των φύλλων. Το πρώτο προέρχεται από την μεταχείριση με την υψηλότερη συγκέντρωση νιτρικών ιόντων στο θρεπτικό διάλυμα (867 ppm) ενώ το δεύτερο από την μεταχείριση με την χαμηλότερη συγκέντρωση νιτρικών ιόντων (86 ppm). Συγκρίνοντας τα δύο φάσματα παρατηρούμε ότι στο δείγμα της μεταχείρισης των 867 ppm NO_3^- οι συγκεντρώσεις όλων των φαινολικών παρουσιάζονται μειωμένες σε σχέση με το δείγμα που προέρχεται από τα 86 ppm. Πιο συγκεκριμένα τα ολικά φαινολικά παρουσιάζονται μειωμένα κατά 39%, οι ταρταρικοί εστέρες κατά 45%, τα φλαβονοειδή κατά 53% και οι μπετακυανίνες κατά 88%.



Εικόνα 25. Φάσματα απορρόφησης δειγμάτων μίσχων που προέρχονται από τις μεταχειρίσεις με την υψηλότερη και την χαμηλότερη συγκέντρωση νιτρικών ιόντων στο θρεπτικό διάλυμα.

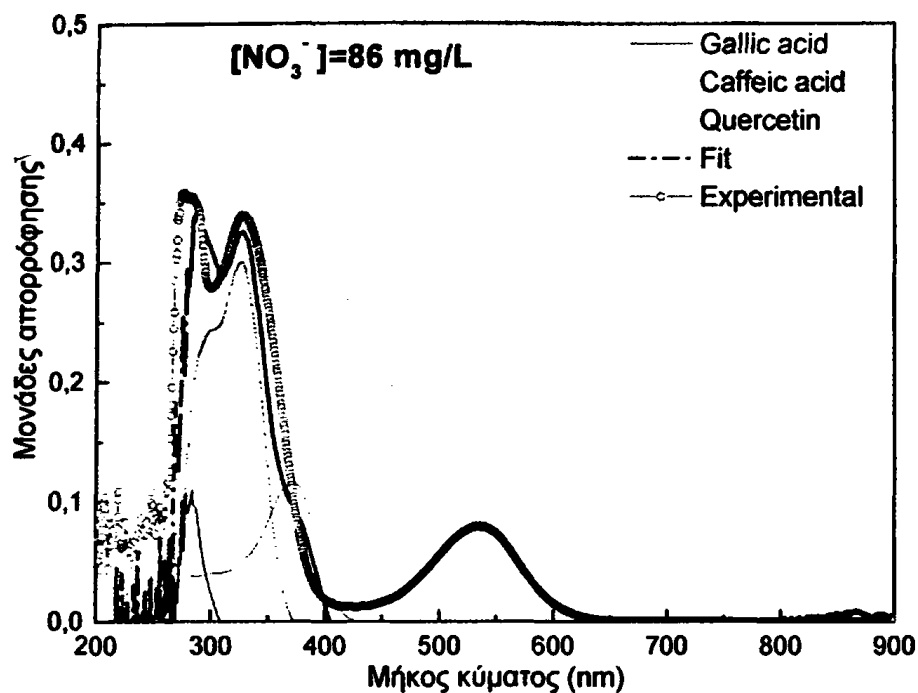
Στην Εικόνα 25 παρουσιάζονται τα φάσματα απορρόφησης δύο δειγμάτων που προέρχονται από τους μίσχους των φύλλων. Και εδώ το πρώτο προέρχεται από την μεταχείριση των 867 ppm ενώ το δεύτερο από την μεταχείριση των 86 ppm. Συγκρίνοντας τα δύο φάσματα παρατηρούμε ότι στο δείγμα της μεταχείρισης των 867 ppm NO₃⁻ οι συγκεντρώσεις όλων των φαινολικών παρουσιάζονται μειωμένες σε σχέση με το δείγμα που προέρχεται από τα 86 ppm. Πιο συγκεκριμένα τα ολικά φαινολικά παρουσιάζονται μειωμένα κατά 65%, οι ταρταρικοί εστέρες κατά 70%, τα φλαβονοειδή κατά 78% και οι μπετακυανίνες κατά 85%.



Εικόνα 26. Φάσματα απορρόφησης δειγμάτων ριζωμάτων που προέρχονται από τις μεταχειρίσεις με την υψηλότερη και την χαμηλότερη συγκέντρωση νιτρικών ιόντων στο θρεπτικό διάλυμα.

Στην Εικόνα 26 παρουσιάζονται τα φάσματα απορρόφησης δύο δειγμάτων που προέρχονται από τα ριζώματα των φυτών. Και εδώ το πρώτο προέρχεται από την μεταχείριση των 867 ppm ενώ το δεύτερο από την μεταχείριση των 86 ppm. Συγκρίνοντας τα δύο φάσματα παρατηρούμε ότι στο δείγμα της μεταχείρισης των 867 ppm NO_3^- οι συγκεντρώσεις όλων των φαινολικών παρουσιάζονται μειωμένες σε σχέση με το δείγμα που προέρχεται από τα 86 ppm. Πιο συγκεκριμένα τα ολικά φαινολικά παρουσιάζονται μειωμένα κατά 47%, οι ταρταρικοί εστέρες κατά 41%, τα φλαβονοειδή κατά 48% και οι μπετακυανίνες κατά 56%.

δ. Ανάλυση φάσματος μέσω απλών μορίων



Εικόνα 27. Ανάλυση του φάσματος των φύλλων μέσω των φασμάτων των απλών μορίων.

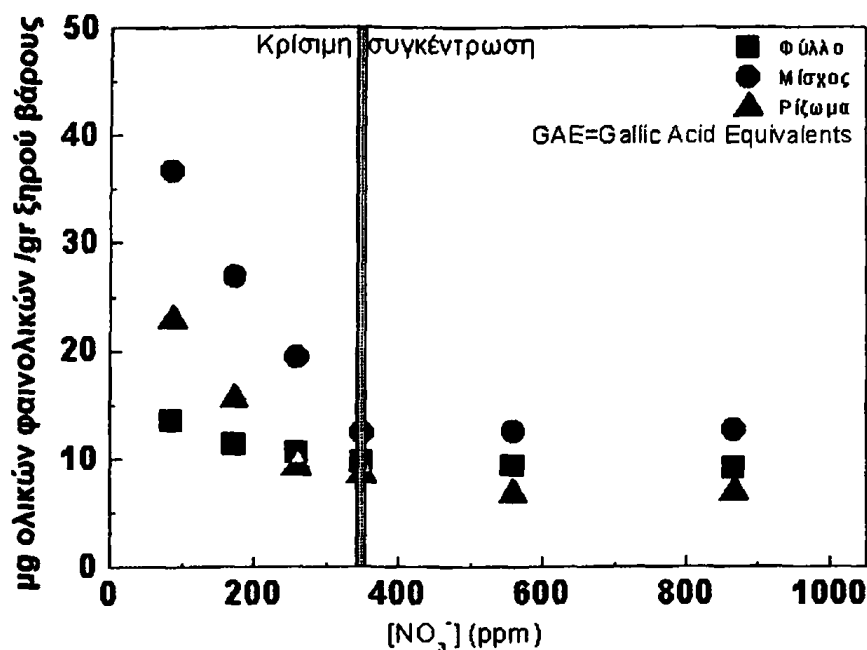
Στην Εικόνα 27 γίνεται ανάλυση του φάσματος του φύλλου μέσω φασμάτων απλών μορίων. Μέσω των πρότυπων καμπυλών των Gallic acid, Caffeic acid και Quercetin το φάσμα του φύλλου αναλύεται ως δείχνει η εικόνα σε ποσοστό 12%, 75% και 13% συμμετοχής αντίστοιχα. Η ανάλυση αυτή την μείωση του Caffeic acid προς το υπόγειο μέρος και συνεπώς και την συγκέντρωση των ταρταρικών εστέρων που εκφράζει.

ε. Επίδραση των NO_3^- στην παραγωγή ολικών φαινολικών

Στην Εικόνα 28 παρατίθεται η επίδραση της μείωσης των χορηγούμενων ποσοτήτων νιτρικών ιόντων μέσω του θρεπτικού διαλύματος στην παραγωγή ολικών φαινολικών. Η ποσότητα των ολικών φαινολών εκφράζεται ως ισοδύναμα μg Gallic acid / gr ξηρού φυτικού ιστού.

Παρατηρούμε ότι από την μεταχείριση των 867 ppm NO_3^- μέχρι και την μεταχείριση των 350 ppm η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών παραμένει σχεδόν αμετάβλητη σε όλα τα μέρη του φυτού. Τα 350 ppm φαίνεται πως είναι η κρίσιμη συγκέντρωση των νιτρικών και πως σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες από αυτή η παραγωγή ολικών

φαινολικών φαίνεται να αυξάνεται απότομα. Η μεγαλύτερη αύξηση παρατηρείται πως συμβαίνει στους μίσχους και στο ρίζωμα, ενώ στα φύλλα αυξάνεται σε μικρότερο βαθμό.



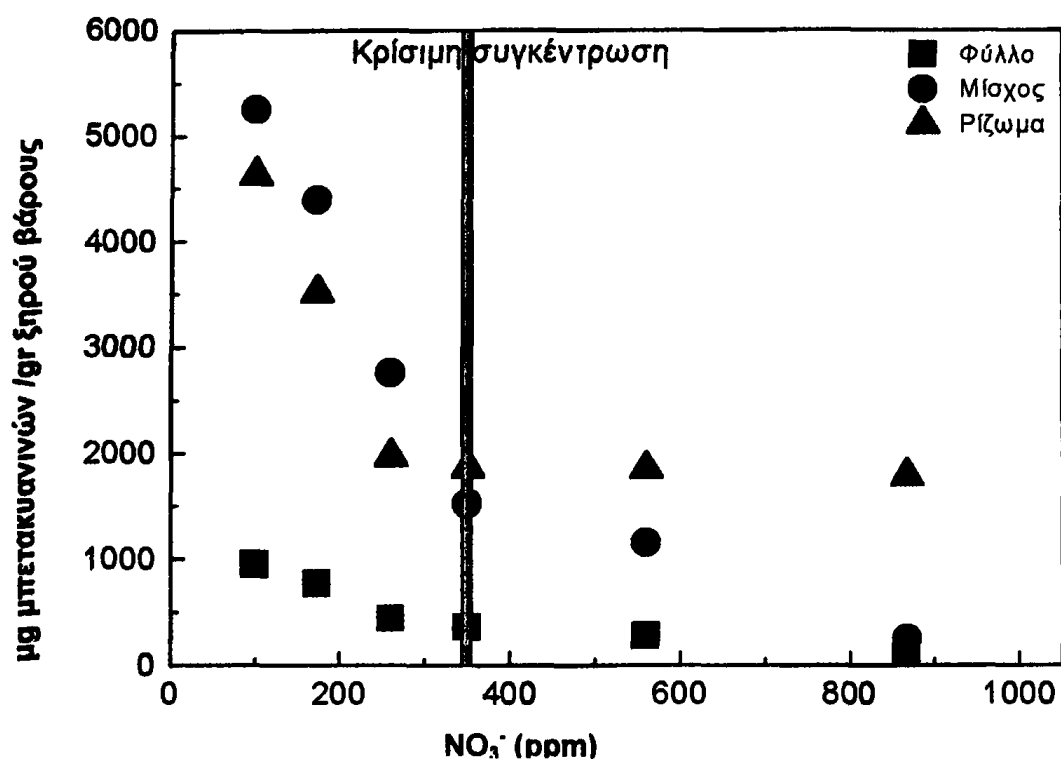
Εικόνα 28. Επίδραση της συγκέντρωσης των νιτρικών ιόντων του θρεπτικού διαλύματος στην παραγωγή ολικών φαινολικών.

στ. Επίδραση των NO₃⁻ στην παραγωγή μετακυανινών

Στην εικόνα 29 παρατίθεται η επίδραση της μείωσης των χορηγούμενων ποσοτήτων νιτρικών ιόντων μέσω του θρεπτικού διαλύματος στην παραγωγή μετακυανινών. Η ποσότητα των μετακυανινών εκφράζεται ως ισοδύναμα μg Betanin / gr ξηρού φυτικού ιστού.

Τα 350 ppm φαίνεται και σε αυτή την περίπτωση πως είναι η κρίσιμη συγκέντρωση των νιτρικών και πως σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες από αυτήν, η παραγωγή των μετακυανινών αυξάνεται απότομα. Η μεγαλύτερη αύξηση παρατηρείται πως συμβαίνει στους μίσχους και στο ρίζωμα, ενώ στα φύλλα αυξάνεται σε μικρότερο βαθμό. Και εδώ όπως και στο προηγούμενο σχήμα (των ολικών φαινολών) παρατηρούμε ότι από την μεταχείριση των 867 ppm NO₃⁻ μέχρι και την μεταχείριση

των 350 ppm η συγκέντρωση των μπετακυανινών παραμένει σχεδόν αμετάβλητη σε όλα τα μέρη του φυτού



Εικόνα 29. Επίδραση της συγκέντρωσης των νιτρικών ιόντων του θρεπτικού διαλύματος στην παραγωγή μπετακυανινών.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από την εφαρμογή μιας διαβάθμισης του χορηγούμενου αζώτου υπό μορφή NO_3^- (από 86 έως 867 ppm) σε υδροπονική καλλιέργεια φυτών παντζαριού στο θερμοκήπιο συμπερασματικά διαπιστώθηκαν τα εξής:

1. σταδιακή μείωση της συγκέντρωσης νιτρικών ιόντων στο θρεπτικού διαλύματος προκάλεσε:

- μείωση του ξηρού βάρους των φυτών τόσο για τον βλαστό όσο και για την ρίζα,
- μείωση την συγκέντρωσης των χλωροφυλλών (Chl a + Chl b) στα φύλλα,
- μείωση των φυσιολογικών παραμέτρων των φύλλων (ταχύτητα φωτοσύνθεσης, ταχύτητα διαπνοής, ταχύτητα διαχύσεως του CO_2).

Η μείωση του ξηρού βάρους, των χλωροφυλλών και των φυσιολογικών παραμέτρων των φύλλων ήταν πολύ έντονη στις χαμηλές συγκεντρώσεις NO_3^- .

2. Μελετήθηκε για πρώτη φορά η κατανομή των ολικών φαινολικών και των μπετακυανινών όχι μόνο στην ρίζα αλλά και στο υπέργειο μέρος των φυτών (μίσχοι, φύλλα) και αποκαλύφθηκε ότι υπάρχει μία κρίσιμη συγκέντρωση χορηγούμενου N-NO_3^- κάτω από την οποία το φυτό οδηγείται σε μείωση του πρωτογενούς και αύξηση του δευτερογενούς μεταβολισμού, προκαλώντας μία έντονη γραμμική αύξηση της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών και των μπετακυανινών, πολύ μεγαλύτερη στους μίσχους και στη ρίζα σε σχέση με τα φύλλα.

Η πολύ μεγάλη αυτή συγκέντρωση των ολικών φαινολικών και μπετακυανινών στην ρίζα και τον μίσχο σε σχέση με τα φύλλα μάλλον οφείλεται στο γεγονός ότι οι ουσίες αυτές είναι οι κύριες ενώσεις που εκκρίνονται από τις ρίζες (root exudation) προκειμένου να αυξήσουν την αφομοιωσιμότητα των θρεπτικών στοιχείων κάτω από συνθήκες θρεπτικού στρες. Στο γεγονός αυτό συνηγορεί και η πολύ μεγάλη συγκέντρωση των ουσιών αυτών (300% υψηλότερη από τα κανονικά επίπεδα) στο υπόστρωμα των φυτών. Το φαινόμενο αυτό χρήζει περαιτέρω έρευνας.

Με δεδομένο ότι η συγκέντρωση ολικών φαινολικών και μπετακυανινών στους φυτικούς ιστούς συνδέεται άμεσα με την αύξηση του αντιοξειδωτικού τους φορτίου η διαθεσιμότητα του αζώτου θα πρέπει μάλλον να ρυθμίζεται κάτω από την κρίσιμη αυτή συγκέντρωση προκειμένου να επιτυγχάνουμε αύξηση των αντιοξειδωτικών ουσιών στα λαχανικά και συνεπώς βελτίωση της διατροφικής τους αξίας.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το άζωτο είναι το πιο σημαντικό από τα ανόργανα θρεπτικά στοιχεία για την αύξηση και την ανάπτυξη των φυτών και υπάρχει μεγάλος όγκος βιβλιογραφίας σχετικά με την επίδραση της αζωτούχου λίπανσης στην παραγωγικότητα των φυτών (Lefsrud M.G. et al. 2005, Dev and Bhardway 1995, Duli Zhao et al. 2003).

Το νιτρικό ανιόν (NO_3^-) είναι η κύρια μορφή αζώτου που απορροφάται ενεργητικά και παθητικά από τα φυτά όταν υπάρχει σε επαρκής ποσότητες (Taiz and Zeiger 1998). Έχει αποδειχθεί ότι η μακρά έλλειψη νιτρικών μειώνει την ανάπτυξη των φυτών και την παραγωγή βιομάζας (Hochmuth et al. 1999), σε φυτά πιπεριάς (Doncheva et al. 2001), μαρουλιού (Broadley et al. 2000, 2001) σπανακιού (Lefsrud M.G. et al. 2007) και καρότου (Huett D.O. 1989). Στο φασόλι βρέθηκε ότι η χαμηλή συγκέντρωση νιτρικών προκαλεί σημαντική μείωση του ξηρού βάρους των βλαστών περίπου 3,5 φορές, χωρίς να επηρεάζεται το βάρος των ριζών (Lima et al. 1999). Συμφωνώντας με τους προαναφερόμενους ερευνητές τα αποτελέσματα των πειραμάτων μας έδειξαν αντίστοιχα μείωση του ξηρού βάρους των φυτών του παντζαριού, τόσο για τον βλαστό όσο και για την ρίζα, η οποία ήταν ιδιαίτερα έντονη στην χαμηλότερη συγκέντρωση των νιτρικών (86 ppm) στο θρεπτικό διάλυμα. Επιπλέον σε αυτή τη συγκέντρωση των νιτρικών είχαμε αντίστοιχα πολύ μεγάλη μείωση της % περιεκτικότητας των ιστών σε νερό.

Η μείωση αυτή της βιομάζας οφείλεται κυρίως στην άμεση ή έμμεση επίδραση του αζώτου στην βιοσύνθεση και την συγκέντρωση των χλωροφυλλών, στην φωτοσύνθεση, την διαπνοή και την στοματική αγωγιμότητα (Duli Zhao et al. 2003, Fritschi and Ray 2007, Lima et al. 1999, Broadley et al. 2001).

Η θετική συσχέτιση μεταξύ του χορηγούμενου αζώτου και της συγκέντρωσης των χλωροφυλλών στα φύλλα έχει διερευνηθεί αρκετά για έναν μεγάλο αριθμό φυτικών ειδών (Fritschi and Ray 2007) και σε ορισμένες περιπτώσεις άμεσα με την χρήση του φορητού χλωροφυλλόμετρου (Mauromicale et al. 2006, Ntamatungiro et al. 1999, Karotis et al. 2003). Από τα αποτελέσματά μας διαπιστώθηκε ότι επίσης υπάρχει παρόμοια θετική συσχέτιση και στην υδροπονική καλλιέργεια του παντζαριού.

Επίσης έχει τεκμηριωθεί από την βιβλιογραφία η σημαντική επίδραση του αζώτου και η συσχέτισή του με την φωτοσυνθετική ταχύτητα για πολλά φυτικά είδη όπως η πιπεριά (Doncheva et al. 2001), το βλήτο (Karotis et al. 2003) κλπ. Οι Broadley et al. το 2000 έδειξαν ότι η διακοπή της αζωτούχου λίπανσης στο μαρούλι επέφερε σημαντική μείωση



όχι μόνο στην ταχύτητα φωτοσύνθεσης αλλά και στην στοματική αγωγιμότητα του CO₂, περιορίζοντας έτσι την ανάπτυξη των φυτών. Δηλαδή η ανάπτυξη μπορεί να περιορίζεται όχι μόνο άμεσα επειδή η έλλειψη αζώτου μειώνει την παραγωγή των χλωροφυλλών και των απαραίτητων φωτοσυνθετικών ενζύμων αλλά και έμμεσα μειώνοντας την μερική πίεση του διοξειδίου του άνθρακα στις θέσεις καρβοξυλίωσης (Broadley et al. 2001). Οι διαπιστώσεις αυτές προέκυψαν και από τα δικά μας πειράματα, όπου παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση και μείωση της φωτοσύνθεσης, της στοματικής αγωγιμότητας αλλά και της διαπνοής, όσο μειωνόταν η συγκέντρωση των νιτρικών στον θρεπτικό μας διάλυμα. Φαίνεται ότι τα νιτρικά ιόντα σαν οσμορυθμιστές μέσα στα χυμοτόπια (Cardenas-Navarro et al. 1999), ή ως μόρια ενεργοποιητές, πιθανώς μέσω της ενεργοποίησης του ABA (Chapin 1988) ή μέσω της ενεργοποίησης αντλιών πάνω στις κυτταρικές μεμβράνες των καταφρακτικών κυττάρων, ελέγχουν το κλείσιμο των στομάτων. Ας σημειωθεί εδώ ότι η συγκέντρωση των χλωροφυλλών, η ταχύτητα φωτοσύνθεσης, η στοματική αγωγιμότητα του CO₂ και η ταχύτητα της διαπνοής στα φύλλα του παντζαριού δείχνουν μια εκθετική αύξηση στις χαμηλές συγκεντρώσεις νιτρικών (86 έως 350 ppm), ενώ η αύξηση αυτή γίνεται μικρή ή οριακή στις συγκεντρώσεις των 560 και 867 ppm.

Η βιοσύνθεση και η συσσώρευση των φαινολικών ουσιών είναι μια συνήθης αντίδραση των φυτών και στο αβιοτικό stress (Dixon και Paiva 1995) και είναι γνωστό ειδικότερα ότι η έλλειψη αζώτου προκαλεί μείωση του πρωτογενούς μεταβολισμού (φωτοσύνθεση και ανάπτυξη) και αύξηση του δευτερογενούς μεταβολισμού και των μεταβολικών προϊόντων (φαινολικές ουσίες κλπ.) που παράγονται από την βιοσυνθετική οδό του phenylpropanoid (Dakora and Phillips 1996, Mercure et al. 2004).

Πρόσφατες έρευνες αποκάλυψαν ότι η έλλειψη αζώτου, αλλάζοντας τα επίπεδα έκφρασης 629 γονιδίων στην Αραβίδωση, μειώνει την ενεργοποίηση των υπεύθυνων γονιδίων για την βιοσύνθεση των χλωροφυλλών και των φωτοσυνθετικών ενζύμων στα φύλλα και ταυτόχρονα αυξάνει την ενεργοποίηση αντίστοιχων υπεύθυνων γονιδίων για την βιοσύνθεση ενζύμων που προκαλούν αύξηση του δευτερογενούς μεταβολισμού και βιοσύνθεση φαινολικών ουσιών (Scheible et al. 2004, Peng et al. 2007).

Δεν υπάρχουν πολλές βιβλιογραφικές αναφορές συσχέτισης των επιπέδων αζωτούχου λίπανσης και συγκέντρωσης των φαινολικών στα φυτά. Σε χαμηλά επίπεδα αζώτου παρατηρήθηκε αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου κλειδιού στον δευτερογενή μεταβολισμό (αμμωνία-λυσή της φαινυλαλανίνης-PAL) στην τομάτα και στα φασόλια (Bongue-Bartelsman and Phillips 1995, Sanchez et al. 2000). Τελευταίες έρευνες με



φυτά *Marticaria Chamomilla* που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες έλλειψης αζώτου, έδειξαν αύξηση της δραστηριότητας του βασικού ενζύμου κλειδιού του δευτερογενούς μεταβολισμού phenylalanine ammonia-lyase (PAL), σημαντική αύξηση στα επίπεδα των περισσοτέρων φαινολικών ουσιών που μετρήθηκαν και αύξηση του αντιοξειδωτικού φορτίου (Kovacic et al. 2007, Kovacic and Backor 2007).

Η συγκέντρωση των φαινολικών ουσιών και των μπετακυανινών στην ρίζα του παντζαριού έχει προσδιορισθεί από προηγούμενους ερευνητές (Kujala et al. 2000, Kujala et al. 2001). Στα πειράματά μας όμως μελετήθηκε για πρώτη φορά η κατανομή των φαινολικών ουσιών και των μπετακυανινών όχι μόνο στην ρίζα του παντζαριού αλλά και στο υπέργειο μέρος (φύλλα, μίσχοι), σε μία διαβάθμιση επιπέδων αζωτούχου λίπανσης ($N-NO_3^-$) και επιβεβαιώνοντας προηγούμενη θεωρία αποδείχθηκε η αύξηση των φαινολικών και μπετακυανινών δηλαδή η ενεργοποίηση του δευτερογενούς μεταβολισμού κάτω από συνθήκες έλλειψης αζώτου.

Για πρώτη φορά εισάγεται ο όρος κρίσιμη συγκέντρωση νιτρικών, κάτω από την οποία οδηγείται το φυτό σε μείωση του πρωτογενούς μεταβολισμού και αύξηση του δευτερογενούς αντίστοιχα, προκαλώντας την αύξηση των επιπέδων των φαινολικών ουσιών και των μπεταλαϊνών και συνεπώς και την αύξηση του αντιοξειδωτικού φορτίου (Vinson et al. 1998, Ninfali et al. 2007).

Από την συγκέντρωση των 867 ppm μέχρι την κρίσιμη συγκέντρωση των 350 ppm νιτρικού αζώτου η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών και των μπετακυανινών ήταν σταθερή για αυτές τις μεταχειρήσεις. Κάτω από την κρίσιμη συγκέντρωση 350 ppm νιτρικού αζώτου διαπιστώθηκε μια απότομη γραμμική αύξηση της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών και των μπετακυανινών (πολύ μεγαλύτερη στους μίσχους και στο ρίζωμα σε σχέση με τα φύλλα). Η συσσώρευση φαινολικών και μπετακυανινών όπως έχει ήδη αναφερθεί συνδέεται άμεσα με την αύξηση του αντιοξειδωτικού φορτίου (Ninfali et al. 2007).

Η ικανότητα απορρόφησης-δέσμευσης ελευθέρων ριζών οξυγόνου (oxygen radical absorbance capacity – ORAC) είναι μια παράμετρος που δείχνει την αποτελεσματικότητα των αντιοξειδωτικών ουσιών που περιέχονται στα λαχανικά. Οτιδήποτε μεταβάλει ή τροποποιεί την συγκέντρωση των φαινολικών και των μπεταλαϊνών στα λαχανικά μπορεί να μεταβάλλει και την ORAC (Ninfali and Baccocoico 2003, Sgherri et al. 2003).

Χωρίς αυτό να προκαλεί σοβαρά προβλήματα στην παραγωγικότητα των φυτών, η διαθεσιμότητα του αζώτου θα πρέπει να ρυθμίζεται μάλλον κάτω από την κρίσιμη

συγκέντρωση που προσδιορίσαμε προκειμένου να αυξάνει η συγκέντρωση των φαινολικών-αντιοξειδωτικών ουσιών στα λαχανικά και συνεπώς να βελτιώνεται η διατροφική τους αξία.

Το ερώτημα που προκύπτει είναι γιατί τα φαινολικά και οι μπετακυανίνες σε συνθήκες έντονης έλλειψης αζώτου αυξάνονται πολύ περισσότερο στην ρίζα και στον μίσχο σε σχέση με το φύλλο, γεγονός που δείχνει μεγαλύτερη αύξηση του δευτερογενή μεταβολισμού.

Δεν υπάρχουν άμεσες βιβλιογραφικές αναφορές, όμως είναι γνωστό ότι τα φαινολικά είναι οι κύριες ενώσεις που εκκρίνονται από τις ρίζες και αυξάνουν την διαλυτότητα και την αφομοιωσιμότητα των θρεπτικών στοιχείων (Dakora and Phillips 2002, Rengel 2002). Σε φυτά φασολιού μετά από 18 ημέρες έλλειψης αζωτούχου λίπανσης παρατηρήθηκε έντονη έκκριση μεγάλων ποσοτήτων φαινολικών (Juszczuk et al. 2004). Το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε και στο δικό μας πείραμα. Από δεδομένα τα οποία δεν παρουσιάζονται στην παρούσα εργασία φαίνεται ότι η συγκέντρωση των δεσμευμένων φαινολικών πάνω στο υπόστρωμα του περλίτη, στην χαμηλότερη συγκέντρωση νιτρικών (86 ppm) ήταν περίπου 300% αυξημένη σε σχέση με την υψηλότερη. Επιπλέον έχει αποδειχθεί ότι η υπερέκκριση φαινολικών από τις ρίζες σε συνθήκες έντονης τροφοπενίας επιταχύνει την προσρόφηση και αφομοιωσιμότητα των θρεπτικών στοιχείων από την ριζόσφαιρα, είτε άμεσα, είτε έμμεσα μέσω της διέγερσης της μικροβιακής ανάπτυξης και λειτουργίας (Dakora and Phillips 2002), και πιθανώς σε αυτό να οφείλεται η πολύ μεγαλύτερη συγκέντρωση ολικών φαινολικών και μπετακυανινών που μετρήσαμε στις ρίζες και στους μίσχους σε σχέση με τα φύλλα των φυτών.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Bongue-Bartelsman, M., Phillips, D.A., 1995.** Nitrogen stress regulates gene expression of enzymes in the flavonoid biosynthetic pathway of tomato. *Plant Physiology and Biochemistry* 33 (5), pp. 539-546.
- Broadley, M.R., Escobar-Gutierrez, A.J., Burns, A., Burns, I.G., 2000.** What are the effects of nitrogen deficiency on growth components of lettuce? *New Phytologist* 147 (3), pp. 519-526
- Broadley, M.R., Escobar-Gutiérrez, A.J., Burns, A., Burns, I.G., 2001.** Nitrogen-limited growth of lettuce is associated with lower stomatal conductance. *New Phytologist* 152 (1), pp. 97-106.
- Cárdenas-Navarro, R., Adamowicz, S., Robin, P., 1999.** Nitrate accumulation in plants: A role for water. *Journal of Experimental Botany* 50 (334), pp. 613-624.
- Chapin III, F.S., Walter, C.H.S., Clarkson, D.T., 1988.** Growth response of barley and tomato to nitrogen stress and its control by abscisic acid, water relations and photosynthesis. *Planta* 173 (3), pp. 352-366.
- Dakora, F.D., Phillips, D.A., 1996.** Diverse functions of isoflavonoids in legumes transcend anti-microbial definitions of phytoalexins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 49 (1), pp. 1-20.
- Dakora, F.D., Phillips, D.A., 2002.** Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant and Soil* 245 (1), pp. 35-47.
- Dev, S.P. and Bhardway, K.K.R., 1995.** Effect of crop wastes and nitrogen levels of biomass production and nitrogen uptake in wheat-maize sequence. *Ann. Agric. Res.* 16, 264-267.
- Dixon, R.A., Paiva, N.L., 1995.** Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7 (7), pp. 1085-1097.

Doncheva, S., Vassileva, V., Ignatov, G., Pandev, S., Dris, R., Niskanen, R., 2001, Influence of nitrogen deficiency on photosynthesis and chloroplast ultrastructure of pepper plants. *Agricultural and Food Science in Finland* 10 (1), pp. 59-64.

Duli Zhao, K. Raja Reddy¹, V.G. Kakani, J.J. Read & G.A. Carter, 2003. Corn (*Zea mays* L.) growth, leaf pigment concentration, photosynthesis and leaf hyperspectral reflectance properties as affected by nitrogen supply. *Plant and Soil* 257, pp. 205-217.

Fritschi, F.B., Ray, J.D., 2007, Soybean leaf nitrogen, chlorophyll content, and chlorophyll a/b ratio. *Photosynthetica* 45 (1), 92-98

Girod, P.-A., Zryd, J.-P., 1987. Clonal variability and light induction of betalain synthesis in red beet cell cultures. *Plant Cell Reports* 6 (1), pp. 27-30.

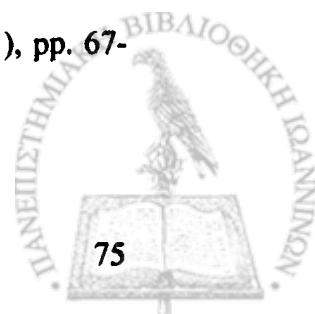
Juszczuk, I.M., Wiktorowska, A., Malusá, E., Rychter, A.M., 2004. Changes in the concentration of phenolic compounds and exudation induced by phosphate deficiency in bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant and Soil* 267 (1-2), pp. 41-49.

Hochmuth, G.J., Brecht, J.K., Bassett, M.J., 1999. Nitrogen fertilization to maximize carrot yield and quality on a sandy soil. *HortScience* 34 (4), pp. 641-645.

Huett, D.O., 1989. Effect of nitrogen on the yield and quality of vegetables. *Acta Horticulturae* 247, pp. 205-209.

Kapotis, G., Zervoudakis, G., Veltsistas, T., Salahas, G., 2003. Comparison of Chlorophyll Meter Readings with Leaf Chlorophyll Concentration in *Amaranthus vlitus*: Correlation with Physiological Processes. *Russian Journal of Plant Physiology* 50 (3), pp. 395-397.

Kishima, Y., Shimaya, A., Adachi, T., 1995. Evidence that blue light induces betalain pigmentation in *Portulaca* callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 43 (1), pp. 67-70.



Kováčik, J., Bačkor, M., 2007. Changes of phenolic metabolism and oxidative status in nitrogen-deficient *Matricaria chamomilla* plants. *Plant and Soil* 297 (1-2), pp. 255-265.

Kováčik, J., Kron, I., Repčák, M., Bačkor, M., 2007. Effect of feeding precursors on phenylalanine ammonia-lyase activity and coumarin accumulation in leaves of *Matricaria chamomilla* L. *Plant Growth Regulation* 52 (1), pp. 9-15.

Kujala, T., Loponen, J., Pihlaja, K., 2001. Betalains and Phenolics in Red Beetroot (*Beta vulgaris*) Peel Extracts: Extraction and Characterisation. *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences* 56 (5-6), pp. 343-348.

Kujala, T.S., Loponen, J.M., Klika, K.D., Pihlaja, K., 2000. Phenolics and betacyanins in red beetroot (*Beta vulgaris*) root: Distribution and effect of cold storage on the content of total phenolics and three individual compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (11), pp. 5338-5342.

Leathers, R. R., Davin, C. and Zryd, J. P., 1992. Betalain producing cell cultures of *Beta vulgaris* L. var. bikores monogerm (red beet). *In Vitro Cellular & Developmental Biology- Plant*, 28P, pp. 39-45.

Lefsrud, M.G., Kopsell, D.A., Kopsell, D.E., 2007. Nitrogen levels influence biomass, elemental accumulations, and pigment concentrations in spinach. *Journal of Plant Nutrition* 30 (2), pp. 171-185.

Lima, J.D., Mosquim, P.R., Da Matta, F.M., 1999. Leaf gas exchange and chlorophyll fluorescence parameters in *Phaseolus vulgaris* as affected by nitrogen and phosphorus deficiency. *Photosynthetica* 37 (1), pp. 113-121.

Mabry, T.J., 2001. Selected topics from forty years of natural products research: Betalains to flavonoids, antiviral proteins, and neurotoxic nonprotein amino acids. *J. Nat. Prod.*, 64, pp. 1596-1604.



Mauromicale, G., Ierna, A., Marchese, M., 2006. Chlorophyll fluorescence and chlorophyll content in field-grown potato as affected by nitrogen supply, genotype, and plant age. *Photosynthetica* 44 (1), pp. 76-82

Mercure, S. A., Daoust, B., Samson, G., 2004. Causal relationship between growth inhibition, accumulation of phenolic metabolites, and changes of UV-induced fluorescences in nitrogen-deficient barley plants. *Canadian Journal of Botany* 82 (6), pp. 815-821.

Ninfali, P., Bacchiocca, M., 2003. Polyphenols and antioxidant capacity of vegetables under fresh and frozen conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (8), pp. 2222-2226.

Ninfali, P., Bacchiocca, M., Antonelli, A., Biagiotti, E., Di Gioacchino, A.M., Piccoli, G., Stocchi, V., Brandi, G., 2007. Characterization and biological activity of the main flavonoids from Swiss Chard (*Beta vulgaris* subspecies *cycla*). *Phytomedicine* 14 (2-3), pp. 216-221.

Ntamatungiro, S., Norman, R.J., McNew, R.W., Wells, B.R., 1999. Comparison of plant measurements for estimating nitrogen accumulation and grain yield by flooded rice. *Agronomy Journal* 91 (4), pp. 676-685.

Peng, M., Bi, Y.-M., Zhu, T., Rothstein, S.J., 2007. Genome-wide analysis of Arabidopsis responsive transcriptome to nitrogen limitation and its regulation by the ubiquitin ligase gene NLA. *Plant Molecular Biology* 65 (6), pp. 775-797.

Rengel, Z., 2002. Genetic control of root exudation. *Plant and Soil* 245 (1), pp. 59-70.

Sánchez, E., Soto, J.M., García, P.C., López-Lefebvre, L.R., Rivero, R.M., Ruiz, J.M., Romero, L., 2000. Phenolic and oxidative metabolism as bioindicators of nitrogen deficiency in French bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. cv. strike). *Plant Biology* 2 (3), pp. 272-277.



Scheible, W. R., Morcuende, R., Czechowski, T., Fritz, C., Osuna, D., Palacios-Rojas, N., Schindelasch, D., Stitt, M., 2004. Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of arabidopsis in response to nitrogen. *Plant Physiology* 136 (1), pp. 2483-2499.

Schliemann, W., Kobayashi, N., Strack, D., 1999. The decisive step in betaxanthin biosynthesis is a spontaneous reaction. *Plant Physiology* 119 (4), pp. 1217-1232.

Schliemann, W., Joy IV, R.W., Komamine, A., Metzger, J.W., Nimtz, M., Wray, V., Strack, D., 1996. Betacyanins from plants and cell cultures of *Phytolacca americana*. *Phytochemistry* 42 (4), pp. 1039-1046.

Sgherri, C., Cosi, E., Navari-Izzo, F., 2003. Phenols and antioxidative status of *Raphanus sativus* grown in copper excess. *Physiologia Plantarum* 118 (1), pp. 21-28.

Shin, K. S., Murthy, H. N., Ko, J. Y. and Paek, K. Y., 2002. Growth and betacyanin production by hairy roots of *Beta vulgaris* in airlift bioreactors. *Biotechnology Letters*, 24, pp. 2067-2069.

Stintzing, F. C., Schieber, A. and Carle, R., 2002. Identification of betalains from yellow beet (*Beta vulgaris* L.) and cactus pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.] by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, pp. 2302-2307.

Strack D, Vogt T., Schliemann W., 2003. Recent advances in betalain research. *Phytochemistry* 62 (3), pp. 247-269.

Taiz, L., and E. Zeiger, 1998. Plant Physiology, 2nd edition, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA.

Vinson, J.A., 1998. Flavonoids in foods as in vitro and in vivo antioxidants. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 439, pp. 151-164.



Wohlpert A. and T. J. Mabry. 1968. On the Light Requirement for Betalain Biogenesis. *Plant Physiol.* 43., pp. 457-459.

Zakharova, N. S. and Petrova, T. A., 2000. β -glucosidases from leaves and roots of the common beet, *Beta vulgaris*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 36, pp. 394-397.

Mazza, G., Fukumoto, L., Delaquis, P., Girard, B., Ewert, B., 1999. Anthocyanins, phenolics, and color of Cabernet Franc, Merlot, and Pinot Noir wines from British Columbia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47 (10), pp. 4009-4017