

Ανώτατο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Ηρακλείου

ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Θέμα : Συγκέντρωση νιτρικών ιόντων σε φρούτα και λαχανικά συμβατικής και βιολογικής καλλιέργειας με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας.



ΕΙΣΗΓΗΤΗΣ : Δρ.Πασπάτης Ευάγγελος
ΣΠΟΥΔΑΣΤΗΣ : Βλάχος Κωνσταντίνος

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2005

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υπεύθυνο καθηγητή της πτυχιακής εργασίας, κ. Δρ.Ε.Α.Πασπάτη, προϊστάμενο του Εργαστηρίου Ολοκληρωμένης Αντιμετώπισης και Φυτορρυθμιστικών ουσιών του Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου καθώς και την Δρ.Ε.Αναγνωστοπούλου, για την τεράστια βοήθεια και κατανόηση κατά την διάρκεια του πειράματος, της συγγραφής και γενικά της επιμέλειας της πτυχιακής εργασίας.

Επίσης ευχαριστώ πολύ τη Διεύθυνση του Μ.Φ.Ι. για την προθυμία να δεχθεί να κάνω την πρακτική μου άσκηση και την εκπόνηση της πτυχιακής μελέτης μου στο Μ.Φ.Ι καθώς και τους Καζά Δημήτριο, Ζωγράφου Χριστίνα που με βοήθησαν με τον τρόπο τους στο να ολοκληρωθεί αυτή με το καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα.

*Με εκτίμηση
Βλάχος Κωνσταντίνος*

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

❖ Μεταβολισμός του αζώτου στα φυτά	σελ...4
❖ Συσσώρευση νιτρικών ιόντων στα φυτά	σελ...11
❖ Νιτρικά – Νιτρώδη - Νιτροζαμίνες	σελ...17
❖ Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)	σελ...20
❖ Πειραματικό μέρος	σελ...26
❖ Υλικά και μέθοδοι	σελ...27
❖ Αποτελέσματα - Συζήτηση	σελ...29
❖ Συμπεράσματα	σελ...30
❖ Βιβλιογραφία	σελ...37
❖ Παράρτημα	σελ...39



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

1. ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΑΖΩΤΟΥ ΣΤΑ ΦΥΤΑ

1.1. Ανόργανη διατροφή των φυτών

Τα ανώτερα φυτά είναι αυτότροφοι οργανισμοί, οι οποίοι προσλαμβάνουν από το άμεσο περιβάλλον τους τα ανόργανα συστατικά που χρειάζονται ώστε να συνθέσουν τις απαραίτητες γι' αυτά ενώσεις (Taiz & Zeiger, 1991, Δροσόπουλος, 1992). Τα απαραίτητα για τη ζωή των φυτών ανόργανα θρεπτικά στοιχεία, απαντούν στα διάφορα όργανά τους σε συγκεντρώσεις οι οποίες διαφέρουν πολύ μεταξύ τους.

Τα ανόργανα θρεπτικά στοιχεία που προσλαμβάνουν τα φυτά και χαρακτηρίζονται ως απαραίτητα είναι: Τα **μακροστοιχεία**: άνθρακας (C), υδρογόνο (H), οξυγόνο (O), άζωτο (N), φώσφορος (P), κάλιο (K), ασβέστιο (Ca), μαγνήσιο (Mg) και θείο (S) και τα **ιχνοστοιχεία**, σίδηρος (Fe), μαγγάνιο (Mn), ψευδάργυρος (Zn), χαλκός (Cu), μολυβδαίνιο (Mo), βόριο (B) και χλώριο (Cl).

Τα μακροστοιχεία βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στους φυτικούς ιστούς όπως επίσης είναι απαραίτητα σε μεγάλες σχετικά συγκεντρώσεις στο έδαφος, αντίθετα με τα ιχνοστοιχεία τα οποία είναι αναγκαία και απαραίτητα για την καλή ανάπτυξη των φυτών σε αισθητά χαμηλότερες συγκεντρώσεις, της τάξεως των μερικών ppm. (Δροσόπουλος, 1992). Πολύ μεγάλες ποσότητες των μακροστοιχείων -οι οποίες όμως δεν συνηθίζονται στη φύση-, μπορεί να αποβούν τοξικά για τα φυτά. Σε ότι αφορά τα ιχνοστοιχεία, έλλειψή τους από το έδαφος οδηγεί στην μη κανονική ανάπτυξη των φυτών και στην εμφάνιση χαρακτηριστικών συμπτωμάτων και μορφολογικών αλλοιώσεων. Αντιθέτως, όταν τα ιχνοστοιχεία βρίσκονται σε υψηλότερες απ' τις αναγκαίες ποσότητες, προκαλούν τοξικές δράσεις και δηλητηριάσεις των φυτών. Για να χαρακτηριστεί ένα στοιχείο ως απαραίτητο, θα πρέπει να πληρεί τα παρακάτω κριτήρια:

- α) Η έλλειψή του να καθιστά αδύνατη τη συνέχιση του βιολογικού κύκλου του φυτού.
- β) Η επενέργεια του θρεπτικού αυτού στοιχείου να είναι ειδική και να μην μπορεί να αντικατασταθεί από άλλο θρεπτικό στοιχείο.
- γ) Η επενέργεια του θρεπτικού στοιχείου να είναι άμεση και όχι έμμεση. (Νιαβής, 1981)

Θα πρέπει να τονιστεί εδώ, ότι ορισμένα στοιχεία εκπληρούν τα ως άνω κριτήρια για ορισμένα μόνο είδη φυτών και ως εκ τούτου θεωρούνται απαραίτητα μόνο για αυτά. Στα στοιχεία αυτά περιλαμβάνονται τα : Νάτριο (Na), κοβάλτιο (Co), βαννάδιο (V), πυρίτιο (Si), σελήνιο (Se), γάλλιο (Ga), αργίλιο (Al) και ιώδιο (I). (Δροσόπουλος, 1992)

1.2. Λίπανση των φυτών

Η ποιότητα σε πολλά λαχανικά εξαρτάται από διάφορα χαρακτηριστικά, όπως από την τρυφερότητα των βλαστών και των φύλλων τους, το μέγεθος των εδώδιμων μερών τους κ.λ.π. που προϋποθέτουν καλλιέργειά τους σε εδάφη με ικανοποιητική υγρασία και περιεκτικότητα σε διαθέσιμα θρεπτικά στοιχεία.

Στα γεωργικά οικοσυστήματα επειδή τα προϊόντα μιας καλλιέργειας απομακρύνονται από το χώρο όπου υπάρχει η καλλιέργεια, είναι φανερό ότι μαζί απομακρύνονται και τα ανόργανα θρεπτικά στοιχεία, τα οποία παρέλαβαν τα φυτά από το έδαφος.

Έτσι, είναι απαραίτητη η συνεχής ανανέωση και ο εμπλουτισμός του εδάφους με τα στοιχεία αυτά, ώστε να είναι δυνατή η διατήρηση αλλά και βελτίωση της γονιμότητας του εδάφους. Η ένταση της λίπανσης εξαρτάται από τη στάθμη των υπαρχόντων θρεπτικών στοιχείων στο έδαφος, καθώς επίσης και από τις απαιτήσεις των φυτών και τις αναμενόμενες αποδόσεις.

Η σύγχρονη γεωργία απαιτεί πολύ υψηλές αποδόσεις και αυτό βασίζεται μεταξύ άλλων στη διασφάλιση άριστης διατροφής των φυτών μέσω της εντατικής λίπανσης.

Η λίπανση των φυτών γίνεται: 1) Με προσθήκη οργανικής ουσίας φυτικής ή ζωϊκής προέλευσης 2) με προσθήκη φωσφορικών αλάτων, καλιούχων λιπασμάτων K_2SO_4 ή KCl καθώς και αζωτούχων λιπασμάτων υπό μορφή νιτρικών αλάτων όπως $Ca(NO_3)_2$, $NaNO_3$, KNO_3 ή αμμωνιακών αλάτων όπως $(NH_4)_2SO_4$. (Νιαβής, 1981)

1.3. Σημασία του αζώτου για τα φυτά-Δέσμευση του αζώτου στη φύση

Το άζωτο συμμετέχει ως συστατικό σε ένα μεγάλο αριθμό βιομορίων μεγάλης σπουδαιότητας για τη διατήρηση της ζωής στον πλανήτη, όπως αμινοξέα, πρωτεΐνες, νουκλεοξέα, νουκλεοτίδια, συνένζυμα. (Δροσόπουλος 1992, Διαμαντίδης 1990). Επίσης,

αποτελεί το βασικό συστατικό όλων των θεμελιωδών συστατικών του πρωτοπλάστη και λαμβάνει ενεργό μέρος στο σχηματισμό του πρωτοπλάσματος και είναι το στοιχείο στο οποίο τα φυτά αντιδρούν άμεσα.

Το άζωτο βοηθά στην κανονική ανάπτυξη των φυτών, ιδιαίτερα των φυλλωδών λαχανικών και συντελεί στο σχηματισμό μεγάλων και τρυφερών πράσινων φύλων. Η παρουσία επαρκούς συγκέντρωσης ανοργάνου αζώτου, διασφαλίζει την επιθυμητή ανάπτυξη των φυτών, ιδιαίτερα κατά τα στάδια της βλαστικής ανάπτυξης. Επίσης είναι αναγκαίο για την ανάπτυξη των καρπών.

Η έλλειψη ή ανεπάρκεια του ανοργάνου αζώτου σ' όλα τα στάδια της ζωής των φυτών, έχει δυσμενείς επιπτώσεις στην ανάπτυξη και την απόδοση τους. Σε ακραίες περιπτώσεις μεγάλης έλλειψης ανοργάνου αζώτου, προκαλείται γενική καχεξία και αποπρασινισμός των φυτών, ο οποίος αρχικά εμφανίζεται στα μεγαλύτερης ηλικίας φύλλα και προοδευτικά επεκτείνεται προς τα νεώτερα.

Όμως και περίσσεια αζώτου, ιδιαίτερα του αμμωνιακού κατά τις φάσεις της καρποφορίας, της ωρίμανσης των σπερμάτων, των καρπών ή αποθησαυριστικών οργάνων (υπόγειων ριζών ή βλαστών κλπ. όπως τεύτλα, γεώμηλα κ.ά.) δημιουργεί ανεπιθύμητες καταστάσεις για την παραγωγή και την αντοχή των φυτών. Έτσι, υπό συνθήκες υψηλής αζωτούχου λίπανσης, προκαλείται υπερβολική ανάπτυξη ανώριμων, υδαρών και ευπαθών ιστών, δηλαδή ανεπιθύμητη βλαστική ανάπτυξη.

Επίσης, δεν δημιουργούνται ή δεν εξαντλούνται τα αποθέματα των φυτών σε υδατάνθρακες. (Νιαβής, 1981)

Αποτέλεσμα όλων αυτών είναι η ποσοτική και ποιοτική υποβάθμιση της παραγωγής.

Μολονότι, η ατμόσφαιρα είναι πλούσια σε μοριακό άζωτο (79%), εντούτοις δεν μπορεί αυτό να χρησιμοποιηθεί άμεσα, με τη μορφή αυτή από την πλειοψηφία των οργανισμών.

Αυτό συμβαίνει, γιατί στο μοριακό άζωτο (N_2), τα δύο άτομα αζώτου ενώνονται με τριπλό ομοιοπολικό δεσμό, ο οποίος παρουσιάζει εξαιρετική σταθερότητα και δημιουργεί ένα αδρανές μόριο. Η διάσπαση του δεσμού αυτού, απαιτεί υψηλές θερμοκρασίες και πιέσεις, οι οποίες δεν απαντώνται in vivo. (Δροσόπουλος, 1992)

Οι περισσότεροι οργανισμοί, προμηθεύονται το άζωτο από το άμεσο περιβάλλον τους σε αφομοιώσιμες μορφές, όπως τα αμμωνιακά και νιτρικά ιόντα, καθώς και οργανικές αζωτούχες ουσίες, όπως τα αμινοξέα.

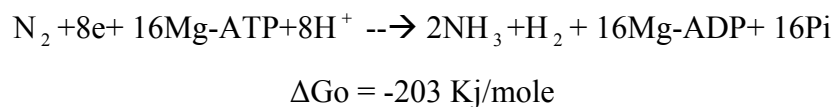
Η μετατροπή του μοριακού αζώτου σε αφομοιώσιμες από τους διάφορους

οργανισμούς μορφές, μπορεί να γίνει με τους εξής τρόπους:

- 1) Δέσμευση του ατμοσφαιρικού αζώτου από μικροοργανισμούς που ζουν συμβιωτικά στις ρίζες (φυμάτια) ορισμένων φυτών.
- 2) Δέσμευση του ατμοσφαιρικού αζώτου από μικροοργανισμούς που διαβιούν ελεύθερα στο έδαφος και πιθανόν από μικροοργανισμούς εγκατεστημένους στο μικροπεριβάλλον των φύλλων ορισμένων τροπικών φυτών.
- 3) Χημική μετατροπή του ατμοσφαιρικού αζώτου στη μορφή οξειδίων, κατά την εκκένωση ατμοσφαιρικών ηλεκτρικών φορτίων.
- 4) Βιομηχανική παραγωγή συνθετικών αζωτούχων λιπασμάτων με τη μορφή ιόντων NH_3 , NO_3 ή CN_2 . (Δροσόπουλος, 1992)

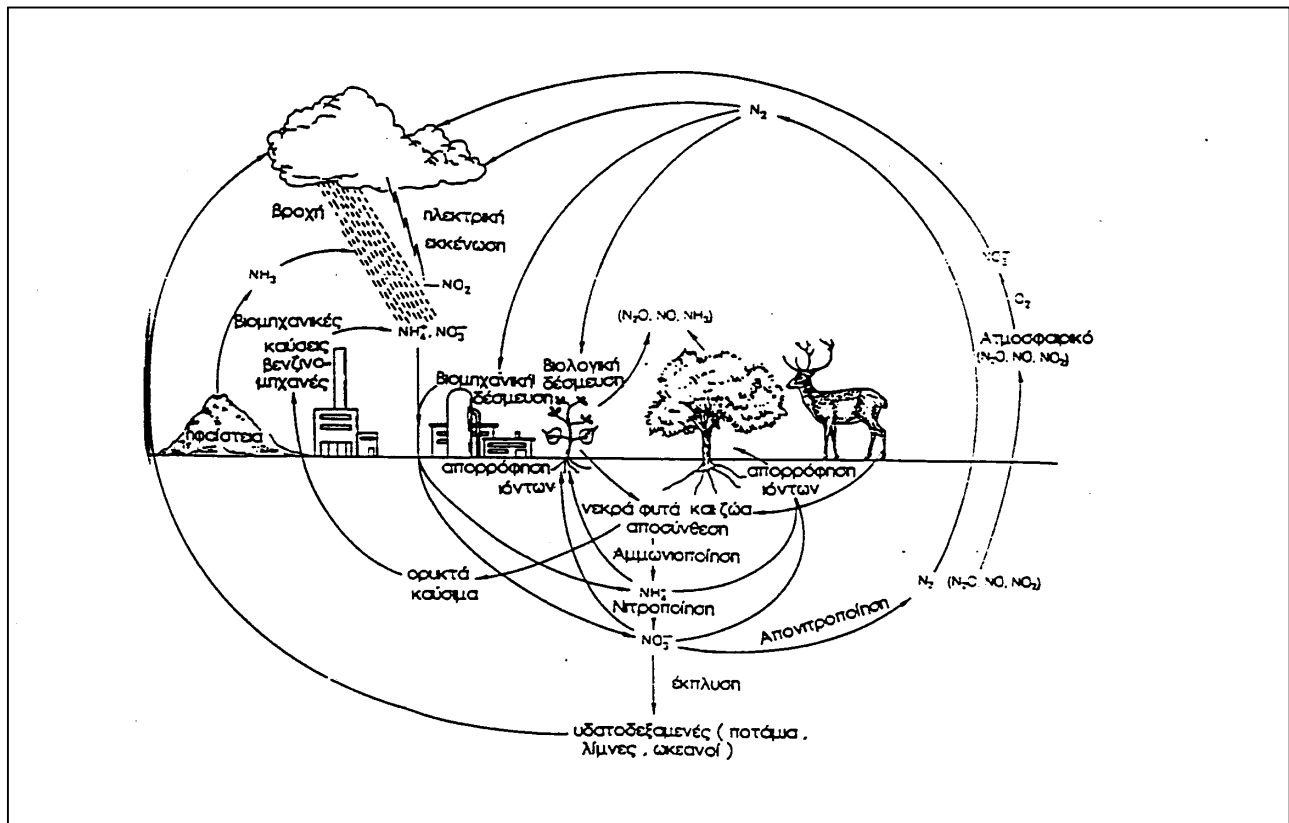
Οι βιοχημικές διεργασίες της δέσμευσης του αζώτου είναι κατά κύριο λόγο υπεύθυνες για τη γονιμότητα των γεωργικών εδαφών. Ακόμη και σήμερα, παρόλη τη μεγάλη ανάπτυξη των βιομηχανιών παραγωγής χημικών λιπασμάτων η συμβιωτική δέσμευση του ατμοσφαιρικού αζώτου μέσω φυματίων, εξακολουθεί να θεωρείται ως η κύρια διαδικασία εμπλουτισμού των γεωργικών εδαφών σε άζωτο. (Δροσόπουλος, 1992)

Οι μικροοργανισμοί που αφομοιώνουν άζωτο διαθέτουν τον κατάλληλο βιοχημικό εξοπλισμό διάσπασης του τριπλού ομοιοπολικού δεσμού του μοριακού αζώτου στις συνήθεις θερμοκρασίες και πιέσεις (ενζυμικό σύστημα της νιτρογενάσης).



Σχήμα1 : Συνοπτική παρουσίαση της ενζυμικής αντίδρασης της νιτρογενάσης.

Συνοπτικά, ο κύκλος του αζώτου στη φύση μπορεί να παρουσιασθεί ως εξής:



Σχήμα 2: Ο κύκλος του αζώτου (Δροσόπουλος 1992)

1.4 Μορφές αζώτου

Τα φυτά και οι περισσότεροι μικροοργανισμοί, εκτός ορισμένων ειδών βακτηρίων και μυκήτων, χρησιμοποιούν και αφομοιώνουν μόνο το νιτρικό (NO_3) και το αμμωνιακό (NH_4^+) άζωτο. Οι δύο αυτές μορφές του αζώτου βρίσκονται σε υπολογίσιμα ποσά στο έδαφος, ενώ άλλες μορφές όπως το νιτρώδες (NO_2) άζωτο ή υπονιτρώδες (HNOH) ή η υδροξυλαμίνη (NH_2OH) απαντούν μόνο σε ειδικές περιπτώσεις και σε ίχνη.

Η περισσότερο όμως διαδεδομένη μορφή ανοργάνου αζώτου στο έδαφος είναι το

(NO₃) νιτρικό άζωτο. Αυτό, οφείλεται στο ότι στα εδάφη υπό κανονικές συνθήκες, είναι πολύ διαδεδομένα τα βακτήρια νιτροποίησης τα οποία οξειδώνουν το αμμωνιακό άζωτο (γένος Nitrosomonas) προς νιτρώδες και το νιτρώδες (γένος Nitrobacter) προς νιτρικό άζωτο. Έτσι το αμμωνιακό άζωτο είναι βραχύβιο και παροδικό και μόνο κάτω από συνθήκες που δεν ευνοούν τη νιτροποίηση (αναερόβιο περιβάλλον, υπερβολική υγρασία, χαμηλή θερμοκρασία εδάφους, μη ευνοϊκό pH), είναι δυνατόν να διατηρούνται υψηλότερες συγκεντρώσεις για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα, ή όταν έχουν προστεθεί πρόσφατα υψηλές δόσεις αμμωνιακών λιπασμάτων. (Νιαβής, 1981)

Το νιτρικό άζωτο υπόκειται σε έκπλυση από τα όμβρια ύδατα και δεν είναι δυνατό να σχηματίσει αποθέματα εντός του εδάφους, η δε στάθμη του υφίσταται ευρύτατες διακυμάνσεις, οι οποίες εξαρτώνται από το ρυθμό εκπλύσεώς του.

Το αμμωνιακό άζωτο είναι άμεσα αφομοιώσιμο από τα φυτά, ενώ το νιτρικό άζωτο για να μετατραπεί σε οργανικό πρέπει πρώτα να προηγηθεί η μετατροπή του σε αμμωνιακό εντός των κυττάρων. Ακόμα, το νιτρικό άζωτο δεν είναι τοξικό σε αντίθεση με το αμμωνιακό γι' αυτό και πρέπει τα κύτταρα να διατηρούν χαμηλή τη συγκέντρωσή του για να αποφύγουν τοξικές παρενέργειες.

Έτσι επιβάλλεται η χρήση του αμμωνιακού αζώτου κατά τις φάσεις της κύριας βλαστικής ανάπτυξης ή το νεανικό στάδιο των φυτών ή για φυτά που δείχνουν ιδιαίτερη προτίμηση σ' αυτή τη μορφή αζώτου ή σε περιπτώσεις άμεσης αντιμετώπισης τροφopenίας αζώτου.

Υπό φυσικές συνθήκες βέβαια, δεν υπάρχουν προϋποθέσεις άμεσων τοξικών παρενεργειών του αμμωνιακού αζώτου, διότι μετατρέπεται σχετικά ταχέως σε νιτρικό. Το νιτρικό άζωτο παρόλο που ελέγχεται η χρησιμοποίησή του από τα φυτά, η εντατική απορρόφησή του χωρίς περαιτέρω μεταβολισμό (μετατροπή σε οργανικό άζωτο), έχει σαν συνέπεια τη συσσώρευση νιτρικών στους φυτικούς ιστούς. Η παρουσία των νιτρικών στα φυτικά προϊόντα αντενδείκνυται γιατί είναι επιβλαβή και τοξικά στους ζωϊκούς οργανισμούς. (Νιαβής, 1981)

1.5. Υπολογισμός των αναγκών σε άζωτο

Τα ποσά του αζώτου που είναι αναγκαία για τα φυτά εξαρτώνται από το είδος του φυτού και το στάδιο ανάπτυξης αυτού. Για τον υπολογισμό των αναγκών σε άζωτο, πρέπει

να γίνονται συχνές αναλύσεις και να λαμβάνονται υπόψη η καλλιέργεια που προηγήθηκε, η παρουσία υπολειμμάτων οργανικής ουσίας και ο βαθμός απόπλυσης.

Απαιτητικά σε άζωτο λαχανικά είναι: σπαράγγι, λάχανο, καρότο, κουνουπίδι, πατάτα, τομάτα.

Λιγότερο απαιτητικά είναι τα : παντζάρι, μαρούλι, κρεμμύδι, σπανάκι.

Λαχανικά με ακόμα μικρότερες απαιτήσεις σε άζωτο είναι τα : φασολάκι, αγγούρι, μελιτζάνα, πιπεριά. (Ολύμπιος, 1987).

Όσον αφορά το χρόνο τοποθέτησης των αζωτούχων λιπασμάτων συνήθως το 1/3 τοποθετείται υπό αμμωνιακή μορφή πριν τη φύτευση, και τα υπόλοιπα 2/3 υπό νιτρική μορφή κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των καλλιεργειών σε μία ή περισσότερες δόσεις.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ ΝΙΤΡΙΚΩΝ ΙΟΝΤΩΝ ΣΤΑ ΦΥΤΑ

2.1. Γενικά

Η συνεχώς αυξανόμενη ζήτηση σε τρόφιμα σ' όλο το κόσμο, οδήγησε σε μια σειρά αλλαγών που είχαν σαν αποτέλεσμα την αύξηση της παραγωγής και του εισοδήματος των αγροτών.

Στην Ελληνική αγορά, τα φυλλώδη λαχανικά και ιδιαίτερα το σπανάκι και το μαρούλι, έχουν μεγάλη ζήτηση και αποδίδουν αρκετά υψηλό εισόδημα στους παραγωγούς. Γι' αυτό, σε πολλές περιοχές χρησιμοποιούνται μεγάλες ποσότητες αζωτούχων λιπασμάτων. Ορισμένοι παραγωγοί, τελευταία, χρησιμοποιούν το γιββερελικό οξύ (GA_3) για την επίτευξη ακόμα μεγαλύτερης και προϊμότερης παραγωγής. Οι επεμβάσεις αυτές, οδηγούν σε αύξηση της παραγωγής εκπεφρασμένη σε νωπό βάρος φυτών. (Πασπάτης, 1990, Τσικίνη, 1993)

Είναι γνωστό ότι στα λαχανικά και ιδιαίτερα στα φυλλώδη (σπανάκι, μαρούλι, σέλινο, αντίδι κ.ά.) υπάρχει έντονο το πρόβλημα της συγκέντρωσης των νιτρικών (NO_3). Η συσσώρευση των νιτρικών (NO_3) στα φυτά, οφείλεται σε πολύ μεγάλο βαθμό στην υπερβολική χρήση αζωτούχων λιπασμάτων. (Πασπάτης, 1990)

Από πειράματα που έχουν γίνει στην Χώρα μας (Πασπάτης, 1990) έχει βρεθεί ότι το γιββερελικό οξύ (GA_3), το οποίο εφαρμόζεται εξωγενώς στα φυτά, με σκοπό την αύξηση και προίμηση της παραγωγής προκαλεί σημαντικές αυξήσεις των ποσών των νιτρικών. Επίσης, φαίνεται ότι και άλλες φυτορρυθμιστικές ουσίες όπως το folcysteine, συμβάλλουν στην αύξηση της περιεκτικότητας των φυτών σε νιτρικά.

Άλλοι παράγοντες που συμβάλλουν στη νιτρική συσσώρευση είναι η έλλειψη άλλων στοιχείων, το είδος του φυτού (μερικά φυτά είναι επιρρεπή στη συσσώρευση αυτή) καθώς επίσης και διάφοροι περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως υψηλές θερμοκρασίες, χαμηλή ένταση φωτισμού, μικρή φωτοπερίοδος κ.ά.

Η συσσώρευση των νιτρικών, αποτελεί σήμερα σημαντικό πρόβλημα καθώς ο άνθρωπος καταναλώνει αυξημένα ποσά μέσω των διαφόρων τροφών του. Το γεγονός αυτό, έχει προκαλέσει αρκετή ανησυχία και έχει οδηγήσει σε έρευνες σχετικά με το θέμα των

επιπτώσεων που επιφέρουν τα νιτρικά στον ανθρώπινο οργανισμό.(Πασπάτης, 1990)

Ο καθορισμός των ορίων για τη μείωση της λήψης των νιτρικών είναι σκόπιμος, καθώς διαπιστώθηκε ότι δεν αποκλείονται υπερβάσεις των ανεκτών ποσοτήτων ημερήσιας λήψης, όπως έχουν καθορισθεί από την Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας.

Γι' αυτό το λόγο, η Ευρωπαϊκή Κοινότητα έχει θέσει ανώτατα επιτρεπόμενα όρια στη συγκέντρωση των νιτρικών ιόντων στα φυλλώδη λαχανικά. Έτσι, τα όρια αυτά κυμαίνονται από 2500 mg NO⁻₃N/ Kgr N.B. έως 4000 mg NO⁻₃N/ Kgr N.B. ανάλογα με την εποχή της καλλιέργειας.

Ειδικότερα, τα όρια για τα μαρούλια και τα αντίδια της θερινής περιόδου καθορίζονται στα 2500 mg NO⁻₃N/ Kgr N.B. φυτών, ενώ για τη χειμερινή περίοδο (Νοέμβριο-Απρίλιο) καθορίζονται στα 3500 mg NO⁻₃N/ Kgr N.B. Επίσης, στη Γερμανία τα ανώτατα επιτρεπόμενα όρια συγκέντρωσης νιτρικών ιόντων ανέρχονται σε 2500 mg NO⁻₃N/ Kgr N.B. για το φρέσκο σπανάκι ενώ για το κατεψυγμένο σπανάκι είναι 2000 mg NO⁻₃N/ Kgr N.B. φυτών.

2.2. Παράγοντες που επιδρούν στη νιτρική συσσώρευση στα φυτά

Η συσσώρευση των νιτρικών στα φυτά, με την προϋπόθεση ότι ο κυριος ογκος του απορροφουμενου αζώτου είναι υπό αυτή τη μορφή, συμβαίνει γενικά όταν ο ρυθμός απορρόφησης, είναι μεγαλύτερος από τον ρυθμό αφομοίωσής τους από τον φυτικό οργανισμό. Η συσσώρευση των νιτρικών ιόντων, μπορεί να είναι προσωρινή και η συγκέντρωσή τους στους φυτικούς ιστούς, μπορεί να μειώνεται όταν το φυτό γερνάει και ο ρυθμός απορρόφησης μειώνεται.

Η επίδραση των αγρονομικών συντελεστών (ποικιλία, τρόπος λίπανσης, εφαρμογή φυτοφαρμάκων κτλ) στην περιεκτικότητα των φυλλωδών λαχανικών σε νιτρικά είναι σημαντική, δεν έχει όμως μελετηθεί σε βάθος.

Η λίπανση παίζει καθοριστικό ρόλο στη νιτρική συσσώρευση και αυτό έχει μεγάλη σημασία για τον καταναλωτή αφού τελευταία έχει βρεθεί ότι και οι φυτορρυθμιστικές ουσίες μπορεί να προκαλέσουν σε φυλλώδη λαχανικά, αύξηση των νιτρικών. Έτσι, η εξωγενής εφαρμογή του γιββερελικού οξέος (GA₃), μπορεί να επιβαρύνει περισσότερο μια ίσως επικίνδυνη κατάσταση. Αυτό, αποκτά ακόμα μεγαλύτερη σημασία αν ληφθεί υπόψη ότι

γίνεται πολλές φορές κατάχρηση αζωτούχων λιπασμάτων, σε πολλές περιοχές της χώρας μας.

Η χρήση συνθετικών αζωτούχων λιπασμάτων δεν είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την παραγωγή φυτών με υψηλή συγκέντρωση σε νιτρικά καθώς και χρήση κοπριάς ζώων σχετίστηκε με ανώμαλη νιτρική συσσώρευση. (Wright & Davison, 1964)

Η εκλογή του κατάλληλου χρόνου αζωτούχου λίπανσης φαίνεται να επηρεάζει τη συγκέντρωση των νιτρικών στο χορτάρι βοσκής. Εφαρμογή αυτού πριν το θέρος, τείνει να αυξήσει τη συσσώρευση. (Wright & Davison, 1964)

Η φωσφορούχος λίπανση, αυξάνει επίσης τη συγκέντρωση των νιτρικών, ενώ αναφέρθηκαν και περιπτώσεις όπου δεν ασκεί καμιά επίδραση. (Wright & Davison, 1964)

Οι παράγοντες που επιδρούν στην συσσώρευση των νιτρικών μπορεί να είναι τόσο ενδογενείς, όσο και εξωγενείς.

A. Ενδογενείς παράγοντες

1. **Διαφορές μεταξύ των φυτών** . Οι οικογένειες Amaranthaceae, Chenopodiaceae, Cruciferae, Compositae, Graminae, Solanaceae (Wright & Davison, 1964) θεωρούνται οι πιο αντιπροσωπευτικές, φυτών τα οποία είναι επιρρεπή στη νιτρική συσσώρευση. Οι οικογένειες αυτές είναι μεγάλες και οικονομικά σημαντικές. Υπάρχουν όμως μεγάλες διαφορές μεταξύ όχι μόνο φυτών διαφορετικού γένους και είδους, αλλά ακόμη και μεταξύ φυτών του ίδιου είδους και μάλιστα υπό τις ίδιες συνθήκες ανάπτυξης. Είναι λοιπόν, πολύ δύσκολο να κάνουμε μια ταξινόμηση όσον αφορά την τάση των φυτών να συσσωρεύουν νιτρικά ιόντα.

2. **Θέση στο φυτό**: Κατά κανόνα, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων ανιχνεύονται στους βλαστούς, ενώ οι αμέσως χαμηλότερες συγκεντρώσεις ανιχνεύονται στις ρίζες. Επίσης, τα κατώτερα μέρη των βλαστών συσσωρεύουν νιτρικά από τα ανώτερα μέρη. Οι μικρότερες συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων συνήθως ανιχνεύονται στα φύλλα και στα άνθη.

3. **Ηλικία των φυτών**: Η περιεκτικότητα σε νιτρικά ενός ολόκληρου φυτού, μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια του βιολογικού του κύκλου. Αυξάνει προοδευτικά κατά την ανάπτυξη του φυτού, φθάνοντας σε ένα μέγιστο σημείο αμέσως πριν την άνθηση και έπειτα αρχίζει να μειώνεται μέχρι την ωρίμανση. Οι καρποί και τα σπέρματα, συνήθως περιέχουν μικρές ποσότητες νιτρικών ιόντων και έτσι η παραπάνω μείωση της ολικής περιεκτικότητας του φυτού σε $\text{NO}_3^- \text{N}$ μπορεί ίσως να εξηγηθεί από το γεγονός, ότι κατά το αναπαραγωγικό στάδιο, οι ανάγκες του φυτού σε αζωτούχες ενώσεις είναι πολύ μεγάλες.

Παράγοντες που παρεμποδίζουν την ομαλή ωρίμανση των καρπών ή των σπερμάτων, όπως π.χ. η έλλειψη νερού ή οι πολύ υψηλές θερμοκρασίες, συντελούν στη διατήρηση

υψηλών συγκεντρώσεων νιτρικών ιόντων, στους βλαστούς και στα φύλλα των φυτών. Η εξήγηση για τη σύνδεση της ηλικίας των φυτών και της περιεκτικότητάς τους σε νιτρικά, μπορεί να είναι ότι όσο το φυτό μεγαλώνει σε ηλικία και πλησιάζει στο στάδιο της ωρίμανσης, μειώνεται η δυνατότητα απορρόφησης αζώτου από το έδαφος και συνεπώς το φυτό αφομοιώνει τα συσσωρευμένα νιτρικά για να καλύψει τις ανάγκες του σε άζωτο. Η μειωμένη απορρόφηση αζώτου, μπορεί να οφείλεται στη μείωση του διαθέσιμου νερού, που πολλές φορές συμβαίνει κατά την ωρίμανση, στο τέλος της καλλιεργητικής περιόδου. (Wright & Davison 1964 , Scalfe et al. 1986)

4. Δραστηριότητα του ενζυμικού συστήματος της ρεδούκτασης των νιτρικών

Το ενζυμικό σύστημα της ρεδουκτάσης των νιτρικών (NR), είναι υπεύθυνο για την αναγωγή των νιτρικών ιόντων σε νιτρώδη. Η παρεμπόδιση της λειτουργίας του ενζύμου, έχει σαν αποτέλεσμα τη συσσώρευση νιτρικών ιόντων στα φυτά αλλά έχουν παρατηρηθεί επίσης περιπτώσεις στις οποίες υπήρξαν υψηλές συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων, σε φυτά στα οποία η δραστηριότητα της NR ήταν φυσιολογική. Τέτοιου είδους φαινόμενα, μπορούν να αποδοθούν σε διαφορές ρυθμού απορρόφησης νιτρικών ιόντων και ρυθμού αφομοίωσης ή μετατροπής αυτών. Δεν φαίνεται λοιπόν, να ισχύει ότι υψηλή δραστηριότητα του ενζύμου συνεπάγεται χαμηλή συγκέντρωση νιτρικών ιόντων στο φυτό ή το αντίθετο. (Hall et al. 1993, Wright & Davison 1964)

B. Εξωγενείς παράγοντες:

1.Εξωγενής αζωτούχος θρέψη : Πολλά πειράματα έχουν αποδείξει ότι η εξωγενής αζωτούχος θρέψη μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα τη συσσώρευση νιτρικών ιόντων στα φυτά. Η εκλογή του κατάλληλου χρόνου αζωτούχου λίπανσης, φαίνεται να επηρεάζει την περιεκτικότητα των φυτών σε νιτρικά. Για παράδειγμα, εφαρμογή λιπάσματος πριν τη συγκομιδή, τείνει να αυξήσει τη συσσώρευση νιτρικών σε καλλιέργειες που προορίζονται για ζωοτροφές. (Cantliffe 1973 , Femades & Rossiello 1995) .

Επίσης, εφαρμογή αζωτούχου λίπανσης σε χορτάρι βοσκής, πριν το θέρος τείνει να αυξήσει τη συσσώρευση. (Wright & Davison, 1964)

Ακόμα, οι υψηλές συγκεντρώσεις νιτρικών συσχετίστηκαν με εφαρμογές $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ και NH_4NO_3 σε αντίθεση με την ουρία και τη θειϊκή αμμωνία σε ισοδύναμες αναλογίες. Το KNO_3 προωθεί περισσότερο τη νιτρική συσσώρευση από τα $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ και NaNO_2 .

2. Άλλα θρεπτικά συστατικά: Το κάλιο (K), φαίνεται να αποτελεί το ευκολότερο διαθέσιμο

κατιόν για τη διατήρηση της ηλεκτρικής ισορροπίας όταν συσσωρεύονται νιτρικά στα φυτά. Αύξηση, όμως των επιπέδων καλίου (K) οδηγεί σε συσσώρευση των νιτρικών όταν αυτά, είναι παρόντα σε υψηλά επίπεδα. Επίσης, έλλειψη μολυβδαινίου (Mo) και μαγγανίου (Mn) ευνοεί τη νιτρική συσσώρευση. (Wolff & Wasserman, 1972) Ειδικότερα, το μολυβδαίνιο (Mo), το οποίο έχει σημαντικό ρόλο μιας και είναι συστατικό του ενζυμικού συστήματος της ρεδουκτάσης των νιτρικών. (Taiz & Zeiger, 1991)

3. Υγρασία του εδάφους: Πολλές διεργασίες, που εξαρτώνται από την παρουσία νερού στο έδαφος, συμβάλλουν στη συσσώρευση των νιτρικών ιόντων στα φυτά. Περιπτώσεις νιτρικής δηλητηρίασης, είναι περισσότερο συχνές σε ημιάνυδρες και υπόυγρες περιοχές. Σε φυτά τα οποία βρίσκονται σε κατάσταση αδράνειας οφειλόμενης σε ξηρασία, μπορούν να συσσωρευθούν επικίνδυνα υψηλές ποσότητες νιτρικών αν η μικροβιακή απελευθέρωση και η διαδικασία μεταφοράς νιτρικών διεγερθεί από βροχόπτωση. (Wolff & Wasserman, 1972)

Η απελευθέρωση του θρεπτικού αζώτου, από τις σύνθετες οργανικές ενώσεις του εδάφους, απαιτεί μικροβιακή δραστηριότητα που χρειάζεται υγρασία. Το ελευθερούμενο άζωτο και το άζωτο των λιπασμάτων διαλύεται στο εδαφικό διάλυμα, και μέσω αυτού απορροφάται από τις ρίζες των φυτών και οδηγεί μέσω των αγγείων στα σημεία όπου θα λάβει μέρος η αφομοίωσή του. Έτσι, η επάρκεια νερού είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την απορρόφηση και την μετακίνηση του αζώτου στα φυτά. (Wright & Davison, 1964)

4. Άλλοι εξωγενείς παράγοντες –περιβαλλοντικοί παράγοντες : Η θερμοκρασία φαίνεται να είναι ένας σημαντικός παράγοντας στη συσσώρευση νιτρικών ιόντων στα φυτά. Υψηλές συγκεντρώσεις NO_3 έχουν παρατηρηθεί σε ακραίες θερμοκρασίες, δηλαδή πολύ υψηλές (Cantliffe, 1972c) ή πολύ χαμηλές. Αυτό είναι πιθανόν, να οφείλεται σε δυσλειτουργία του ενζυμικού συστήματος της ρεδουκτάσης των νιτρικών, ενώ, επίσης σε χαμηλές θερμοκρασίες έχει παρατηρηθεί μείωση του ρυθμού αφομοίωσης σε σχέση με το ρυθμό απορρόφησης των νιτρικών ιόντων. (Cantliffe, 1972) Άλλοι παράγοντες που έχουν σχέση με τη νιτρική συσσώρευση είναι η χαμηλή ένταση φωτισμού (Cantliffe, 1972a) και μικρή φωτοπερίοδος (Cantliffe, 1976b). Η περιεκτικότητα των φυλλωδών λαχανικών σε νιτρικά, αυξάνεται όταν επικρατούν συνθήκες χαμηλής ηλιοφάνειας, κάτι που δεν συμβαίνει στη χώρα μας. Το γεγονός αυτό, έχει σαν αποτέλεσμα να υπάρχουν μικρότερες συγκεντρώσεις νιτρικών (Πασπάτης, 1990), σε σχέση με αυτές που έχουν παρουσιάσει ερευνητές από άλλες χώρες της Ευρώπης. (Quinche & Dvorak, 1980)

Η συγκέντρωση νιτρικών, τείνει να είναι υψηλότερη σε συνεφιασμένες ημέρες, καθώς επίσης και σε φυτά τα οποία βρίσκονται κάτω από συνεχή φωτισμό. Περισσότερα

νιτρικά συσσωρεύονται στο σκοτάδι απ' ότι στο φως, το οποίο φαίνεται να θέτει σε κυκλοφορία τα νιτρικά από τα σημεία αποθήκευσης προς τα σημεία μεταβολισμού, ενώ τα νιτρικά που δεν ανάγονται τελικά συσσωρεύονται στα κενοτόπια. (Granstedt & Huffaker, 1981) Η ώρα της ημέρας κατά την οποία πραγματοποιείται η συγκομιδή, καθώς και οι συνθήκες που επικρατούν τη στιγμή των μετρήσεων, έχουν σημαντική επίδραση στη συγκέντρωση των νιτρικών. Ακόμα, οι βλάβες που προκαλούνται στα φυτά από χημικές επεμβάσεις, είναι ένας παράγοντας που ευνοεί τη συσσώρευση νιτρικών ιόντων στα φυτά. (Wolff & Wasserman, 1972).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΝΙΤΡΙΚΑ - ΝΙΤΡΩΔΗ - ΝΙΤΡΟΖΑΜΙΝΕΣ

3.1. Τα νιτρικά σαν τοξικός παράγοντας

Τα νιτρικά ιόντα μετά την απορρόφησή τους από το εδαφικό διάλυμα, αφομοιώνεται πολύ γρήγορα, με αποτέλεσμα τη συγκέντρωσή τους στους φυτικούς ιστούς. Τα αυξημένα ποσά νιτρικών που λαμβάνονται από τον ανθρώπινο οργανισμό, μπορεί να θέσουν σε κίνδυνο ακόμα και τη ζωή του ανθρώπου.

Ο τρόπος εμπλοκής των νιτρικών στην τοξικότητα που προκαλούν, είναι κατά την αναγωγή τους προς νιτρώδη κατά την διαδικασία της πέψης των θηλαστικών. Τα νιτρώδη ενώνονται κατά μη αντιστρέψιμο τρόπο με την αιμοσφαιρίνη του αίματος για να σχηματίσουν μεθαιμοσφαιρίνη.

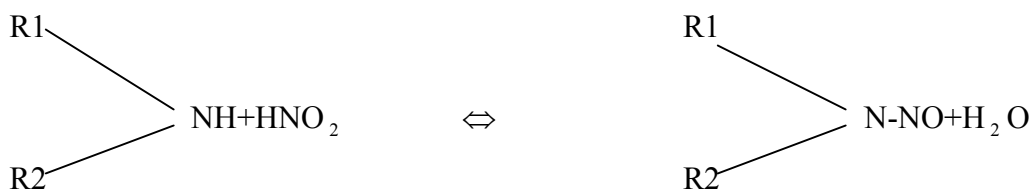
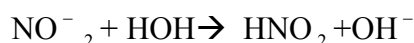
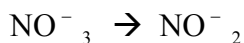
Η αιμοσφαιρίνη (Hb), είναι μια χρωστική, συστατικό των ερυθρών αιμοσφαιρίων η οποία περιέχει Fe (II). Αποτελεί το φορέα του οξυγόνου από τους πνεύμονες προς τους ιστούς. Το οξυγόνο ενώνεται προσωρινά με την αιμοσφαιρίνη στις κυψελίδες των πνευμόνων, σχηματίζοντας την οξυαιμοσφαιρίνη (HbO_2). Η οξυαιμοσφαιρίνη είναι ασταθής ένωση και καθώς μεταφέρεται με την κυκλοφορία του αίματος στους διάφορους ιστούς, παρέχει εύκολα σε αυτούς το απαραίτητο οξυγόνο και μεταπίπτει στην αρχική της κατάσταση. Έτσι, με την αναπνευστική οδό μεταφέρεται οξυγόνο ενώ ο σίδηρος (Fe) μεταπίπτει στη τρισθενή μορφή του Fe (III) καθώς οξειδώνεται. Σε περιπτώσεις κατανάλωσης τροφών με μεγάλη περιεκτικότητα σε νιτρικά, αυτά κατά τη διαδικασία της πέψης ανάγονται προς νιτρώδη (NO_2). Εάν το νιτρώδες ιόν απορροφηθεί στο αίμα, ο δισθενής σίδηρος της αιμοσφαιρίνης μπορεί να οξειδωθεί στη τρισθενή μορφή του, παράγοντας μεθαιμοσφαιρίνη. Στην κατάσταση αυτή, η χρωστική χάνει την ικανότητά της να μεταφέρει οξυγόνο και σχηματίζει ένα καστανόχρωμο σύνθετο, την μεθαιμοσφαιρίνη (MetHb). Σε αντίθεση με την οξυαιμοσφαιρίνη, η μεθαιμοσφαιρίνη είναι πολύ σταθερή ένωση και δεν διασπάται στους ιστούς. Όταν η συγκέντρωση της μεθαιμοσφαιρίνη υπερβεί το 70%, εκδηλώνεται δηλητηρίαση γνωστή ως μεθαιμοσφαιριναιμία. Η μεθαιμοσφαιριναιμία παρουσιάζει συμπτώματα έλλειψης οξυγόνου (ανοξία), που οδηγούν ακόμα και στο θάνατο. Η μεθαιμοσφαιριναιμία είναι ιδιαίτερος επικίνδυνος για τα παιδιά .

Δηλητηριάσεις ενηλίκων από νιτρώδη, δεν φαίνεται να αποτελεί ένα άκρως σημαντικό πρόβλημα. Ωστόσο, τυχαία προσθήκη υπερβολικών ποσοτήτων νιτρωδών στις τροφές, οδήγησαν σε περιπτώσεις δηλητηριάσεων ενηλίκων και παιδιών (Wolff & Wassermann, 1972)

Κατά την παρατεταμένη αποθήκευση νωπών λαχανικών ή αποθήκευσή τους με λανθασμένο τρόπο, μέρος των νιτρικών ανάγονται σε νιτρώδη. Ένα ακόμα σημαντικό θέμα, είναι και η δυνατή συσσώρευση νιτρωδών αλάτων κατά την αποθήκευση φρέσκων λαχανικών με υψηλή περιεκτικότητα νιτρικών αλάτων. Στη Γερμανία, αναφέρθηκαν 16 περιπτώσεις νηπιακής μεθαιμοσφαιριναιμίας και βρέθηκε ότι οφείλονταν σε μη σωστά αποθηκευμένο πολύ σπανακιού, όπου περιείχε περισσότερο από 1000 ppm νιτρωδών. (Siciliano και συνεργάτες, 1975)

Το σπανάκι, το μαρούλι, τα τεύτλα, τα ραπανάκια, το σέλινο, η μελιτζάνα, το λάχανο και τα πράσινα γογγύλια είναι ανάμεσα στα λαχανικά που γενικώς περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις νιτρικών. Το ποσό των νιτρικών σε ορισμένα δείγματα μπορεί να υπερβαίνει τα 3000 ppm. Εντούτοις, οι απόλυτες τιμές που αναφέρονται ποικίλουν εξαιρετικά, παραγόντων γενετικών, περιβαλλοντικών, εξαιτίας δειγματοληψίας και ωριμότητας.

Καρκίνος, μεταλλάξεις και γενετικές ανωμαλίες μπορεί να προκληθούν από τις νιτροζαμίνες, ουσίες που σχηματίζονται από την αντίδραση των νιτρωδών με δευτερογενείς αμίνες. Υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον στην πιθανότητα ότι οι νιτροζαμίνες μπορούν να σχηματισθούν in vivo και έτσι να προκαλέσουν όγκους σε άτομα, όχι απαραίτητα, εκτεθειμένα σε νιτροζαμίνες per se. Οι δευτεροταγείς αμίνες, έχει αποδειχθεί ότι αντιδρούν με τα νιτρώδη και σχηματίζουν νιτροζαμίνες σε συνθήκες καθορισμένου pH, αλλά και σε άλλες συνθήκες εφάμιλλες με εκείνες που επικρατούν στο στομάχι των θηλαστικών, καθώς επίσης και in vitro στο γαστρικό υγρό.



Σχήμα 3 : Σχηματισμός νιτροζαμινών από δευτεροταγείς αμίνες και νιτρώδη άλατα.

Όταν σε αρουραίους, δόθηκαν μαζί το διαιτολόγιό τους νιτρώδη και η δευτεροταγής αμίνη μεθυλβενζυλαμίνη (methylbenzylamine), ανέπτυξαν όγκους στον οισοφάγο, οι οποίοι επίσης προκαλούνται από την νιτροζομεθυλβενζυλαμίνη (nitrosomethylbenzylamine), την αντίστοιχη νιτροζαμίνη.

Αυτό που φαίνεται, είναι ότι ο σχηματισμός νιτροζαμινών *in vivo* και *in vitro*, είναι σημαντικός για τον άνθρωπο. Αυτές οι συνθήκες κατεύθυναν την προσοχή μας, τη περιβαλλοντική εξάπλωση των νιτρωδών και των νιτροζαμινών δευτεροταγών αμινών, ως πρόδρομοι των νιτροζαμινών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4ο

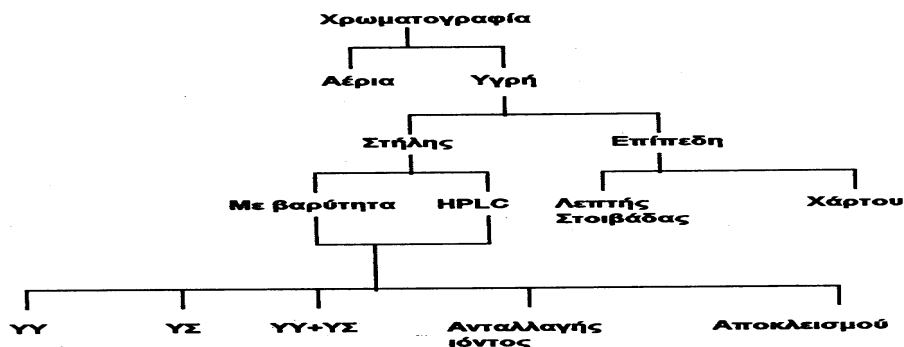
ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (H P L C)

Επειδή για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων των Νιτρικών στα διάφορα φυτικά προϊόντα , στο Πειραματικό μέρος της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC), κρίθηκε σκόπιμο να αναφερθούμε εν συντομία στις γενικές αρχές της παραπάνω μεθόδου που είναι και η κυριότερη από τις επίσημα αναγνωρισμένες μεθόδους προσδιορισμού των νιτρικών στην Ευρωπαϊκή Ένωση.

4.1. Αρχές της υγρής χρωματογραφίας

Κατά τον Μηλιάδη (1995), υγρή χρωματογραφία (liquid chromatography,LC) είναι μια τεχνική διαχωρισμού γνωστή από τις αρχές του αιώνα, που τα τελευταία χρόνια βρίσκει εφαρμογή σε όλο και περισσότερους τομείς. Σε σχέση με την αέρια χρωματογραφία, πλεονεκτεί στο διαχωρισμό και ποσοτικό προσδιορισμό πολικών, μη πτητικών ή θερμοευαίσθητων ενώσεων.

Η χρωματογραφία γενικά περιλαμβάνει μια σειρά τεχνικών διαχωρισμού με κοινά χαρακτηριστικά γνωρίσματα. Το προς διαχωρισμό μίγμα τοποθετείται σε προσροφητική στατική φάση με μεγάλη ειδική επιφάνεια και η ανάπτυξη, που επιτυγχάνεται με την κινητή φάση, επιτρέπει το διαχωρισμό των συστατικών του μίγματος λόγω της κίνησης τους με διαφορετική ταχύτητα το καθένα, που οφείλεται με τη σειρά της σε διαφορές στην κατανομή μεταξύ των δυο φάσεων. Η κινητή φάση είναι αέρια (GC) ή υγρή (LC).



Σχήμα 1: Τεχνικές χρωματογραφικών διαχωρισμών (Y=υγρή, Σ=Στερεή). (Μηλιάδης 1995)

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), χρησιμοποιεί τις αρχές της κλασσικής χρωματογραφίας στήλης σε αναλυτικά όργανα με αντλίες υψηλής πίεσης, μεταλλικές στήλες μικρής διαμέτρου με υλικό πληρώσεως μικρού μεγέθους και έναν ανιχνευτή που καταγράφει συνεχώς τη συγκέντρωση του δείγματος.

Η ανάπτυξη της HPLC, έχει συσχετιστεί άμεσα με τα εξαρτήματα αυτά, ενώ με τη χρησιμοποίηση συνδεσμολογίας με πολύ μικρό 'νεκρό όγκο' και υλικών πληρώσεως με επακριβείς διαστάσεις σωματιδίων επιτυγχάνεται ακριβής έλεγχος της ροής από υψηλές πιέσεις.

Η κινητή φάση στην υγρή χρωματογραφία, έχει σημαντική επίδραση στη διαχωριστικότητα που επιτυγχάνεται, σε αντίθεση με την αέρια χρωματογραφία όπου είναι αδρανής και δεν επηρεάζει το διαχωρισμό.

4.2. Μηχανισμοί διαχωρισμού

Ανάλογα με τις σχετικές πολικότητες μεταξύ στατικής και κινητής φάσης, διακρίνουμε δυο είδη υγρής χρωματογραφίας (Μηλιάδης, 1995)

A) Χρωματογραφία κανονικής φάσης (Κ.Φ., normal phase chromatography), όπου η στατική φάση είναι πιο πολική από την κινητή φάση, με αποτέλεσμα οι λιγότερο πολικές ενώσεις να εκλύονται πρώτες και η έκλυση μιας ένωσης να γίνεται ευκολότερα με αύξηση της πολικότητας της κινητής φάσης.

B) Χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (ΑΦ, reverse phase chromatography), όπου η στατική φάση είναι λιγότερο πολική από την κινητή φάση, με αποτέλεσμα οι πιο πολικές ενώσεις να εκλύονται πρώτες και η έκλυση μιας ένωσης να γίνεται ευκολότερα με μείωση της πολικότητας της κινητής φάσης.

Υπάρχουν πέντε (5) διαφορετικοί μηχανισμοί διαχωρισμού, όπως φαίνεται στο σχήμα 4 και οι οποίοι είναι:

1. Υγρή-Στερεή Χρωματογραφία (ΥΣΧ) ή Χρωματογραφία προσρόφησης που χρησιμοποιεί κατάλληλο προσροφητικό, συνήθως μη επικαλυμμένη πηκτή πυριτίου (silica gel).

2. Υγρή-Υγρή Χρωματογραφία ΥΣΧ και ΥΥΧ που χρησιμοποιεί στατική φάση χημικά προσδεδεμένη (bonded) σε πηκτή πυριτίου με αντίδραση σιλανισμού μεταξύ των σιλανολικών ομάδων της στατικής φάσης και ενός υποκατεστημένου οργανοσιλανίου.

3.Ειδικές τεχνικές συνδυασμένης χρωματογραφίας έχουν αναπτυχθεί για ιονιζόμενες ενώσεις, οι οποίες είναι πολύ υδατοδιαλυτές και δεν κατακρατούνται ιδιαίτερα σε στήλες αντίστροφης φάσης. Αυτές είναι:

I) η χρωματογραφία καταστολής ιόντος (ion suppression chromatography) και II) η χρωματογραφία ζεύγους ιόντων (ion pair chromatography).

4.Χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων(XAI) (ion exchange chromatography), που χρησιμοποιείται στο διαχωρισμό ιοντικών ενώσεων. Ως υπόστρωμα χρησιμοποιείται πηκτή πυριτίου ή μικροσωματιδιακό αδιάλυτο οργανικό πολυμερές, όπως το συμπολυμερές στυρολίου-διβινυλοβενζολίου και ως κινητή φάση υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα.

5.Χρωματογραφία αποκλεισμού(XA), με βάση το μέγεθος(size exclusion chromatography), όπου ο διαχωρισμός των μορίων στηρίζεται στη διαφορά του μεγέθους τους και του σχήματος τους μέσα στο διάλυμα. Οι στατικές φάσεις που χρησιμοποιούνται είναι silica gel ή πολυμερή υλικά πληρώσεως με πόρους ορισμένου μεγέθους.

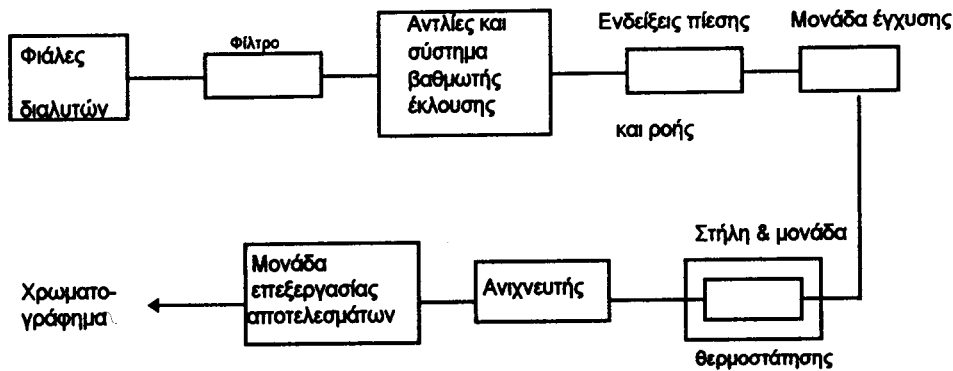
Οι δυο σημαντικές κατηγορίες της χρωματογραφίας αποκλεισμού είναι η χρωματογραφία διαπερατότητας(XΔ) με πηκτή (gel permeation) και η χρωματογραφία διήθησης(XΔ/Θ) με πηκτή (gel filtration).

Παρατήρηση: Ο αναλυτής που θα αναπτύξει μέθοδο HPLC, πρέπει να ελέγξει τις ιδιότητες του δείγματος, κυρίως τη διαλυτότητα του και τις χαρακτηριστικές ομάδες που περιέχει.

4.3. Χρησιμοποιούμενα Όργανα

4.3.1. Τμήματα της συσκευής HPLC

Τα κύρια τμήματα ενός συστήματος HPLC (Μηλιάδης, 1995) είναι οι φιάλες των διαλυτών, το σύστημα αντλιών μαζί με το σύστημα βαθμωτής έκλουσης, ο εγχυτής, η αναλυτική στήλη με τη μονάδα θερμοστάτησης, ο ανιχνευτής, η μονάδα επεξεργασίας των αποτελεσμάτων με το καταγραφικό και οι απαραίτητες σωληνώσεις και καλωδιώσεις.



Σχήμα 2 :Τα τμήματα του συστήματος HPLC(Μηλιάδης 1995)

Το χρησιμοποιούμενο εύρος ροής στην υγρή χρωματογραφία είναι 0,5 έως 5 ml/min και επιτυγχάνεται με αντλίες που λειτουργούν σε πιέσεις 300-6.000 psi ,ενώ με τη χρησιμοποίηση τριχοειδών στηλών(microbore) χρησιμοποιούνται ροές έως 0,3 ml/min.Στις συνηθισμένες στήλες,διαστάσεων 25cm X 4 mm (εσωτ.διαμ.), με υλικό πληρώσεως μεγέθους 5μm, η συνήθως χρησιμοποιούμενη ροή είναι 1ml/min, με πιέσεις 1.000-2.000 psi.

Η στατική φάση αποτελείται από ομοιόμορφα σφαιρικά ή ασύμμετρα πορώδη σωματίδια διαμέτρου 3-10μm.Οι στήλες είναι από ανοξείδωτο χάλυβα μήκους 3-25cm και εσωτερικής διαμέτρου 4,6mm(ή 2mm οι τριχοειδείς) και γεμίζονται με το υλικό πληρώσεως από τον κατασκευαστή.Η στατική φάση αποτελεί ένα επιπλέον,πολύ αποτελεσματικό φίλτρο σωματιδίων.

Τα περισσότερα HPLC συστήματα χρησιμοποιούν χρωματογραφία αντίστροφης φάσης με στατική φάση στην οποία είναι χημικά προσδεδεμένη πλευρική αλυσίδα 8 ή 18 ατόμων άνθρακα (C8 ή C18), ή πλευρική αλυσίδα C-1,C-2, C-4,C-12, CN,NO2, C6H5 ή (OH)2.

4.3.2.Συστήματα αντλιών

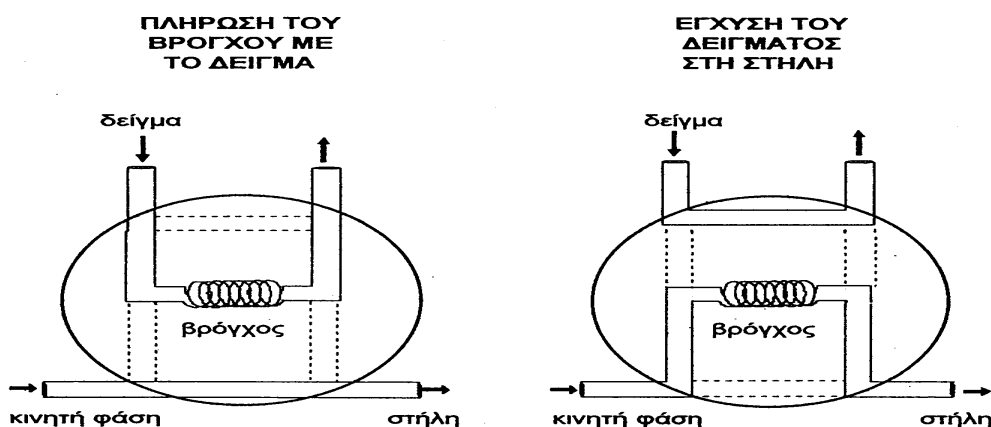
Η λειτουργία της αντλίας στην HPLC, συνίσταται στη διοχέτευση της κινητής φάσης μέσα από τη στήλη,από υψηλή πίεση και με ελεγχόμενη ροή.Υπάρχουν αντλίες δύο κατηγοριών.Αυτές που εφαρμόζουν σταθερή ροή(οι συνήθεις) και αυτές που εφαρμόζουν σταθερή πίεση.Οι αντλίες είναι από ανθεκτικό στη διάβρωση υλικό,αναπτύσσουν πιέσεις

μέχρι 6.000 psi και διαθέτουν ένα εύρος ροής από 0,1 έως 10ml/min, χωρίς διακυμάνσεις.Στα σύγχρονα HPLC όργανα για την επίτευξη ροής χωρίς διακυμάνσεις,χρησιμοποιούνται διπίστονες παλινδρομικές αντλίες,δίδυμης κεφαλής.Η μεταβαλλόμενη χρονικά σύσταση της κινητής φάσης,κατά τη βαθμωτή έκλυση επιτυγχάνεται με ηλεκτρονικό προγραμματισμό της ταχύτητας της κάθε αντλίας.

4.3.3.Συστήματα έγχυσης

Το σύστημα έγχυσης,έχει ως σκοπό την εισαγωγή του δείγματος στο HPLC σύστημα.Για την επίτευξη καλού διαχωρισμού,πρέπει το δείγμα να εισέλθει στην αναλυτική στήλη,με τη μορφή μιας στενής ζώνης.Σήμερα, η εισαγωγή του δείγματος στην αναλυτική στήλη γίνεται υπό πίεση και χωρίς παρεμπόδιση της ροής με τη βοήθεια ειδικών βαλβίδων έγχυσης.Οι βαλβίδες αυτές, περιέχουν ένα βρόγχο (loop) μέσα στον οποίο εισάγεται το δείγμα πριν διοχετευθεί στην αναλυτική στήλη.Υπάρχουν βαλβίδες εξωτερικού βρόγχου,που ο βρόγχος τους έχει σχετικά μεγάλη χωρητικότητα όγκου δείγματος, από 5μl έως 2ml (πιο συνηθισμένοι είναι οι βρόγχοι των 10 ή 20μl), και βαλβίδες εσωτερικού βρόγχου για μικρότερους όγκους έγχυσης 0,05-5μl.Η αρχή λειτουργίας των βαλβίδων βρόγχου,είναι η πλήρωση αρχικά του βρόγχου με το δείγμα και περιστροφή στη συνέχεια της βαλβίδας από τη θέση πλήρωσης (load) στη θέση έγχυσης(ingect), οπότε η κινητή φάση διοχετεύεται πλέον μέσω του βρόγχου προς την αναλυτική στήλη συμπαρασύροντας το δείγμα.

Η καλύτερη τεχνική έγχυσης είναι αυτή κατά την οποία ο βρόγχος πληρώνεται εντελώς με το δείγμα.



Σχήμα 3.. Βαλβίδα εισαγωγής δείγματος (Μηλιάδης 1995).

4.3.4.Ανιχνευτές

Ο ρόλος του ανιχνευτή στην υγρή χρωματογραφία, είναι η διαρκής παρακολούθηση της κινητής φάσης που εξέρχεται από τη στήλη. Το ηλεκτρικό σήμα του ανιχνευτή προκύπτει με τη μέτρηση κάποιας ιδιότητας των διαλυμένων ουσιών μόνων τους ή και της κινητής φάσης μαζί. Για παράδειγμα, ο δείκτης διαθλάσεως είναι μια ιδιότητα τόσο των διαλυμένων ουσιών, όσο και της κινητής φάσης, ενώ η απορρόφηση του φωτός, κατά κύριο λόγο των διαλυμένων ουσιών μόνο.

Τα σημαντικά χαρακτηριστικά ενός HPLC ανιχνευτή είναι:

α) Η ευαισθησία, β) η γραμμικότητα, γ) η εκλεκτικότητα του ανιχνευτή, δ) ο θόρυβος και μετατόπιση σήματος, ε) ο νεκρός όγκος του ανιχνευτή, στ) η ταχύτητα απόκρισης και ζ) η μη καταστροφή του δείγματος.

Τα είδη των χρησιμοποιούμενων ανιχνευτών είναι τα εξής:

I) Ανιχνευτές UV-VIS. Είναι οι κατ'εξοχήν χρησιμοποιούμενοι ανιχνευτές, στην υγρή χρωματογραφία. Η αρχή λειτουργίας τους στηρίζεται στη διέλευση της κινητής φάσης, που εξέρχεται από την αναλυτική στήλη μέσα από μικρή κυψελίδα, στην οποία προσπίπτει δέσμη ακτίνων ενός UV-VIS φασματοφωτόμετρου.

II) Ανιχνευτές φθορισμού. Κατάλληλες για ανίχνευση με φθορισμό, είναι ουσίες που εκπέμπουν σημαντικό ποσοστό της ακτινοβολίας που έχουν απορροφήσει. Οι ανιχνευτές φθορισμού είναι 2 με 3 τάξεις μεγέθους πιο ευαίσθητοι από τους ανιχνευτές UV, ενώ παρουσιάζουν μεγάλη εκλεκτικότητα, αφού οι περισσότερες ουσίες δε φθορίζουν.

III) Ηλεκτροχημικοί ανιχνευτές. Αυτοί οι ανιχνευτές, μετράνε είτε την αγωγιμότητα της κινητής φάσης (ανιχνευτές αγωγιμότητας) ή το ρεύμα που σχετίζεται με την οξείδωση ή την αναγωγή του δείγματος (αμπερομετρικοί ή κουλομετρικοί ανιχνευτές).

IV) Ανιχνευτές δείκτη διαθλάσεως. Οι ανιχνευτές αυτοί καταγράφουν τη διαφορά του δείκτη διαθλάσεως (refractive index), μεταξύ της κινητής φάσης κατά την έξοδο της από την αναλυτική στήλη και της καθαρής μορφής της, όπως δηλ. είναι πριν φτάσει στο σύστημα έγχυσης. Με την έννοια αυτή, στερούνται εκλεκτικότητας και επιπλέον παρουσιάζουν μικρή ευαισθησία της τάξεως του 10⁻⁶g/ml.

V) Ανιχνευτές φασματομετρίας μάζας. Ο προσδιορισμός με φασματομετρία μάζας (mass spectrometry, MS), εκτός από την εύρεση της ισχύος κατακράτησης και της συγκέντρωσης μιας ουσίας, μπορεί να μας δώσει ταυτόχρονα καθοριστικές πληροφορίες, σχετικά με την ταυτότητα της.

ΠΕΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Σκοπός της μελέτης

Όπως ήδη έχει αναφερθεί σε προηγούμενες παραγράφους τα νιτρικά ιόντα που συσσωρεύονται σε ορισμένα φυτά αποτελούν επιβαρυντικό παράγοντα της υγείας του ανθρώπου και των θηλαστικών που τρέφονται με τα φυτά αυτά. Επίσης αναφέρθηκαν πολλοί από τους μέχρι τώρα γνωστούς παράγοντες που μπορεί να επηρεάζουν τη συσσώρευση νιτρικών ιόντων στα φυτά, μεταξύ των οποίων η εφαρμογή αζωτούχων λιπασμάτων και γεωργικών φαρμάκων. Σκοπός της παρούσης εργασίας ήταν η μελέτη της συγκέντρωσης νιτρικών ιόντων σε φρούτα και λαχανικά συμβατικής και βιολογικής καλλιέργειας και εύρεση τυχόν διαφορών μεταξύ των δύο τεχνικών καλλιέργειας. Επίσης ένας δευτερεύον στόχος της εργασίας ήταν η εύρεση του επιπέδου συγκέντρωσης νιτρικών σε γεωργικά προϊόντα όπως το σταφύλι ή η πατάτα τα οποία δεν ανήκουν στα λεγόμενα φυλλώδη λαχανικά (για τα οποία είναι γνωστό ότι υπάρχει πρόβλημα νιτρικών) και για τον λόγο αυτό δεν αποτελούν αντικείμενο πολλών μελετών παρακολούθησης των συγκεντρώσεων τους σε νιτρικά (monitoring).

Υλικά και Μέθοδοι

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν σταφύλι, ντομάτα, σπανάκι, αγγούρι, πατάτα, πιπεριά συμβατικής και βιολογικής καλλιέργειας. Η καταγωγή τους αναφέρεται παρακάτω αναλυτικότερα. Τα δείγματα είχαν ομογενοποιηθεί σε πούλπα και ήταν συσκευασμένα σε πλαστικά σακουλάκια στους 0C.

Η μέθοδος που ακολουθήθηκε εφαρμόζεται στο Βέλγιο αλλά και σε άλλες ευρωπαϊκές χώρες και καθορίζεται από την Dir 79/700/EEC.

Αντιδραστήρια και αναλώσιμα

- Κύπελλα
- Μεθανόλη(MeOH) καθαρότητας HPLC.
- Νερό (water) καθαρότητας HPLC.

- Πρότυπο αντιδραστήριο KNO_3 .
- Διηθητικό χαρτί τύπου Whatman.
- Φίλτρα τύπου acrodise 0.45 μm .

Συσκευές

- Ζυγός αναλυτικός
- Ζυγός φαρμακευτικός
- Κωνικές φιάλες των 250 ml.
- Προχοίδες των 5 κ 10 ml.
- Χωνιά
- Συσκευή HPLC-Στήλη C 18. 5 μm 150x4,6
C 18. 5 μm 10x4,6
VV derrection at 220nm
- mobile phase: 0,1% tetrabutylammoniumhydrogensulfate.
- Ηλεκτρικό Shaker.

Προετοιμασία δειγμάτων

Τα δείγματα τα οποία ήταν ομογενοποιημένα σε πούλπα τα τοποθετήσαμε σε γυάλινα ποτήρια ώστε να ξεπαγώσουν, αφού τα βγάλαμε από τον καταψύκτη. Έπειτα λάβαμε από κάθε δείγμα, ποσότητα ίση με 5g και τη μεταφέραμε ποσοτικά σε κωνική φιάλη των 250 ml. με 100 ml εξουδετερωμένου διαλύματος μεθανόλης (MEOH) :νερού (H_2O) καθαρότητας HPLC σε αναλογία (1:1). Σκεπάσαμε το στόμιο της κωνικής με παραφίνη και τοποθετήσαμε τη φιάλη στο Shaker για 30 min. στις 150στρ/min προκειμένου να έχουμε εκχύλιση νιτρικών ιόντων από το διάλυμα. MEOH:H₂O. Ύστερα, το διάλυμα που υπήρχε στην κωνική φιάλη το διηθήσαμε και συλλέξαμε το διήθημα σε πλαστικά ποτηράκια. Πριν γίνει η ανάλυση του παραπάνω διηθήματος στη συσκευή HPLC αυτό καθαρίστηκε περαιτέρω από αιρούμενα σωματίδια μέσω φίλτρου τύπου acrodise 0,45 μm .

Με τη χρήση του προτύπου αντιδραστηρίου KNO_3 κατασκευάστηκε μια γραμμή αναφοράς. Το πρότυπο διάλυμα χρωματογραφήθηκε στη συσκευή HPLC με τον ίδιο τρόπο και υπό όμοιες συνθήκες όπως ακριβώς και τα διαλύματα δειγμάτων. Μέσω της γραμμής αναφοράς υπολογίστηκε η ποσότητα NO_3 στο καθένα από τα δείγματα που αναλύθηκαν. Τα

αποτελέσματα που εξάγονται από τη συσκευή HPLC έπειτα από το τέλος της ανάλυσης είναι μg NO_3/ml . Όμως τα τελικά αποτελέσματα ανάγονται σε mg/kg νωπού βάρους προϊόντος.

Σε κάθε δείγμα πούλπας προϊόντος, έγιναν με τον παραπάνω τρόπο, 3 αναλύσεις σε υποδείγματα των 5g το καθένα τα οποία χρησιμοποίησαν σαν επαναλήψεις και βγήκε ο μέσος όρος .

Αποτελέσματα - Συζήτηση

Όπως θα παρατηρήσουμε από τα παρακάτω διαγράμματα τα δείγματα της συμβατικής και της βιολογικής καλλιέργειας είχαν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ως προς το ποσό των νιτρικών ιόντων. Στα διαγράμματα, απεικονίζεται η σχέση ανάμεσα στο είδος των δειγμάτων (από συμβατικές ή βιολογικές καλλιέργειες) και στην ενυπάρχουσα συγκέντρωση των νιτρικών αλάτων σε αυτά. Οι τιμές νιτρικών που αναφέρονται στα διαγράμματα είναι ο μέσος όρος των τριών ξεχωριστών αναλύσεων (επαναλήψεων) που έγιναν για κάθε δείγμα.

Στο διάγραμμα 1 φαίνεται ότι το εύρος των τιμών της συγκέντρωσης νιτρικών ιόντων στο σταφύλι της συμβατικής καλλιέργειας κυμαίνεται από $32\text{mg}/\text{Kg}$ έως $100\text{mg}/\text{Kg}$. Αντίθετα, στα δείγματα σταφυλιού βιολογικής καλλιέργειας το εύρος των τιμών τους κυμαίνεται σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα, δηλ. από $6\text{mg}/\text{Kg}$ έως $10,5\text{mg}/\text{Kg}$ προϊόντος.

Στο διάγραμμα 2 φαίνεται ότι το εύρος των τιμών της συγκέντρωσης νιτρικών ιόντων στη τομάτα της συμβατικής καλλιέργειας κυμαίνεται από $65,3\text{mg}/\text{Kg}$ έως $245,3\text{mg}/\text{Kg}$. Αντίθετα, στα δείγματα τομάτας βιολογικής καλλιέργειας το εύρος των τιμών τους κυμαίνεται σε χαμηλότερα επίπεδα, δηλ. από $6,67\text{mg}/\text{Kg}$ - $10,33\text{mg}/\text{Kg}$.

Στο διάγραμμα 3 φαίνεται ότι το εύρος των τιμών της συγκέντρωσης νιτρικών ιόντων στη πατάτα της συμβατικής καλλιέργειας κυμαίνεται από $151,33\text{mg}/\text{Kg}$ έως $408,67\text{mg}/\text{Kg}$. Αντίθετα, στα δείγματα πατάτας βιολογικής καλλιέργειας το εύρος των τιμών τους κυμαίνεται σε χαμηλότερα επίπεδα, δηλ. από $48,67\text{mg}/\text{Kg}$ - $107,33\text{mg}/\text{Kg}$.

Στο διάγραμμα 4 φαίνεται ότι το εύρος των τιμών της συγκέντρωσης νιτρικών ιόντων στο αγγούρι της συμβατικής καλλιέργειας κυμαίνεται από $285,53\text{mg}/\text{Kg}$ έως $552,93\text{mg}/\text{Kg}$. Αντίθετα, στα δείγματα αγγουριού βιολογικής καλλιέργειας το εύρος των τιμών τους κυμαίνεται σε χαμηλότερα επίπεδα, δηλ. από $80,13\text{mg}/\text{Kg}$ - $129,93\text{mg}/\text{Kg}$.

Στο διάγραμμα 5 φαίνεται ότι το εύρος των τιμών της συγκέντρωσης νιτρικών ιόντων στο σπανάκι της συμβατικής καλλιέργειας κυμαίνεται από 1856,67mg/Kg εως 2360mg/Kg. Δεν υπήρχαν όμως δείγματα σπανακιού βιολογικής καλλιέργειας για σύγκριση..

Στο διάγραμμα 6 φαίνεται ότι το εύρος των τιμών της συγκέντρωσης νιτρικών ιόντων στη πιπεριά της βιολογικής καλλιέργειας κυμαίνεται από 98,67mg/Kg εως 112mg/Kg. Εδώ αντίθετα, δεν υπήρχαν δείγματα σπανακιού συμβατικής καλλιέργειας πιπεριάς για σύγκριση και τα αποτελέσματα όπως και εκείνα του σπανακιού αναφέρονται ενδεικτικά.

Συμπεράσματα

Όσον αφορά τα δείγματα σταφυλιών, τομάτα πατάτα ,και αγγούρια διαφόρων ποικιλιών και τοποθεσιών καλλιέργειας φαίνεται καθαρά ότι σε αυτή που προέρχονται από συμβατική καλλιέργεια ,οι συγκεντρώσεις των νιτρικών ήταν σε όλες τις περιπτώσεις πολύ υψηλότερες από εκείνες των δειγμάτων που προέρχονται από βιολογική καλλιέργεια..

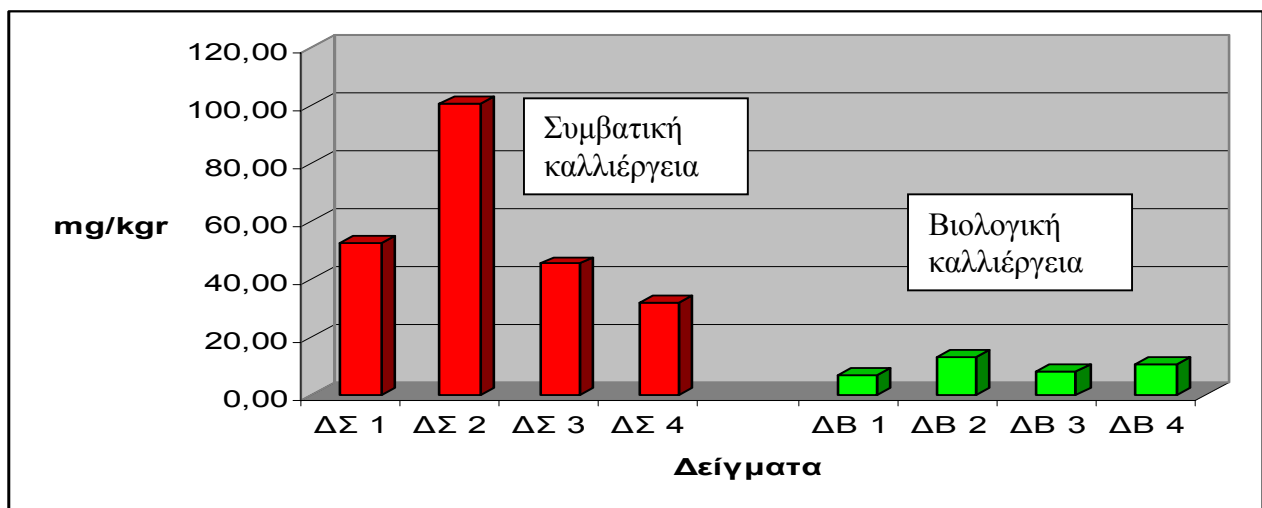
Στη συμβατική καλλιέργεια στο σταφύλι η μεγαλύτερη συγκέντρωση νιτρικών που μετρήθηκε στην παρούσα εργασία είναι της τάξης των 100mg/kg,στην τομάτα 250mg/kg,στην πατάτα 400mg/kg,στο αγγούρι 550mg/kg.Οι συγκεντρώσεις αυτές είναι πολύ μικρότερες σε σχέση με εκείνης των δειγμάτων σπανακιού συμβατικής καλλιέργειας που πλησιάζει σε μία περίπτωση τα 2400mg/kg νωπού βάρους προϊόντος.

Σε βιολογική καλλιέργεια στο σταφύλι και της τομάτας η συγκέντρωση νιτρικών είναι μηδαμινή αλλά στην πατάτα στο αγγούρι και στην πιπεριά οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις που μετρήθηκαν είναι της τάξης των 100-120mg/kg νωπού βάρους.

Πρέπει γενικά να δοθεί προσοχή στην συγκέντρωση νιτρικών στην πατάτα και στο αγγούρι αλλά και στη τομάτα γιατί φαίνεται να έχουν την τάση να συσσωρεύουν νιτρικά πέραν του αναμενόμενου (ιδιαίτερα βέβαια σε συμβατική καλλιέργεια)δεδομένου ότι σε αντίθεση με τα φυλλώδη λαχανικά, τα προϊόντα αυτά καταναλώνονται σε μεγάλη ποσότητα και σχεδόν καθημερινά από μεγάλη ομάδα πληθυσμού και ιδιαίτερα τα παιδιά(πατάτες).

Πίνακας & Διάγραμμα 1: Συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων σε δείγματα σταφυλιού συμβατικής και βιολογικής καλλιέργειας

Δείγματα	μg NO ₃ /ml αναλυτικού δείγματος (Μ.Ο. 3 επαναλήψεων)	mgNO ₃ /kg Νωπού βάρους προϊόντος (Μ.Ο. 3 επαναλήψεων)
Συμβατική καλλιέργεια		
ΔΣ 1	2,63	52,67
ΔΣ 2	5,03	100,67
ΔΣ 3	2,27	45,33
ΔΣ 4	1,60	32,00
Βιολογική καλλιέργεια		
ΔΒ 1	0,34	6,80
ΔΒ 2	0,66	13,27
ΔΒ 3	0,42	8,33
ΔΒ 4	0,54	10,80



ΔΣ1 : Σαββατιανό (Μαρκόπουλο – Μεσόγεια Αν. Αττική 17-9-2002)

ΔΣ2 : Cabernet Sauvignon (Ν.Δράμα 17-9-2002)

ΔΣ3 : (Ν. Ρόδος Δ.Δ.Κρητινίας 17-10-2002)

ΔΣ4 : Palleri (Ιταλία 1-11-2002) * Επέμβαση με parathion methyl :0.04 mg/kg

ΔΒ1 : Ροδίτης (Ν. Αχαΐα Μαμοσιά Αιγιαλείας 27-9-2002)

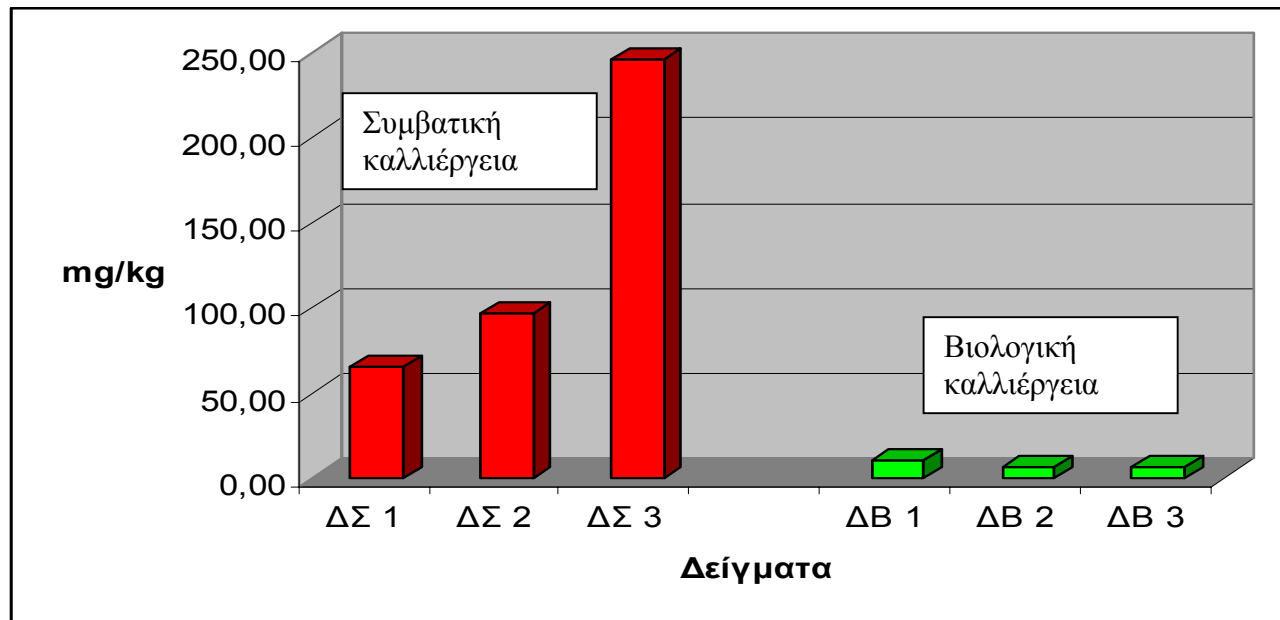
ΔΒ2 : Ροδίτης (Ν. Αχαΐα Μαμοσιά Αιγιαλείας 1-10-2002)

ΔΒ3 : Ροδίτης (Ν. Αχαΐα Μαμοσιά Αιγιαλείας 1-10-2002)

ΔΒ4 : Μοσχάτο (Ν. Σάμο Βουρλιώτες Σάμου 1-10-2002)

Πίνακας&Διάγραμμα 2: Συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων σε δείγματα τομάτας συμβατικής και βιολογικής καλλιέργειας

Δείγματα	μg NO ₃ /ml αναλυτικού δείγματος (Μ.Ο. 3 επαναλήψεων)	mgNO ₃ /kg Νωπού βάρους προϊόντος (Μ.Ο. 3 επαναλήψεων)
Συμβατική καλλιέργεια		
ΔΣ 1	3,27	65,33
ΔΣ 2	4,85	97,07
ΔΣ 3	12,27	245,33
Βιολογική καλλιέργεια		
ΔΒ 1	0,52	10,33
ΔΒ 2	0,33	6,67
ΔΒ 3	0,34	6,87



ΔΣ1 : Ρόδος (Λ. Αγορά 16-9-2002)

ΔΣ2 : Κως (3-1-2003)

ΔΣ3 : Κως (3-1-2003) * Επέμβαση με chlorothalonyl 0.08 mg/kg

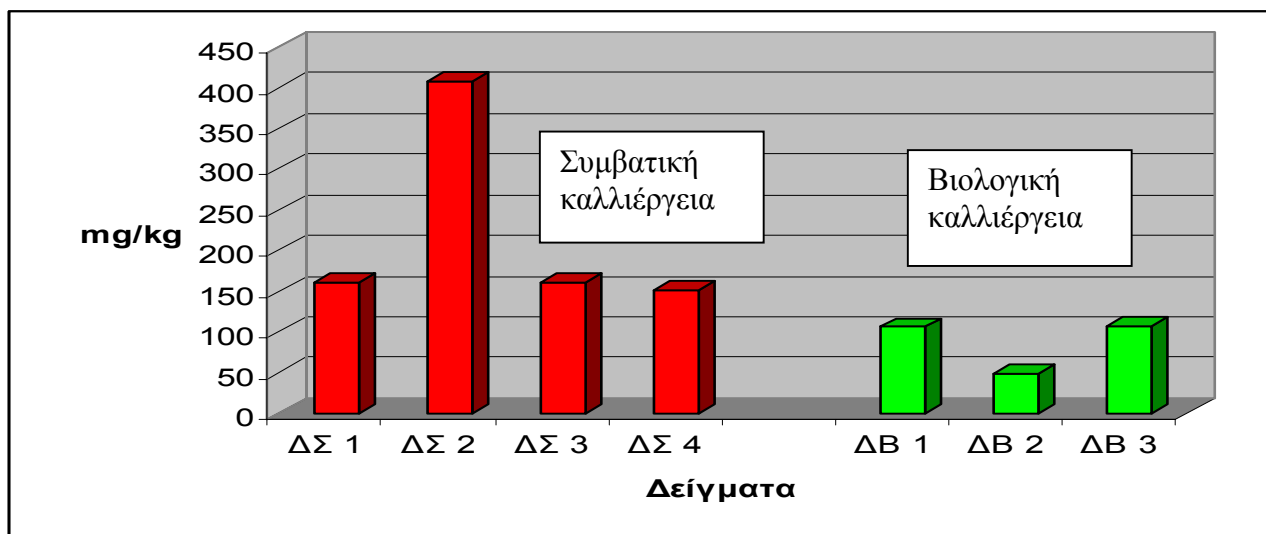
ΔΒ1 : Bella Dona (Ν. Λάρισα 30-9-2002)

ΔΒ2 : Ρόμα (Ν. Θεσ/νικη από κατάστημα βιολογικών προϊόντων 20-9-2002)

ΔΒ3 : Ν. Καρδίτσα Κόμπελος Φαναριού Καρδίτσας (10-10-2002)

Πίνακας&Διάγραμμα 3: Συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων σε δείγματα πατάτας συμβατικής και βιολογικής καλλιέργειας

Δείγματα	μg NO ₃ /ml αναλυτικού δείγματος (Μ.Ο. 3 επαναλήψεων)	mgNO ₃ /kg Νωπού βάρους προϊόντος (Μ.Ο. 3 επαναλήψεων)
Συμβατική καλλιέργεια		
ΔΣ 1	8,07	161,33
ΔΣ 2	20,43	408,67
ΔΣ 3	8,03	160,67
ΔΣ 4	7,57	151,33
Βιολογική καλλιέργεια		
ΔΒ 1	5,30	106,00
ΔΒ 2	2,43	48,67
ΔΒ 3	5,37	107,33



ΔΣ1 : Περιφερειακό κέντρο Πειραιά (17-12-2002)

ΔΣ2 : Περιφερειακό κέντρο Πειραιά (17-12-2002)

ΔΣ3 : Περιφερειακό κέντρο Πειραιά (17-12-2002)

ΔΣ4 : Περιφερειακό κέντρο Πειραιά (17-12-2002)

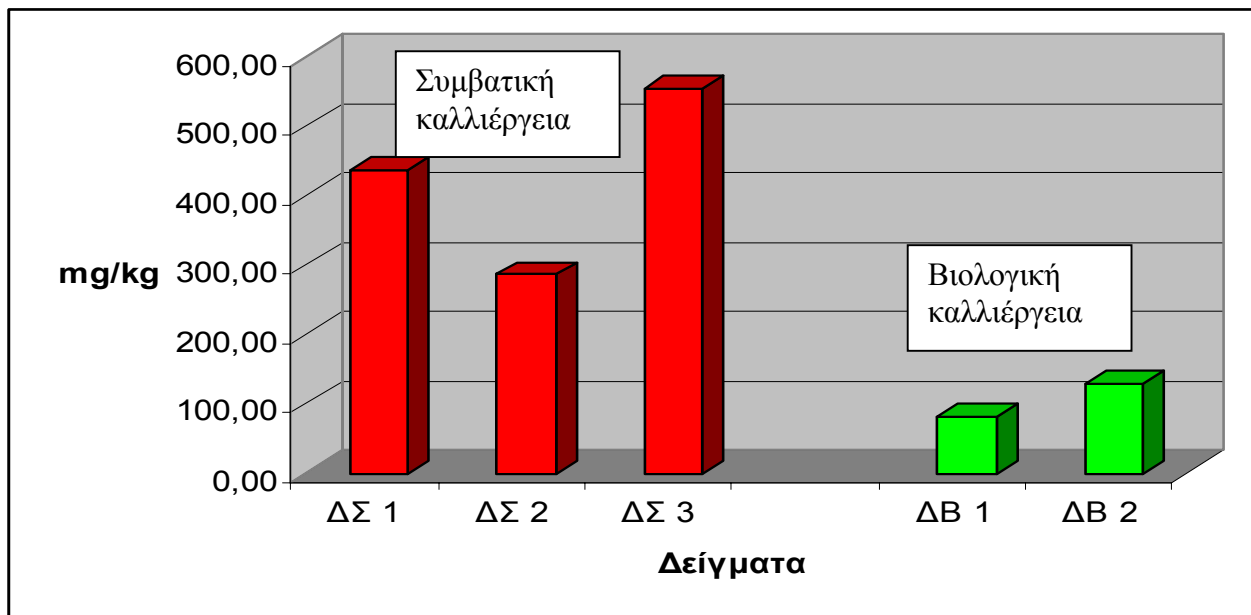
ΔΒ1 : Σπουίτα Ν. Πελλα Σκήδρα (20-9-2002)

ΔΒ2 : Φόμπολα Ν. Σερρών Ανω Βροντά (30-9-2002) *Από κατάστημα βιολογικών προϊόντων

ΔΒ3 : Φόμπολα Ν. Σερρών Ανω Βροντά (30-9-2002) *Από κατάστημα βιολογικών προϊόντων

Πίνακας&Διάγραμμα 4: Συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων σε δείγματα αγγουριού συμβατικής και βιολογικής καλλιέργειας

Δείγματα	μg NO ₃ /ml αναλυτικού δείγματος (Μ.Ο. 3 επαναλήψεων)	mgNO ₃ /kg Νωπού βάρους προϊόντος (Μ.Ο. 3 επαναλήψεων)
Συμβατική καλλιέργεια		
ΔΣ 1	23,46	435,87
ΔΣ 2	14,28	285,53
ΔΣ 3	27,65	552,93
Βιολογική καλλιέργεια		
ΔΒ 1	4,01	80,13
ΔΒ 2	6,50	129,93



ΔΣ1 : Ν. Ρόδος Δ.Δ. Παραδεισίου (1-11-2002)

ΔΣ2 : Κως Μεσαριά Δ.Δ. Ασφενδίου (2-10-2002) * Λαϊκή αγορά

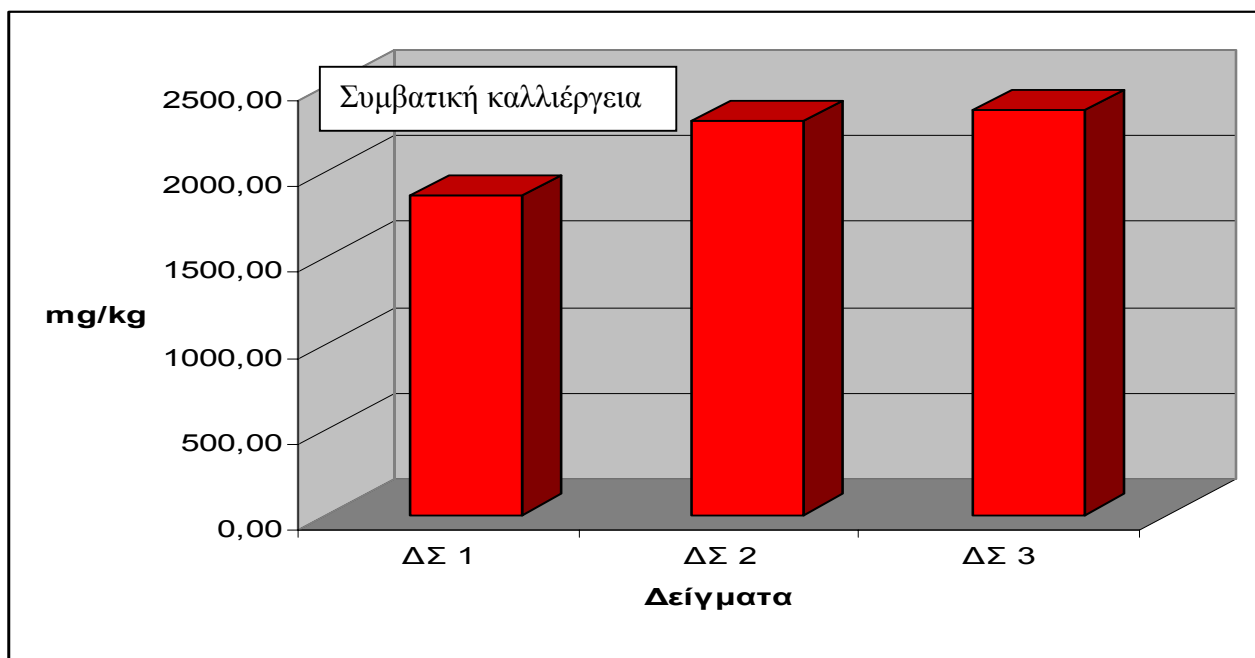
ΔΣ3 : Κως Δήμου Δικαίου από κατάστημα (2-10-2002)

ΔΒ1 : Λόρα Ν Λαρίσης (30-9-2002)

ΔΒ2 : Λόρα Ν Λαρίσης (30-9-2002)

Πίνακας&Διάγραμμα 5: Συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων σε δείγματα σπανακιού συμβατικής καλλιέργειας

Δείγματα	μg NO ₃ /ml αναλυτικού δείγματος (Μ.Ο. 3 επαναλήψεων)	mgNO ₃ /kg Νωπού βάρους προϊόντος (Μ.Ο. 3 επαναλήψεων)
Συμβατική καλλιέργεια		
ΔΣ 1	92,83	1856,67
ΔΣ 2	114,67	2293,33
ΔΣ 3	118,00	2360,00



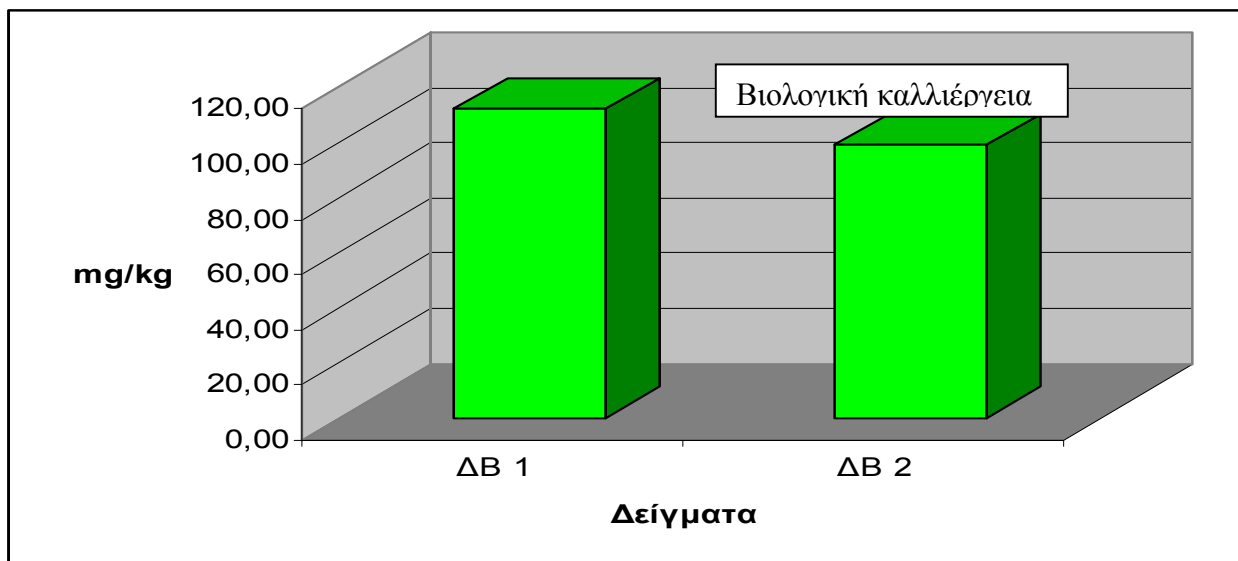
ΔΣ1 : Κως (2-12-2002)

ΔΣ2 : Κως (2-12-2002)

ΔΣ3 : Κως (2-12-2002)

Πίνακας&Διάγραμμα 6: Συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων σε δείγματα πιπεριάς βιολογικής καλλιέργειας

Δείγματα	μg NO ₃ /ml αναλυτικού δείγματος (Μ.Ο. 3 επαναλήψεων)	mgNO ₃ /kg Νωπού βάρους προϊόντος (Μ.Ο. 3 επαναλήψεων)
Βιολογική καλλιέργεια		
ΔΒ 1	5,60	112,00
ΔΒ 2	4,93	98,67



ΔΒ1 : Γλυκές κόκκινες Ν. Καρδίτσα Κομπελος Φαναριού Καρδίτσας (10-10-2002)

ΔΒ2 : Φλωρίνης Βόλος (17-10-2002)

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- *Cantliffe D.J. 1972 a. Nitrate accumulation in spinach grown under different light intensities. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 97(2):152-154.
- *Cantliffe D.J. 1972 b. Nitrate accumulation in vegetable crops aw affected by photoperiod and light duration. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 97(4):414-418.
- *Cantliffe D.J. 1972 c. Nitrate accumulation in spinach grown under different temperatures. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 97(5):674-767.
- *Cantliffe D.J. (1973)-Nitrate accumulation in table beets and spinach as affected by Nitrogen, Phosphorus and Potassium, Nutrition and Light intensity-*Agronomy Journal* 65:563-565.
- *Διαμαντίδης Γ.Χ., 1990-Εισαγωγή στη βιοχημεία-University Studio Press.
- *Δροσόπουλος Ι.Β. 1992-Στοιχεία Ανόργανης διατροφής των φυτών-Γεωργικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- *Fernades M.S., Rossiello R.O.P. 1995-Mineral Nitrogen in Plant Physiology and Plant Nutrition-*Critical reviews in Plant Sciences*, 14(2):111-148.
- *Granstedt R.C. 1982. Identification on the leaf vacuole as a major Nitrate storage pool. *Plant physiol.* 70:410-413.
- *Hall D.O., Scurlock J.M.O., Bolhar H.R., Leegood R.C., Long S.P. (1993)-Photosynthesis and Production in a Changing environment-*Chapman & Hall*.
- *Λάζος Ε.Σ., 1992, Επεξεργασία Τροφίμων Ι.
- *Maynard D.N., Barker A.V., Minotti P.L., Peck N.H. (1976)-Nitrate Accumulation in Vegetables, *Adv. Agron.* 28, 71-118.
- *Μηλιάδης Γ.Ε., 1995. Υγρή Χρωματογραφία.
- *Νιαβής Κ.Α., 1981. Μαθήματα φυσιολογίας φυτών. Ανόργανος διατροφή φυτών. Φωτοσύνθεση. Αθήνα, σελ. 56-79.
- *Ολύμπιος Χ.Μ., 1987. Στοιχεία γενικής και ειδικής λαχανοκομίας. Αθήνα, σελ. 27-32.
- *Πασπάτης Ε.Α. 1990. Επίδραση εξωγενούς εφαρμογής γιββερελικού οξέος (GA3) στην παραγωγή σπανακιού και την περιεκτικότητα του σε νιτρικά (NO₃). *Ζιζανιολογία* 2(3):161-166.

*Quince J.P.,Dvorak V., 1980.Le dosage des nitrates dans les legumes,les plantes continentaires et les terres par ionometrie et par chromatographie gaz-liquide.*Revue Suisse Vitic.Arboric.Hortic.12(1) :7-20.*

*Scalfe A., Ferreira S., Turner M.K., (1986)-Effect of Nitrogen Form on the Growth and Nitrate Concentration of Lettuce.*Plant and Soil,94:3-16.*

*Siciliano J.,Krulick S.,Heisler E.G.,Schwartz J.H.,White J.W.,1975. Nitrate and nitrite content of some fresh and processed market vegetables.*J.Agric.Food Chem.,23(3):461-464.*

*Taiz L.,Zieger E.,1991-Plant physiology-*The Benjamin/Cummings Publishing Company New York.*

ПАРАРТИМА

Συγκέντρωση νιτρικών ιόντων σε σταφύλι

Επαναλήψεις

Επεμβάσεις	I		II		III		Μ.Ο	
	α	β	α	β	α	β	α	β
Συμβατική καλλιέργεια								
ΔΣ 1	2,50	50,00	2,80	56,00	2,60	52,00	2,63	52,67
ΔΣ 2	5,20	104,00	4,80	96,00	5,10	102,00	5,03	100,67
ΔΣ 3	2,40	48,00	2,20	44,00	2,20	44,00	2,27	45,33
ΔΣ 4	1,60	32,00	1,60	32,00	1,60	32,00	1,60	32,00
Βιολογική καλλιέργεια								
ΔΒ 1	0,34	6,80	0,35	7,00	0,33	6,60	0,34	6,80
ΔΒ 2	0,66	13,20	0,65	13,00	0,68	13,60	0,66	13,27
ΔΒ 3	0,40	8,00	0,44	8,80	0,41	8,20	0,42	8,33
ΔΒ 4	0,52	10,40	0,54	10,80	0,56	11,20	0,54	10,80

ΔΣ1 : Σαββατιανό (Μαρκόπουλο – Μεσόγεια Αν. Αττική 17-9-2002)

ΔΣ2 : Cabernet Sauvignon (Ν.Δράμα 17-9-2002)

ΔΣ3 : (Ν. Ρόδος Δ.Δ.Κρητινίας 17-10-2002)

ΔΣ4 : Palleri (Ιταλία 1-11-2002) * Επέμβαση με parathion methyl :0.04 mg/kg

ΔΒ1 : Ροδίτης (Ν. Αχαΐα Μαμοσιά Αιγιαλείας 27-9-2002)

ΔΒ2 : Ροδίτης (Ν. Αχαΐα Μαμοσιά Αιγιαλείας 1-10-2002)

ΔΒ3 : Ροδίτης (Ν. Αχαΐα Μαμοσιά Αιγιαλείας 1-10-2002)

ΔΒ4 : Μοσχάτο (Ν. Σάμο Βουρλιώτες Σάμου 1-10-2002)

α : μg NO₃/ml αναλυτικού δείγματος (Μ.Ο. 3 επαναλήψεων)

β : mgNO₃/kg Νωπού βάρους προϊόντος (Μ.Ο. 3 επαναλήψεων)

Συγκέντρωση νιτρικών ιόντων σε τομάτα

Επαναλήψεις

Επεμβάσεις	I		II		III		M.O	
	α	β	α	β	α	β	α	β
Συμβατική καλλιέργεια								
ΔΣ 1	3,26	65,20	3,41	68,20	3,13	62,60	3,27	65,33
ΔΣ 2	5,30	106,00	6,49	129,80	2,77	55,40	4,85	97,07
ΔΣ 3	12,30	246,00	11,90	238,00	12,60	252,00	12,27	245,33
Βιολογική καλλιέργεια								
ΔΒ 1	0,64	12,80	0,47	9,40	0,44	8,80	0,52	10,33
ΔΒ 2	0,38	7,60	0,31	6,20	0,31	6,20	0,33	6,67
ΔΒ 3	0,43	8,60	0,31	6,20	0,29	5,80	0,34	6,87

ΔΣ1 : Ρόδος (Λ. Αγορά 16-9-2002)

ΔΣ2 : Κως (3-1-2003)

ΔΣ3 : Κως (3-1-2003) * Επέμβαση με chlorothalonyl 0.08 mg/kg

ΔΒ1 : Bella Dona (Ν. Λάρισα 30-9-2002)

ΔΒ2 : Ρόμα (Ν. Θεσ/νικη από κατάστημα βιολογικών προϊόντων 20-9-2002)

ΔΒ3 : Ν. Καρδίτσα Κόμπελος Φαναριού Καρδίτσας (10-10-2002)

α : μg NO₃/ml αναλυτικού δείγματος (Μ.Ο. 3 επαναλήψεων)

β : mgNO₃/kg Νωπού βάρους προϊόντος (Μ.Ο. 3 επαναλήψεων)

Συγκέντρωση νιτρικών ιόντων σε πατάτα

Επαναλήψεις

Επεμβάσεις	I		II		III		M.O	
	α	β	α	β	α	β	α	β
Συμβατική καλλιέργεια								
ΔΣ 1	8,10	162,00	8,30	166,00	7,80	156,00	8,07	161,33
ΔΣ 2	20,30	406,00	20,70	414,00	20,30	406,00	20,43	408,67
ΔΣ 3	8,10	162,00	7,90	158,00	8,10	162,00	8,03	160,67
ΔΣ 4	8,10	162,00	7,90	158,00	6,70	134,00	7,57	151,33
Βιολογική καλλιέργεια								
ΔΒ 1	5,30	106,00	5,30	106,00	5,30	106,00	5,30	106,00
ΔΒ 2	2,50	50,00	2,40	48,00	2,40	48,00	2,43	48,67
ΔΒ 3	5,40	108,00	5,30	106,00	5,40	108,00	5,37	107,33

ΔΣ1 : Περιφερειακό κέντρο Πειραιά (17-12-2002)

ΔΣ2 : Περιφερειακό κέντρο Πειραιά (17-12-2002)

ΔΣ3 : Περιφερειακό κέντρο Πειραιά (17-12-2002)

ΔΣ4 : Περιφερειακό κέντρο Πειραιά (17-12-2002)

ΔΒ1 : Σπούιτα Ν. Πελλα Σκήδρα (20-9-2002)

ΔΒ2 : Φόμπολα Ν. Σερρών Ανω Βροντά (30-9-2002) *Από κατάστημα βιολογικών προϊόντων

ΔΒ3 : Φόμπολα Ν. Σερρών Ανω Βροντά (30-9-2002) *Από κατάστημα βιολογικών προϊόντων

α : $\mu\text{g NO}_3/\text{ml}$ αναλυτικού δείγματος (Μ.Ο. 3 επαναλήψεων)

β : mgNO_3/kg Νωπού βάρους προϊόντος (Μ.Ο. 3 επαναλήψεων)

Συγκέντρωση νιτρικών ιόντων σε αγγούρι

Επαναλήψεις

Επεμβάσεις	I		II		III		M.O	
	α	β	α	β	α	β	α	β
Συμβατική καλλιέργεια								
ΔΣ 1	23,65	473,00	23,32	366,40	23,41	468,20	23,46	435,87
ΔΣ 2	14,41	288,20	14,56	291,20	13,86	277,20	14,28	285,53
ΔΣ 3	27,90	558,00	27,22	544,40	27,82	556,40	27,65	552,93
Βιολογική καλλιέργεια								
ΔΒ 1	4,32	86,40	3,90	78,00	3,80	76,00	4,01	80,13
ΔΒ 2	6,00	120,00	6,75	135,00	6,74	134,80	6,50	129,93

ΔΣ1 : Ν. Ρόδος Δ.Δ. Παραδεισίου (1-11-2002)

ΔΣ2 : Κως Μεσαριά Δ.Δ. Ασφενδίου (2-10-2002) * Λαϊκή αγορά

ΔΣ3 : Κως Δήμου Δικαίου από κατάστημα (2-10-2002)

ΔΒ1 : Λόρα Ν Λαρίσης (30-9-2002)

ΔΒ2 : Λόρα Ν Λαρίσης (30-9-2002)

α : $\mu\text{g NO}_3/\text{ml}$ αναλυτικού δείγματος (Μ.Ο. 3 επαναλήψεων)

β : mgNO_3/kg Νωπού βάρους προϊόντος (Μ.Ο. 3 επαναλήψεων)

Συγκέντρωση νιτρικών ιόντων σε σπανάκι

Επαναλήψεις

Επεμβάσεις	I		II		III		M.O	
	α	β	α	β	α	β	α	β
Συμβατική καλλιέργεια								
ΔΣ 1	83,30	1666,00	84,60	1692,00	110,60	2212,00	92,83	1856,67
ΔΣ 2	116,90	2338,00	115,70	2314,00	111,40	2228,00	114,67	2293,33
ΔΣ 3	118,00	2360,00	123,10	2462,00	112,90	2258,00	118,00	2360,00

ΔΣ1 : Κως (2-12-2002)

ΔΣ2 : Κως (2-12-2002)

ΔΣ3 : Κως (2-12-2002)

Συγκέντρωση νιτρικών ιόντων σε πιπεριά

Επαναλήψεις

Επεμβάσεις	I		II		III		M.O	
	α	β	α	β	α	β	α	β
Βιολογική καλλιέργεια								
ΔΒ 1	6,30	126,00	5,40	108,00	5,10	102,00	5,60	112,00
ΔΒ 2	5,10	102,00	4,80	96,00	4,90	98,00	4,93	98,67

ΔΒ1 : Γλυκές κόκκινες Ν. Καρδίτσα Κομπελος Φαναριού Καρδίτσας (10-10-2002)

ΔΒ2 : Φλωρίνης Βόλος (17-10-2002)

α : $\mu\text{g NO}_3/\text{ml}$ αναλυτικού δείγματος (Μ.Ο. 3 επαναλήψεων)

β : mgNO_3/kg Νωπού βάρους προϊόντος (Μ.Ο. 3 επαναλήψεων)