



Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου

Εργαστήριο Γενικής Χημείας

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών: «Επιστήμη & Τεχνολογία Τροφίμων & Διατροφή του Ανθρώπου»

Κατεύθυνση VI: ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Προσδιορισμός του σεληνίου σε φυτά της οικογένειας *Brassicaceae*»

Μαριγώ Ι. Αδαμοπούλου



Επιβλέπουσα Καθηγήτρια Βιολέττα Κωνσταντίνου

Αθήνα, 2020



Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου

Εργαστήριο Γενικής Χημείας

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών: «Επιστήμη & Τεχνολογία Τροφίμων & Διατροφή του Ανθρώπου»

Κατεύθυνση VI: ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

«Προσδιορισμός του σεληνίου σε φυτά της οικογένειας *Brassicaceae*»

«Selenium determination in *Brassicaceae* plants»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μαριγώ Ι. Αδαμοπούλου

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Καθηγήτρια ΒΙΟΛΕΤΤΑ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ – Επιβλέπουσα
Καθηγήτρια

Καθηγητής ΠΕΤΡΟΣ ΤΑΡΑΝΤΙΛΗΣ – Μέλος εξεταστικής επιτροπής

Αν. Καθηγητής ΧΡΗΣΤΟΣ ΠΑΠΠΑΣ – Μέλος εξεταστικής επιτροπής

Αθήνα, 2020

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γενικής Χημείας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών στα πλαίσια του ΠΜΣ «Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφή του Ανθρώπου» στην κατεύθυνση «Μελέτη και Αξιοποίηση Φυσικών Προϊόντων», του τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, 2017-2019.

Θέμα της εργασίας αποτελεί ο ποσοτικός προσδιορισμός του σεληνίου με φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης με την τεχνική των υδριδίων σε φυτά μπρόκολου της οικογένειας *Brassicaceae*, χωρίς και μετά τον εμπλουτισμό του υλικού θρέψης με άλατα σεληνίου.

Στο σημείο αυτό, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου, κ. Βιολέττα Κωνσταντίνου που μου ανέθεσε την εν λόγω εργασία, για τη βοήθειά της, τη στήριξη και τις πολύτιμες συμβουλές της, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η διπλωματική μου εργασία, που για μένα αποτέλεσε μία ιδιαίτερη εμπειρία.

Επίσης, ευχαριστώ ιδιαίτερα τον καθηγητή Δημήτρη Μπουράνη για την πολύτιμη βοήθεια του στην καλλιέργεια των φυτών, που πραγματοποιήθηκε υδροπονικά σε θερμοκήπιο φυτωρίου. Όπως, επίσης, ευχαριστώ θερμά τον ιδιοκτήτη του φυτωρίου που μας διέθεσε χώρο για την καλλιέργεια των φυτών και την πολίτιμη βοήθειά τους στην διεξαγωγή του πειράματος, της εταιρίας «Γεωπονική ΑΕ» στο Κορωπί Αττικής, τον κ. Ιωάννη Κώνστα καθώς επίσης τον κ. Βασίλη Σίγιαννη και τον κ. Κωνσταντίνο Παναγόπουλο, που ανταποκρίθηκαν άμεσα σε ό,τι κι αν χρειάστηκε. Επίσης, τους βοηθούς τους για την παρέμβαση στις βαριές χειρονακτικές εργασίες και την παρουσία τους οποιαδήποτε στιγμή.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή Γεώργιο Ν. Σταμάτη από το εργαστήριο ορυκτολογίας και την κ. Αναστασία Σγουμποπούλου από το εργαστηρίο Γεωργικής Υδραυλικής, για τη συνεργασία και την αμέριστη βοήθειά τους στη χώνευση των δειγμάτων με μικροκύματα.

Ευχαριστώ τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, τον καθηγητή Πέτρο Ταραντίλη και τον αναπληρωτή καθηγητή Χρήστο Παππά για τις χρήσιμες υποδείξεις τους.

Ακόμα, ευχαριστώ θερμά τον Δρ Εμμανουήλ Μπούζα μέλος ΕΔΙΠ του Εργαστηρίου Γενικής Χημείας, που συνέβαλε σημαντικά στην πορεία της εργασίας, στο τμήμα της ατομικής απορρόφησης, καθώς και για την υποστήριξή του καθόλη τη διάρκεια του πειραματικού μέρους.

Ιδιαίτερα, ευχαριστώ τη Δρ Δήμητρα Δαφερέρα, μέλος ΕΔΙΠ του Εργαστηρίου Γενικής Χημείας, για τη βοήθειά της στο κομμάτι της αέριας χρωματογραφίας καθώς και τη συνάδελφο Ειρήνη Μεσημέρη, που συνεργαστήκαμε με πολύ καλή διάθεση όπου χρειάστηκε. Επιπλέον, δεν παραλείπω να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην υποψήφια διδάκτορα Λυδία Βαλάση και Ελένη Κακούρη για τη συμβολή τους κατά τη διάρκεια των πειραμάτων.

Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω τους φίλους μου, τους συμφοιτητές αλλά και συμμαθητές μου, που ήταν δίπλα μου και με στήριξαν σε όλες τις μέχρι τώρα σπουδές μου.

Τέλος, ευχαριστώ μέσα από την καρδιά μου, τους γονείς μου και την οικογένειά μου, που με στηρίζουν όλα αυτά τα χρόνια με κάθε τρόπο και με την αγάπη τους μου δίνουν δύναμη.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το μπρόκολο είναι φυτό της οικογένειας *Brassicaceae* και περιέχει πολύτιμα φυτοχημικά συστατικά με ευεργετική δράση για τον ανθρώπινο οργανισμό. Διαφέρει από τα υπόλοιπα φυτά της ίδιας οικογένειας, λόγω της υψηλότερης περιεκτικότητας του σε θειούχες ενώσεις και ιδιαίτερα σε γλυκοζινολίτες. Επίσης, διαθέτει ενώσεις με το στοιχείο του σεληνίου (Se), όπως την σεληνοκυστεΐνη και την σεληνομεθειονίνη επειδή, σε αντίθεση με άλλα λαχανικά, έχει το πλεονέκτημα ότι απορροφά το σελήνιο μέσω της μεταβολικής οδού του θείου από το θρεπτικό υλικό που του παρέχεται.

Το σελήνιο (Se) είναι ένα απαραίτητο ιχνοστοιχείο για την καλή λειτουργία του θυρεοειδούς αδένα και συμβάλλει στην προστασία των κυττάρων από την επιβλαβή επίδραση των υπεροξειδασών. Η έλλειψη του σεληνίου από τη διατροφή επιφέρει αρνητικά αποτελέσματα για την υγεία. Εκατομμύρια άνθρωποι σε όλο τον κόσμο παρουσιάζουν έλλειψη σεληνίου, γεγονός που οφείλεται κυρίως σε διατροφικούς παράγοντες. Έτσι, η βιο-ενίσχυση των λαχανικών με σελήνιο μπορεί να αποτελέσει έναν εναλλακτικό τρόπο πρόσληψης του στοιχείου αυτού μέσω της διατροφής.

Στην παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη πραγματοποιήθηκε βιο-ενίσχυση του μπρόκολου με σελήνιο, σε συμβατική και υδροπονική καλλιέργεια υπό ελεγχόμενες συνθήκες. Η χορήγηση του Se στα φυτά έγινε σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις υπό μορφή άλατος (Na_2SeO_4). Στη συμβατική καλλιέργεια, η βιο-ενίσχυση με το διάλυμα Se έγινε σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις, 6 mM & 12 mM. Στα φυτά υδροπονικής καλλιέργειας στις συγκεντρώσεις 1,5 mM & 3 mM του διαλύματος Se (Na_2SeO_4), σε θρεπτικό υλικό παρουσία και απουσία θείου.

Μετά τη συγκομιδή των φυτών, συλλέχθηκαν τα άνθη, τα φύλλα και οι ρίζες των μπρόκολων, τα οποία λυοφιλιώθηκαν και αποθηκεύτηκαν στους -20 °C. Με την κατάλληλη προετοιμασία πραγματοποιήθηκε η μέτρηση του ολικού Se στα δείγματα της υδροπονικής και της συμβατικής καλλιέργειας, με Φασματοφωτομετρία Ατομικής Απορρόφησης με γεννήτρια υδριδίων (HG-AAS). Στην υδροπονική καλλιέργεια η συγκέντρωση του σεληνίου κυμάνθηκε από 0 έως 422,33 µg/g ξηρού βάρους στα φύλλα, από 0 έως 610,17 µg/g ξηρού βάρους στις ανθοκεφαλές και από 0 έως 602,5 µg/g ξηρού βάρους στις ρίζες του φυτού. Στην συμβατική καλλιέργεια η συγκέντρωση του σεληνίου κυμάνθηκε από 0 έως 7180 µg/g ξηρού βάρους στα φύλλα.

Στη συνέχεια, στα δείγματα της συμβατικής καλλιέργειας πραγματοποιήθηκε ποιοτικός προσδιορισμός των ισοθειοκυανικών και ινδολικών ενώσεων που αποτελούν προϊόντα της ενζυμικής υδρόλυσης των γλυκοζινολιτών, με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC-MS). Οι ενώσεις που ερευνήθηκαν στα εκχυλίσματα ήταν οι: (2-ισοθειοκυανατοαιθυλο)βενζόλιο, 5-(μεθυλθειο)πεντανονιτρίλιο, 1H-ινδολο-3-καρβαλδεΰδη, 1H-ινδολο-3-ακετονιτρίλιο, 3-ισοθειοκυανατοπροπ-1-ένιο, (4-ισοθειοκυανατοβουτυλο)(μεθυλο)σουλφάνιο και (3-ισοθειοκυανατοπροπυλο)(μεθυλο)σουλφάνιο. Από αυτές ταυτοποιήθηκαν οι

ενώσεις 1*H*-ινδολο-3-καρβαλδεϋδη και 1*H*-ινδολο-3-ακετονιτρίλιο που αποτελούν προϊόντα της ενζυμικής υδρόλυσης της γλυκομπρασικίνης.

Επιστημονική περιοχή: Επιστήμες Τροφίμων, Γεωπονικές Επιστήμες

Λέξεις κλειδιά: Σταυρανθή, μπρόκολο, υδροπονική καλλιέργεια, σελήνιο, Φασματοσκοπία Ατομικής Απορρόφησης με γεννήτρια υδριδίων

ABSTRACT

Broccoli is a *Brassicaceae* family plant containing valuable phytochemicals with beneficial effects for the human body. It differs from other plants of the same family, owing to its higher content of sulfur compounds and especially glucosinolates. It also has compounds with the element selenium (Se), such as selenocysteine and selenomethionine because, unlike other vegetables, it has the advantage of absorbing selenium through the sulfur metabolic pathway from the nutrients provided.

Selenium (Se) is an essential trace element for the proper functioning of the thyroid gland and contributes in protection of cells from the harmful effects of peroxidases. Lack of selenium from diet has negative health consequences. Millions of people around the world are deficient in selenium, which is mainly due to dietary factors. Thus, bio-fortification of vegetables with selenium can be an alternative way to receive this element through diet.

In the present postgraduate study, bio-fortification of broccoli with selenium was performed in conventional and hydroponic cultivation under controlled conditions. Se was administered to plants at two different concentrations of salt (Na_2SeO_4). In conventional cultivation, bio-fortification with Se solution was performed at two different concentrations, 6 mM & 12 mM. In plants of hydroponic cultivation at concentrations of 1.5 mM & 3 mM of the Se solution (Na_2SeO_4), in nutrient with presence and absence of sulfur.

After plant harvesting, the flowers, leaves and roots of the broccoli were collected, which were lyophilized and stored at -20 °C. With the appropriate preparation, the total Se was measured in the samples of hydroponic and conventional cultivation, with Atomic Absorption Spectroscopy with Hydrogen Generator (HG-AAS). In hydroponic cultivation, the concentration of selenium ranged from 0 to 422.33 µg/g dry weight in leaves, from 0 to 610.17 µg/g dry weight in flower heads and from 0 to 602.5 µg / g dry weight at its roots. plant. In conventional cultivation, the Se concentration ranged from 0 to 7180 µg/g dry weight in the leaves.

Subsequently, in the samples of conventional cultivation, qualitative determination of isothiocyanate and indole compounds, which are products of enzymatic hydrolysis of glucosinolates, with gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was performed. The compounds investigated in the extracts were: (2-isothiocyanatoethyl) benzene, 5-(methylthio)pentanenitrile, 1*H*-indole-3-carbaldehyde, 1*H*-indole-3-acetonitrile, 3-isothiocyanatoprop-1-ene,(4-isothiocyanatobutyl)(methyl)sulfane. Among these, the compounds 1*H*-indole-3-carbaldehyde and 1*H*-indole-3-acetonitrile, which are products of the enzymatic hydrolysis of glucobrassicin, were identified.

Scientific field: Food Science, Agricultural Science

Keywords: *Brassicaceae*, broccoli, hydroponic cultivation, selenium, Atomic Absorption Spectroscopy with Hydrogen Generator (HG-AAS)

Περιεχόμενα

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
ABSTRACT	7
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	11
Κεφάλαιο 1. Θεωρητικό Μέρος.....	12
1.1.Το σελήνιο (Se)	12
1.2.Η σημασία του στοιχείου του σεληνίου στον άνθρωπο.....	12
1.3.Περιεκτικότητα σεληνίου στα τρόφιμα και συνιστώμενες δόσεις	14
1.4.Μέθοδοι εμπλουτισμού της διατροφής σε σελήνιο	16
1.5.Μεταφορά και απορρόφηση σεληνίου στα φυτά	18
1.6.Το μπρόκολο (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>Italica</i>)	20
1.6.1.Δευτερογενείς μεταβολίτες στο μπρόκολο.....	22
1.7. Φασματομετρία Ατομικής Απορρόφησης.....	24
1.7.1. Ατομική Φασματοσκοπία.....	24
1.7.2. Φασματομετρία Ατομικής Απορρόφησης	24
1.7.3. Πηγές ακτινοβολίας	25
1.7.4. Φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης με φλόγα ως ατομοποιητή	27
1.7.5. Φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης με γεννήτρια υδριδίων (HG-AAS)	28
1.7.6. Παρεμποδίσεις στη ΦΑΑ	28
1.7.7. Προκατεργασία δειγμάτων στην ατομική απορρόφηση για τον προσδιορισμό των μετάλλων	29
Κεφάλαιο 2. Στόχοι της μεταπτυχιακής μελέτης	32
Κεφάλαιο 3. Πειραματικό Μέρος	34
3.1 Συμβατική καλλιέργεια μπρόκολου	34
3.1.1 Διαδικασία συμβατικής καλλιέργειας μπρόκολου	34
3.1.2 Εικόνες της συμβατικής καλλιέργειας μπρόκολου	38
3.2 Υδροπονική καλλιέργεια μπρόκολου	41
3.2.1 Διαδικασία υδροπονικής καλλιέργειας μπρόκολου	41
3.2.2 Εικόνες υδροπονικής καλλιέργειας μπρόκολου	51
3.2.3 Αποτελέσματα – Συζήτηση	57
3.3 Ξήρανση φυτικού υλικού	60
3.3.1. Λυοφιλίωση των δειγμάτων μπρόκολου	61
3.3.3 Ποσοστό υγρασίας δειγμάτων μπρόκολου	62

3.4 Προσδιορισμός ολικού σεληνίου (Se) στα δείγματα με Φασματοσκοπία Ατομικής Απορρόφησης με γεννήτρια υδριδίων	63
3.4.1 Υλικά και όργανα	63
3.4.2 Προετοιμασία προτύπων διαλυμάτων για την HG-AAS και καμπύλες αναφοράς.	64
3.4.3 Συνθήκες στην Ατομική Απορρόφηση με γεννήτρια υδριδίων (HG-AAS)	68
3.4.4 Αποτελέσματα - Συζήτηση.....	68
3.5 Ταυτοποίηση ισοθειοκυανικών και ινδολικών ενώσεων με αέρια χρωματογραφία – φασματομετρία μάζας (GC-MS).....	75
3.5.1 Υλικά και όργανα	75
3.5.2 Προετοιμασία δειγμάτων στον αέριο χρωματογράφο GC-MS	75
3.5.3 Συνθήκες στην Αέρια Χρωματογραφία – Φασματομετρία Μαζών (GC-MS)	76
3.5.4 Ταυτοποίηση ενώσεων με αέρια χρωματογραφία – φασματομετρία μάζας GC-MS	76
3.5.5 Αποτελέσματα - Συζήτηση.....	78
Βιβλιογραφία	84

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Αριθμός	Περιεχόμενα	Σελίδα
1.1	Περιεκτικότητα σεληνίου σε μg/g για διάφορα φρέσκα τρόφιμα.	14
1.2	Βοτανική ταξινόμηση του μπρόκολου.	20
1.3	Μήκη κύματος των στοιχείων που σχηματίζουν υδρίδια.	28
3.1	Πρόγραμμα ποτίσματος συμβατικής καλλιέργειας των φυτών μπρόκολου.	37
3.2	Ποσότητες (mL) διαλυμάτων αλάτων που απαιτούνται στο 1 L θρεπτικού διαλύματος.	46
3.3	Ποσότητα διαλυμάτων αλάτων σε mL για την παρασκευή 1 L θρεπτικού υλικού άνευ S.	47
3.4	Πρόγραμμα ποτίσματος διαλυμάτων της υδροπονικής καλλιέργειας για την πρώτη έως την τρίτη εβδομάδα (α), για την τέταρτη έως την έκτη εβδομάδα (β), για την έβδομη έως την ένατη εβδομάδα (γ) και για τη δέκατη και ενδέκατη εβδομάδα (δ).	49-50
3.5	Επίδραση του Se στο νωπό βάρος των φύλλων μπρόκολου της συμβατικής καλλιέργειας.	57
3.6	Επίδραση του Se στο νωπό βάρος των: α) ολόκληρων φυτών (πλην ρίζας), β) φύλλων, γ) βλαστών και δ) ανθοκεφαλών μπρόκολου.	59
3.7	Μέσος όρος της % υγρασίας των δειγμάτων φύλλων μπρόκολου της συμβατικής καλλιέργειας.	63
3.8	Μέσος όρος της % υγρασίας των δειγμάτων φύλλων και ανθοκεφαλών μπρόκολου της υδροπονικής καλλιέργειας.	63
3.9	Στοιχεία καμπυλών βαθμονόμησης.	65
3.10	Τιμές περιεκτικότητας Se σε μg/g ξηρού βάρους για τα φύλλα των φυτών μπρόκολου της συμβατικής καλλιέργειας.	68
3.11	Τιμές περιεκτικότητας Se σε μg/g ξηρού βάρους για τα φύλλα, τις ανθοκεφαλές και τις ρίζες των φυτών μπρόκολου όλων των ομάδων (Α, Β, Γ, Δ, Δ1, Δ2) της υδροπονικής καλλιέργειας.	69
3.12	Ισοθειοκυανικές και ινδολικές ενώσεις που ερευνήθηκαν στα εκχυλίσματα φύλλων μπρόκολου συμβατικής καλλιέργειας.	77

Κεφάλαιο 1. Θεωρητικό Μέρος

1.1.Το σελήνιο (Se)

Το σελήνιο πήρε το όνομά του από την αρχαία θεά Σελήνη και έχει ως σύμβολο το Se, δηλαδή τα δύο πρώτα γράμματα από την ονομασία του συμβόλου σύμφωνα με την IUPAC. Είναι αμέταλλο, ανήκει στη 16^η ομάδα του περιοδικού πίνακα (p-block) και απαντάται σε πέντε καταστάσεις οξείδωσης, τις -2, 0, +2, +4 και +6. Έχει ατομικό αριθμό 34 και ατομικό βάρος 78,96, διότι απαντάται στη φύση υπό τη μορφή ισοτόπων. Τα ισότοπα του Se που υπάρχουν στη φύση είναι τα ⁷⁴Se, ⁷⁶Se, ⁷⁷Se, ⁷⁸Se, ⁷⁹Se, ⁸⁰Se, ⁸²Se, ενώ μεταξύ αυτών το ισότοπο ⁸⁰Se βρίσκεται σε μεγαλύτερη φυσική αφθονία (49,82 %) (Reamer & Veillon, 1983). Η θερμοκρασία τήξης του είναι 221 °C (494 K) και η θερμοκρασία βρασμού 684,9 °C (958 K). Η πυκνότητα του είναι 4,8 g/cm³ και ο γραμμιομοριακός του όγκος είναι 16,42 cm³.

1.2.Η σημασία του στοιχείου του σεληνίου στον άνθρωπο

Η ανακάλυψη του σεληνίου έγινε από τον Σουηδό χημικό J.J. Berzelius το 1817, ο οποίος μελέτησε την επίδραση της ανόργανης μορφής του στοιχείου αυτού σε ζωντανούς οργανισμούς. Πολύ αργότερα, το 1957 οι Schwartz και Folz απέδειξαν την προστατευτική δράση του Se στον οργανισμό. Λόγω αυτών των μελετών το σελήνιο εντάχθηκε στην ομάδα των ιχνοστοιχείων των οποίων η έλλειψη από την διατροφή προκαλεί ένα μεγάλο αριθμό ασθενειών. Δηλαδή, το Se είναι ένα από τα στοιχεία των οποίων τα ίχνη σε ποσότητα έχουν μεγάλη σημασία για τη ζωή (Kieliszek et al., 2012).

Το σελήνιο συμμετέχει στο σύστημα θρέψης του οργανισμού, έχοντας αντιοξειδωτικό χαρακτήρα. Ο ρόλος του είναι η προστασία των μεμβρανών από την υπεροξείδωση των λιπιδίων, με σκοπό την αποφυγή βλαβών στο κύτταρο από τις ελεύθερες ρίζες που μπορούν να παραχθούν και να αντιδράσουν με τη λιπιδική περιοχή της κυτταρικής μεμβράνης. Αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι των σεληνοπρωτεΐνων και ορισμένων αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης [glutathioneperoxidase (GPx)], αναγωγάση της θειορεδοξίνης [thioredoxinreductase (TRxR)] και της δεοϊνιδάσης της ιωδοθυρονίνης [iodothyroninedeiodinase (DIO)], τα οποία προστατεύουν τα κύτταρα από την καταστροφική επίδραση των ελεύθερων ριζών που παράγονται κατά την οξείδωση. Συγκεκριμένα, η έρευνα των Thomson και Robinson το 1993, κατέληξε στο συμπέρασμα ότι το Se είναι δομικό συστατικό του ενζύμου, υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, το οποίο προστατεύει τα κύτταρα από την επιβλαβή επίδραση των υπεροξειδασών (Haddadin et al., 2001).

Με τη μορφή της σεληνοκυστεΐνης, το σελήνιο αποκτά αντιοξειδωτική δράση, επιβραδύνοντας τη διαδικασία γήρανσης στους ιστούς και τη μείωση της

ελαστικότητάς τους. Επίσης, συμβάλλει στη βελτίωση της υγείας ενισχύοντας το ανοσοποιητικό σύστημα (Kieliszek & Błażejak, 2013; Scott, 1973; Ruseva et al., 2013).

Το Se συμμετέχει στην πρωτεΐνοσύνθεση, στην ανάπτυξη και τη γονιμότητα, ενώ παρέχει μείωση των συμπτωμάτων της εμμηνόπαυσης. Η δράση του μαζί με το ιώδιο είναι πολύ σημαντική για τη διατήρηση και τη σωστή λειτουργία του θυρεοειδή αδένα καθώς συμμετέχει σε κύρια μεταβολικά μονοπάτια, όπως με τις ορμόνες του θυρεοειδούς (Rayman, 2000). Τέλος, η χορήγηση Se συμβάλλει στην αντιμετώπιση ή θεραπεία διαφόρων ασθενειών όπως, ο καρκίνος του παχέος εντέρου και του στομάχου, η νόσος του Parkinson, η ακμή και το άσθμα.

Η μεγαλύτερη αξία αποδίδεται στην απορρόφηση του Se στο γαστρεντερικό σύστημα των οργανισμών. Στο έντερο απορροφάται περίπου το 85% - 95% της ποσότητας του σεληνίου που προσλαμβάνεται από τις τροφές. Η βιοδιαθεσιμότητα εξαρτάται από τη μορφή στην οποία βρίσκεται το σελήνιο. Τα οργανικά συστατικά Se απορροφώνται σε ποσοστό 90% - 95%, ενώ τα ανόργανα συστατικά σε λιγότερο από 10%. Αμέσως μετά την εισαγωγή του στη ροή του αίματος, το Se δεσμεύεται στα ερυθρά αιμοσφαίρια και τον ορό των αλβουμινών και γλοβουλινών. Υπό αυτή τη μορφή μεταφέρεται σε πολλούς ιστούς καθώς επίσης, μπορεί να διεισδύσει στον πλακούντα. Σχετικά μεγάλα ποσά που σχετίζονται με άλλους ιστούς έχουν βρεθεί σε συκώτι, πάγκρεας και το θυροειδή, αλλά και στα μαλλιά και τα νύχια. Το μεγαλύτερο ποσοστό Se (50%) έχει βρεθεί στους σκελετικούς μύες.

Εκτιμάται ότι η διατροφή μισού με ενός εκατομμυρίου ανθρώπων στον πλανήτη χαρακτηρίζει τη διατροφή του ελλιπή σε σελήνιο καθώς σε πολλές χώρες υπάρχει ανεπαρκής πρόσληψή του (Holben & Smith, 1999). Η αύξηση της έλλειψης σεληνίου στα διάφορα μέρη του κόσμου οδηγεί σε παθολογικές δυσλειτουργίες. Ιδιαίτερα ευπαθείς σε ανεπιθύμητες αντιδράσεις από την ανεπάρκεια Se παρουσιάζονται σε ασθενείς που πάσχουν από φαινυλκετονούρια (Alves et al., 2012) και οι άνθρωποι με διατροφικές διαταραχές. Επίσης, άνθρωποι που έχουν εκτεθεί σε ειδικές χημειοθεραπείες και άνθρωποι που έχουν υποβληθεί σε ραδιοθεραπείες παρουσιάζουν μειωμένα επίπεδα αυτού του μικροστοιχείου στον οργανισμό (Eroglu et al., 2012).

Η έλλειψη Se οδηγεί στη φθορά πολλών οργάνων και ιστών, η οποία είναι αποτέλεσμα της μειωμένης έκφρασης των σεληνοπρωτεΐνών που προκαλεί αλλαγές στη βιολογική διαδικασία στην οποία συμμετέχουν (Pedrero & Madrid, 2009). Συμπτώματα έλλειψης Se που βρέθηκαν σε ανθρώπους και ζώα είναι κυρίως διαταραχές που σχετίζονται με τον καρδιακό μυ και τις αρθρώσεις. Μέτριες ελλείψεις αυτού του μικροστοιχείου έχουν, ωστόσο αρνητικό αντίκτυπο στην υγεία του ανθρώπου, όπως για παράδειγμα την αύξηση του κινδύνου στειρότητας στους άντρες, τον καρκίνο του προστάτη, νεφροπάθειες ή τον κίνδυνο εμφάνισης νευρολογικών διαταραχών (Kryczyk & Zagrodzki, 2013).

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) η μέγιστη ημερήσια πρόσληψη δεν πρέπει να ξεπερνάει τα 70 μg ανά ημέρα (Kieliszek & Błażejak, 2013). Σημαντικό επίσης είναι και το μέγιστο όριο πρόσληψης του Se, όπου δόσεις πάνω από 400 έως 700 μg ανά ημέρα εμφανίζουν τοξική δράση. Ωστόσο, η μέση περιεκτικότητα ενός καθημερινού διαιτολογίου σε Se διαφέρει από αυτήν που συνιστάται. Έρευνες σε Ευρωπαϊκές χώρες έχουν δείξει ότι η πρόσληψη του Se σε επίπεδο οικιακής κατανάλωσης κυμαίνεται από 30 έως 50 μg ανά ημέρα (Kieliszek & Błażejak, 2013; Rayman, 2000; Stolińska et al., 2012; Navarro-Alarcon & Cabrera-Vique, 2008; Fairweather-Tait et al., 2010; Tinggi, 2003). Η υπέρβαση της συνιστώμενης ημερήσιας πρόσληψης μπορεί να προκαλέσει συμπτώματα τροφικής δηλητηρίασης, όπως εμετό, ναυτία και διάρροια (Fordyce, 2005). Η υψηλή έκθεση σε μεγάλα ποσά Se οδηγεί σε μία γενική εξασθένιση του οργανισμού καθώς και σε νευρολογικές διαταραχές (Kieliszek & Błażejak, 2013). Σε κόθε περίπτωση, η τοξικότητα του Se καθορίζεται από πολλούς παράγοντες ανάλογα με την περίπτωση του στοιχείου, την προσλαμβανόμενη δόση, τις φυσιολογικές συνθήκες του οργανισμού αλλά και από την αλληλεπίδραση του σεληνίου με άλλα στοιχεία της διατροφής (Fernández-Martinez & Charlet, 2009).

Μεγάλη προσοχή χρειάζεται και στην ανεξέλεγκτη κατανάλωση προϊόντων εμπλουτισμένων με Se, η οποία μπορεί να αποβεί δηλητηριώδης (Zagrodzki & Laszczyk, 2006). Μελέτες στη Βενεζούελα έχουν δείξει ότι η κατανάλωση φρούτου από το είδος *Lecythisollaria*, το οποίο περιέχει μεγάλα ποσά Se, προκάλεσε απώλεια μαλλιών, διάρροια και εμετό στον ανθρώπινο πληθυσμό (Fordyce, 2007). Η μεγάλη διακύμανση των τιμών πρόσληψης Se αποτέλεσε έναυσμα για τη διεξαγωγή εκπαιδευτικών προγραμμάτων με στόχο την πληροφόρηση σχετικά με την θετική επίδραση του συγκεκριμένου στοιχείου στην υγεία.

1.3.Περιεκτικότητα σεληνίου στα τρόφιμα και συνιστώμενες δόσεις

Το περιεχόμενο Se στα τρόφιμα χαρακτηρίζεται από μεγάλη ποικιλομορφία καθώς εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως, η περιεκτικότητα του εδάφους κάθε περιοχής σε Se, η ικανότητα απορρόφησης και ενσωμάτωσης του Se από τα φυτά, οι κλιματικές συνθήκες, οι μέθοδοι καλλιέργειας και ανάπτυξης, αλλά και οι μέθοδοι επεξεργασίας των τροφίμων (Dumont et al., 2006). Στον πίνακα 1.1 παρουσιάζεται το περιεχόμενο του σεληνίου σε ορισμένα φρέσκα τρόφιμα.

Πίνακας 1.1: Περιεκτικότητα σεληνίου σε μg/g για διάφορα φρέσκα τρόφιμα.

Τρόφιμο	Περιεκτικότητα Se (μg/g)
Μαγιά	3000
Ξηροί καρποί Βραζιλίας	0,85-6,86
Σκόρδο	0,5
Κρεμμύδι	0,5
Σολομός	0,21-0,27
Αυγό	0,17

Μοσχάρι	0,35-0,47
Κοτόπουλο	0,57
Γαλακτοκομικά προϊόντα	0,01-0,55

Επειδή το Se στα τρόφιμα τις περισσότερες φορές απαντάται σε συνδυασμό με τις πρωτεΐνες, τα προϊόντα με υψηλό πρωτεϊνικό περιεχόμενο έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε Se. Σε αυτά τα προϊόντα περιλαμβάνονται το κρέας, το ψάρι, τα ζωτικά όργανα των ζώων (συκώτι, νεφρά, καρδιά, στομάχι κ.α.) και τα δημητριακά (Kieliszek & Błażejak, 2013). Στα προϊόντα κρέατος το περιεχόμενο Se κυμαίνεται από 0,08 έως 0,73 µg/g (Navarro-Alarcon & Cabrera-Vique, 2008). Πλούσια σε Se είναι τα ψάρια ανοικτής θαλάσσης με περιεκτικότητα από 0,11 έως 0,97 µg/g καθώς και τα ψάρια του γλυκού νερού με περιεκτικότητα από 0,18 έως 0,68 µg/g (WHO, 2004). Το επίπεδο του Se στα δημητριακά βρίσκεται μεταξύ του 0,01 και 0,55 µg/g (Fairweather-Tait et al., 2010). Στα γαλακτοκομικά προϊόντα, η περιεκτικότητα σε Se έχει αρνητική συσχέτιση με την περιεκτικότητα σε λιπίδια και κυμαίνεται από 0,01 έως 0,55 µg/g.

Τα φρούτα και τα λαχανικά περιέχουν μικρές συγκεντρώσεις Se, με τιμές από 0,001 έως 0,022 µg/g. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι έχουν χαμηλό πρωτεϊνικό περιεχόμενο και μεγάλο ποσοστό νερού. Ακραία υψηλές τιμές Se έχουν βρεθεί σε ξηρούς καρπούς Βραζιλίας, αλλά και σε μανιτάρια (Fordyce, 2007). Τα μανιτάρια περιέχουν σημαντικά ποσά πρωτεϊνών, που εκτιμώνται από 16,5 % μέχρι 39 % επί ξηρής μάζας, επομένως τα πρωτεϊνικά τους κλάσματα παρουσιάζουν και υψηλά επίπεδα οργανικού Se (Maseko et al., 2013). Τα κοινά μανιτάρια του είδους *Agaricus bisporus* είναι μεταξύ των πιο συχνά μελετημένων μανιταριών στις έρευνες για το στοιχείο του Se στα τρόφιμα. Η πιθανότητα να συσσωρευτούν μεγάλες ποσότητες Se είναι μικρή στην πλειονότητα των φυτών. Άλλωστε η συγκέντρωση του Se στα φυτά σπάνια υπερβαίνει τα 100 µg/g. Σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις Se έχουν βρεθεί σε φυτά του γένους *Brassica*, όπως το μπρόκολο, το κουνουπίδι, το λάχανο και το γογγύλι (Dumont et al., 2006; Wesołowski, 2006).

Το κρεμμύδι και το σκόρδο που θεωρούνται ότι συμβάλλουν στη μείωση του κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου, αποτελούν καλές πηγές Se. Το Se στο κρεμμύδι και στο σκόρδο βρίσκεται με τη μορφή της γ-glutamyl-Se-methylselenocysteine ή της Se-methylselenocysteine (Finley, 2005). Η κατανάλωση αυτών των φυτών δεν επιφέρει υπερβολική συσσώρευση σελήνιου στους ιστούς ή οποιαδήποτε άλλη διαταραχή (Kieliszek & Błażejak, 2013). Τέλος, οι ζύμες αποτελούν πολύτιμη πηγή εύκολα αφομοιώσιμου Se (Pérez-Corona et al., 2011).

Πολλές έρευνες έχουν δείξει ότι η συνιστώμενη πρόσληψη Se ποικίλει ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή (Wąsowicz et al., 2003; Combs, 2001). Οι κάτοικοι της Τσέχικης Δημοκρατίας καταναλώνουν ελάχιστο Se, που εκτιμάται γύρω στα 10-25 µg ανά ημέρα, ενώ μεγαλύτερες δόσεις Se καταναλώνουν οι κάτοικοι της Βενεζουέλας με 200-350 µg ανά ημέρα και σε ορισμένες περιοχές της Κίνας με 7-4990 µg ανά ημέρα. Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA,

2008), η καθημερινή πρόσληψη σεληνίου στον Ευρωπαϊκό πληθυσμό εκτιμάται μεταξύ 20 και 70 μg (Alfthan et al., 2015; Achibat et al., 2015; Ros et al., 2016; Ramos et al., 2010; Šlencu et al., 2012). Το επίπεδο του προσλαμβανόμενου Se στην Πολωνία κυμαίνεται από 30 έως 40 μg ανά ημέρα (Wąsowicz et al., 2003). Στην Ισπανία από 44 έως 55 μg ανά ημέρα, στην Αυστρία βρίσκεται στα 48 μg ανά ημέρα, ενώ στην Μεγάλη Βρετανία στα 34 μg ημερησίως (Rayman, 2004; Bitterli et al., 2010). Η συνιστώμενη ημερήσια δόση σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) είναι μεταξύ 30-40 μg για τους ενήλικες, δίνοντας έμφαση στο ότι οι δόσεις Se έως 400 μg ανά ημέρα καθίστανται ασφαλείς. Σύμφωνα με την οδηγία της Εθνικής Ακαδημίας Επιστημών των ΗΠΑ, η συνιστώμενη ημερήσια δόση εξαρτάται από την ηλικία και ποικίλει μεταξύ 40-70 μg για τους άντρες και 45-55 μg για τις γυναίκες, ενώ κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και του θηλασμού δεν πρέπει να ξεπερνά τα 60-70 μg ημερησίως (Pérez-Corona et al., 2011; Bitterli et al., 2010; Šlencu et al., 2012).

1.4. Μέθοδοι εμπλουτισμού της διατροφής σε σελήνιο

Το σελήνιο, όπως αναφέρθηκε, είναι ένα βασικό ιχνοστοιχείο απαραίτητο στον ανθρώπινο οργανισμό (Drutel et al., 2013; Kieliszek et al., 2015; Kieliszek et al., 2015). Η βασική πηγή του Se θα πρέπει να είναι μια κατάλληλα επιλεγμένη και ισορροπημένη διατροφή. Όμως, η υποχρεωτική τροποποίηση του διαιτολογίου σε ασθενείς ή άλλες ομάδες του πληθυσμού, μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη πρόσληψη σεληνοαμινοξέων, μια σημαντική πηγή σεληνίου. Η έλλειψη του Se αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα παγκοσμίως, με αρνητικό αντίκτυπο στην υγεία. Η ανεπάρκεια Se συνήθως σχετίζεται με διατροφικές διαταραχές και δυσαπορρόφηση, αλλά και σε μεταβολικές διαταραχές. Ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε ραδιο- και χημειοθεραπεία αποτελούν μία ακόμη ομάδα με έλλειψη αυτού του μικροστοιχείου (Kieliszek & Błażejak, 2013; Oldfield, 2002; Kieliszek et al., 2016).

Άμεση μέθοδος ενίσχυσης της διατροφής με σελήνιο, αποτελεί η προσθήκη συμπληρωμάτων διατροφής στο διαιτολόγιο (Kieliszek & Błażejak, 2013; Ogawa-Wong et al., 2016; Mehdi et al., 2013).

Η διατροφική ενίσχυση με Se μπορεί να πραγματοποιηθεί έμμεσα με βιο-ενίσχυση των φυτών κατά την καλλιέργειά τους. Η βιο-ενίσχυση των γεωργικών καλλιεργειών με Se που γίνεται σε ανόργανη μορφή (συνήθως Se (IV)), προσθέτοντάς το στο λίπασμα, είναι μία χρήσιμη τεχνική για την ενίσχυση της θρεπτικής αξίας των τροφίμων, αλλά και για την αύξηση της προσλαμβανόμενης δόσης από τους ανθρώπους και τα ζώα (Ramos et al., 2010).

Η πηγή και η μορφή αυτού του στοιχείου αποκτούν ολοένα και μεγαλύτερη σημασία σε μελέτες για την ενίσχυση της διατροφής με Se. Πρόσφατα, έχει παρατηρηθεί μεγάλο ενδιαφέρον σε εναλλακτικούς τρόπους προσθήκης συστατικών, όπως η χρήση μικροοργανισμών για την παραγωγή λειτουργικών τροφίμων. Τα τρόφιμα αυτά

μπορεί να προέρχονται από βιομάζα φυτού εμπλουτισμένη με Se ή να είναι ζυμούμενα τρόφιμα με γαλακτικά βακτήρια καθώς και ζύμες που συσσωρεύονται σημαντικά ποσά σεληνίου (Kieliszek et al., 2016). Επίσης, μπορεί να γίνει εμπλουτισμός ζυμούμενων τροφίμων συνήθως με σεληνοαμινοξέα (Diowksz et al., 2000). Η μαγιά εμπλουτισμένη με Se είναι αποτελεσματική και ασφαλής πηγή Se (λόγω σεληνομεθειονίνης) και αντιπροσωπεύει μία καλύτερα απορροφήσιμη μορφή αυτού του στοιχείου. Επιπλέον, η απορρόφηση αυξάνεται με τη βοήθεια των βιταμινών που υπάρχουν στη βιομάζα της μαγιάς (κυρίως οι βιταμίνες B και E) (McSheehy et al., 2006). Η απορρόφηση του Se από την κατανάλωση μαγιάς εμπλουτισμένης με Se, στον ανθρώπινο οργανισμό υπολογίζεται μεταξύ 75 % και 90 % (Dumont et al., 2006). Η χρήση των βελτιωτικών που περιέχουν οργανικό Se προερχόμενο από μαγιά, δείχνει να επιφέρει πολλαπλά οφέλη στην υγεία του ανθρώπου (FDA, 2008; Steinbrenner et al., 2015).

Με βάση τις παραπάνω πληροφορίες και το γεγονός ότι η διατροφική πυραμίδα συνιστά την κατανάλωση προϊόντων που προέρχονται από δημητριακά όπως τα αρτοσκευάσματα, το ψωμί φαίνεται να είναι ένα κατάλληλο προϊόν για την εφαρμογή της τεχνητής ενίσχυσης. Χρησιμοποιώντας προζύμι στο οποίο έχουν προστεθεί βακτήρια και μαγιά εμπλουτισμένη με Se, είναι δυνατή η παραγωγή ενός προϊόντος με αυξημένο Se. Αυτό καθιστά ασφαλή την αύξηση των επιπέδων Se στη διατροφή χωρίς καμία υποβάθμιση της ποιότητάς του σχετικά με το συμβατικό προϊόν ψωμιού (Stabnikova et al., 2008).

Τα ζώα σε αντίθεση με τα φυτά και τους μικροοργανισμούς δεν μπορούν να συνθέσουν σεληνομεθειονίνη από μόνα τους. Ωστόσο, είναι ικανά να συνθέτουν σεληνοκυστεΐνη από ανόργανα και οργανικά συστατικά Se, μέσω της μεταφοράς του απόμου του Se από τη σεληνομεθειονίνη στη σερίνη. Το ίδιο, συμβαίνει και στην περίπτωση των αμινοξέων μεθειονίνη και κυστεΐνη (Kieliszek et al., 2015). Ο μεταβολισμός του Se, κατά κύριο λόγο, εξ' αιτίας της χημικής του ομοιότητας με το θείο, γίνεται μέσω της ίδιας μεταβολικής οδού (Kieliszek et al., 2015). Το Se όντας στη μορφή της σεληνομεθειονίνης, χαρακτηρίζεται από την υψηλότερη βιοδιαθεσιμότητα σε σύγκριση με την ανόργανη μορφή του (Kieliszek & Błażejak, 2013; Dumont et al., 2006). Η σεληνομεθειονίνη μπορεί να ενσωματωθεί στις πρωτεΐνες αντικαθιστώντας τα αμινοξέα που περιέχουν θείο (Wesołowski, 2006; Kieliszek et al., 2015; Kieliszek et al., 2015). Συνεπώς, η σεληνομεθειονίνη είναι μία από τις πιο εύκολα απορροφήσιμες μορφές του σεληνίου (Kieliszek & Błażejak, 2013).

Σε πολλές χώρες, η καινοτόμα τεχνολογική επεξεργασία βασισμένη στην παραγωγή εμπλουτισμένων τροφίμων με Se όπως τα αυγά, το κρέας, το γάλα, έχει εισαχθεί επιτυχώς (Navarro-Alarcon & Cabrera-Vique, 2008; Finley, 2006). Κρέας χοιρινό ή κοτόπουλο εμπλουτισμένο με Se διατίθεται στην Κορέα, ενώ αυγά με Se πωλούνται ήδη σε 25 χώρες. Ένα αυγό ή κοτόπουλο 100 g ενισχυμένο με Se μπορεί να παρέχει το 50 % της ημερήσιας αναγκαίας ποσότητας σεληνίου στον οργανισμό (Bourre & Galea, 2006; Fisinin et al., 2009). Οι έρευνες που σχετίζονται με την παραγωγή λειτουργικών τροφίμων, δείχνουν ξεκάθαρα ότι τα εμπλουτισμένα αυγά με Se

μπορούν να βοηθήσουν άτομα με ανεπάρκεια Se και να συμβάλλουν στη διατήρηση της μεταβολικής ισορροπίας του οργανισμού (Fisinin et al., 2009).

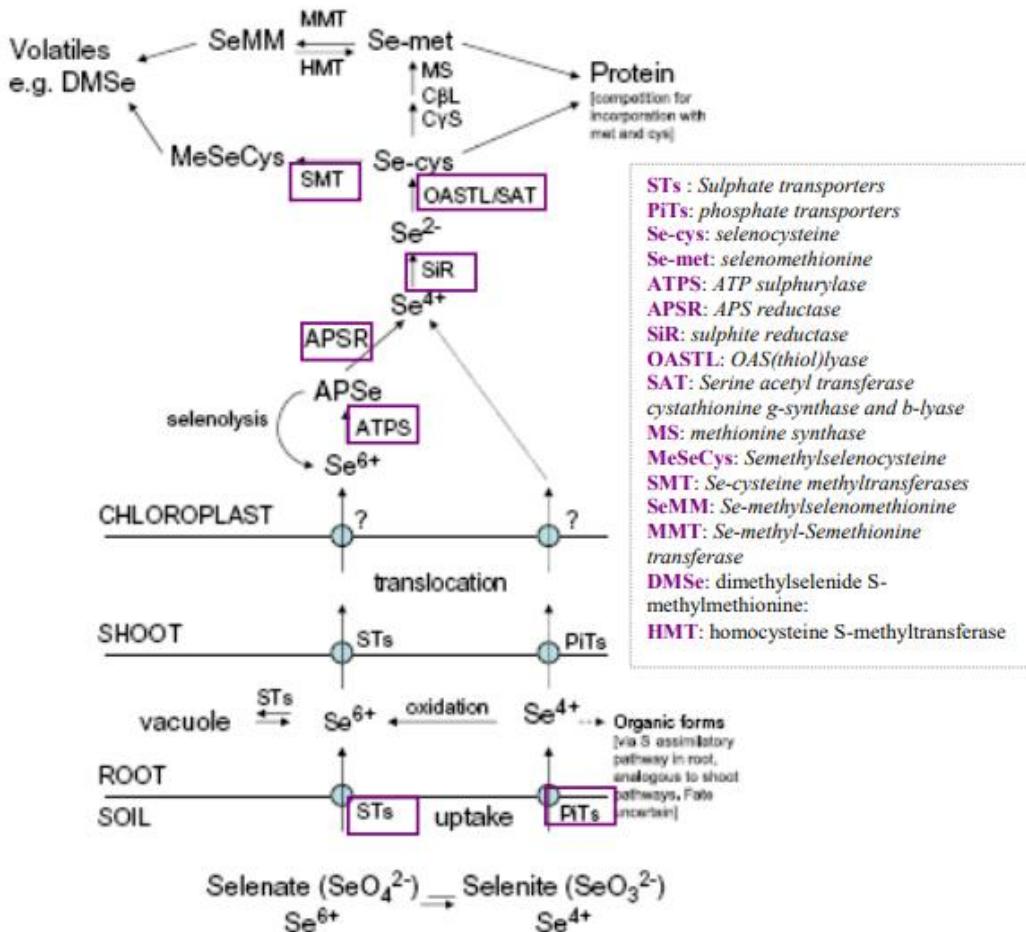
Αυτή τη στιγμή, πολλά ερευνητικά κέντρα στον κόσμο έχουν ξεκινήσει να εργάζονται πάνω στην δημιουργία νέων προϊόντων τροφίμων τα οποία αποτελούν πηγές Se. Το πιο επιθυμητό χαρακτηριστικό είναι να παρέχονται οργανικές μορφές του σεληνίου με την υψηλότερη βιοδιαθεσιμότητα στα έτοιμα προς χρήση (ready-to-use) προϊόντα. Αυτό θα αυξήσει την ελκυστικότητα των προϊόντων τροφίμων από τον καταναλωτή, ιδιαίτερα για εκείνους που ενδιαφέρονται για τρόφιμα εμπλουτισμένα με θρεπτικά συστατικά (Kieliszek & Błażejak, 2013).

Ωστόσο, αυτό που πρέπει να σημειωθεί είναι ότι η θεμελιώδης πηγή του σεληνίου για τον ανθρώπινο οργανισμό είναι πάντα μία κατάλληλη και ισορροπημένη διατροφή. Η ενίσχυση των τροφίμων με το Se είναι καλό να διεξάγεται με προσοχή ώστε να αποφεύγονται οι αρνητικές επιδράσεις του, καθότι το εύρος μεταξύ της συνιστώμενης ημερήσιας δόσης και της τοξικής δόσης του Se είναι αρκετά μικρό (Kieliszek & Błażejak, 2013; Navarro-Alarcon & Cabrera-Vique, 2008).

1.5. Μεταφορά και απορρόφηση σεληνίου στα φυτά

Κατά την καλλιέργεια των φυτών έχει μεγάλη σημασία η μορφή του σεληνίου που προστίθεται στη λίπανση. Οι οξειδωμένες μορφές σεληνίου όπως, το σεληνικό ανιόν (SeO_4^{2-} , *selenate*) και το ανιόν σεληνίτη (SeO_3^{2-} , *selenite*) είναι υδατοδιαλυτές και άρα περισσότερο βιοδιαθέσιμες στα φυτά. Το σεληνικό ανιόν είναι πιο διαλυτό και διεισδύει ευκολότερα στο έδαφος από ότι το ανιόν σεληνίτη.

Ο μηχανισμός απορρόφησης του σεληνίου από τα φυτά, έχει μελετηθεί στο γένος *Astragalus*, αφού τα συγκεκριμένα φυτά έχουν ικανότητα συσσώρευσης Se έως και 5000 ppm. Το Se παρουσιάζει κοινά χαρακτηριστικά με το στοιχείο του θείου όσον αφορά την απορρόφησή του από τα φυτά μέσω του εδάφους. Υπάρχει ανταγωνισμός μεταξύ των θεικών και σεληνικών ανιόντων αφού το μεταβολικό μονοπάτι το οποίο ακολουθείται είναι όμοιο με τα θεικά και οδηγεί στον σχηματισμό ενώσεων σεληνίου από κυστεΐη και μεθειονίνη. Τα φυτά, κατά την εισαγωγή του θείου και του σεληνίου, διαχωρίζουν τα δύο στοιχεία. Το στοιχείο του θείου λαμβάνει μέρος στην πρωτεϊνοσύνθεση και το Se ενσωματώνεται στα μη πρωτεϊνικά αμινοξέα (Se-μεθυλο-κυστεΐη, σεληνο-ομο-κυστεΐη) και βιοσυσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα ή το χυμοτόπιο, χωρίς τοξικές επιδράσεις στο φυτό.



Εικόνα 1.1: Διαδικασία αφομοίωσης σεληνίου στα φυτά.

Στην εικόνα 1.1 φαίνεται η πορεία αφομοίωσης του σεληνίου (Hawkesford & Zhao, 2007). Η μεταφορά του σεληνίου, αρχικά, πραγματοποιείται με τη βοήθεια των μεταφορέων του θείου (STS *sulfatetransporters*) και τους μεταφορείς των φωσφορικών (PiTS *phosphate transporters*). Το Se δεν εισχωρεί σε μεγάλο βαθμό εντός του κυττάρου καθώς το σεληνικό ανιόν συγκεντρώνεται στα χυμοτόπια ή στους βλαστούς. Ωστόσο, και τα δύο ενσωματώνονται στην σεληνοκυστεΐνη και την σεληνομεθειονίνη χρησιμοποιώντας το μεταβολικό μονοπάτι του θείου. Σε αυτή τη διαδικασία σημαντική είναι η βοήθεια των ενζύμων. Ακολουθεί η μεθυλίωση της σεληνοκυστεΐνης (*Se-cys*) σε σεληνομεθυλοκυστεΐνη (*Se-methylselenocysteine*, *MeSeCys*) με το ένζυμο μεθυλοτρανσφεράση της σεληνοκυστεΐνης (*Se-cysteinemethyltransferases*, *SMT*). Επίσης, πραγματοποιείται η μεθυλίωση της σεληνομεθειονίνης (*Se-met*) σε μεθυλσεληνομεθειονίνη (*Se-methyl-Se-methionineSeMM*) μέσω του ενζύμου τρανσφεράση της Se-μεθυλσεληνομεθειονίνης (*Se-methyl-Se-methioninetransferase*, *MMT*). Οι ουσίες αυτές κινούνται εσωτερικά του φυτού, αλλά παράγουν και τις πρόδρομες ενώσεις για τον μεταβολισμό των πτητικών ουσιών, όπως το διμεθυλοσεληνίδιο (*dimethylselenide*, *DMSe*). Ακόμα, η

θειο-μεθυλ-μεθειονίνη (S-methylmethionine): ομοκυστεΐνη της θειομεθυλοτρανσφεράσης (homocysteineS-methyltransferase, HMT) καταλύει τον ανασχηματισμό της σεληνομεθειονίνης.

Τα διάφορα είδη φυτών ποικίλουν ανάλογα με την ικανότητά τους να συσσωρεύουν το Se. Αυτή σχετίζεται με τα επίπεδα των μεταφορέων θείου που έχει το φυτό. Ωστόσο, τα είδη των φυτών ποικίλουν με βάση τη μορφή του σεληνίου που απορροφούν, λόγω της παρουσίας και δράσης αντίστοιχων μεταβολικών ενζύμων. Στις περιπτώσεις των φυτών που δεν συσσωρεύεται το Se, πραγματοποιείται η μετατροπή των σεληνοαμινοξέων σε μη πρωτεϊνικά αμινοξέα, όπως η σεληνομεθυλοκυστεΐνη. Όταν τα σεληνοαμινοξέα δεν ενσωματώνονται σε πρωτεΐνες, τότε επέρχεται ένα σύστημα φυσιολογικής αδρανοποίησης. Η μετέπειτα διαδικασία πρωτεϊνοσύνθεσης θα επιφέρει την παραγωγή ουσιών στο φυτό, οι οποίες είναι σημαντικά επιζήμιες. Έτσι, το φυτό καταλήγει με μεγάλες πιθανότητες σε θάνατο.

Στη βιο-ενίσχυση των καλλιεργειών με Se, λαμβάνεται υπόψη η φυσική παραλλαγή μεταξύ των διαφόρων ειδών φυτών. Τα τελευταία χρόνια, οι ενισχυμένες καλλιέργειες φυτών έχουν προσανατολισθεί σε είδη που τείνουν στη συγκέντρωση μεγαλύτερων ποσοτήτων Se (και θείου). Τέτοιου είδους καλλιέργειες αποτελούν τα γένη *Brassica* και *Allium* (Terry et al., 2000) και ιδιαιτέρως το μπρόκολο και το σκόρδο όπου η βιο-ενίσχυση των καλλιεργειών με οργανικό Se είναι πιο αποτελεσματική (Lyi et al., 2005; Hsu et al., 2011).

1.6. Το μπρόκολο (*Brassica oleracea* var. *Italica*)

Το μπρόκολο, (*Brassica oleracea* var. *Italica* Plenck), ανήκει στα σταυρανθή λαχανικά της οικογένειας *Brassicaceae* ή *Cruciferae* και συγκεκριμένα στο γένος *Brassica* (Πίνακας 1.2, Σαρλής, 1999). Προέρχεται από την Ευρώπη και τη Μεσόγειο καθώς αποτελούσε ένα δημοφιλές κηπευτικό για τον ιταλικό πληθυσμό από τη Ρωμαϊκή εποχή. Η κατανάλωσή του γινόταν σε ωμή ή μαγειρεμένη κατάσταση, κυρίως για φαρμακευτικούς σκοπούς.

Πίνακας 1.2: Βοτανική ταξινόμηση του μπρόκολου.

Βασίλειο	Plantae (Φυτά)
Αθροισμα	Magnoliophyta (Αγγειόσπερμα)
Κλάση	Magnoliopsida (Δικοτυλήδονα)
Υποκλάση	Dilleniidae
Τάξη	Capparales (Κραμβώδη)
Οικογένεια	Brassicaceae ή Cruciferae (Κραμβοειδή)
Γένος	Brassica (Κράμβη)
Είδος	Brassica oleracea L. var. italica Plenck

Το μπρόκολο είναι ποώδες, διετές φυτό που καλλιεργείται ως μονοετές από σπόρο σε σπόρο. Το εδώδιμο τμήμα του αποτελεί η ανθοκεφαλή. Μπορεί να αναγνωρισθεί από τα άλλα είδη ποικιλιών του είδους *Brassica oleracea* κατά την ανάπτυξή του. Αναπτύσσεται σε μέγεθος 50-90 εκατοστά. Διαθέτει κοντό βλαστό, ο οποίος στην κορυφή του αναπτύσσει δευτερεύοντες βλαστούς. Τα φύλλα του έχουν γκριζοπράσινο χρώμα και ισχυρό κεντρικό νεύρο. Στο μη διακλαδισμένο βλαστό, κεντρικά του φυτού, δημιουργείται η ανθοκεφαλή. Το χρώμα της, συνήθως, είναι πράσινο ή ιώδες, ανάλογα με την καλλιεργούμενη ποικιλία. Αρχικά, εμφανίζονται διακλαδώσεις και στην πορεία σχηματίζεται μία συμπαγής ημισφαιρική κεφαλή που περιβάλλεται από φύλλα χωρίς να καλύπτεται από αυτά. Οι ανθοκεφαλές είναι εκτεθειμένες καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξής τους. Ύστερα από το σχηματισμό της κεντρικής ανθοκεφαλής, παράγονται και δευτερεύουσες κεφαλές (παραπούλια) με μικρότερο μέγεθος, στις βάσεις των κατώτερων φύλλων. Η ανάπτυξη των δευτερευουσών κεφαλών επηρεάζεται από την κυριαρχία της κορυφαίας κεφαλής. Μετά από τη συγκομιδή της κεντρικής, αναπτύσσονται οι δευτερεύουσες κεφαλές που μπορούν να γίνουν εμπορεύσιμες. Η συγκομιδή της ανθοκεφαλής, είναι απαραίτητο να πραγματοποιείται όταν είναι ακόμα άγουρη, διαφορετικά επέρχεται γρήγορη υποβάθμιση της ποιότητας. Επίσης, εάν δεν συγκομιστούν έγκαιρα οι ανθοκεφαλές, μετά την ανάπτυξή τους, αναπτύσσονται ανθικά στελέχη. Το φαινόμενο αυτό, συμβαίνει σε μεγάλο βαθμό στις πρώιμες ποικιλίες.



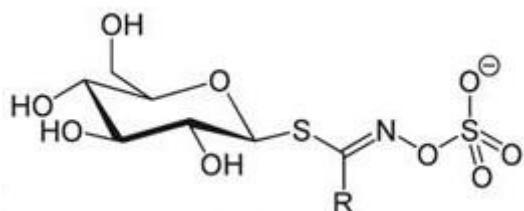
Εικόνα 1.2: Κεντρικές ανθοκεφαλές από καλλιέργεια μπρόκολου πριν τη συγκομιδή.

Ως προς το ριζικό σύστημα, το μπρόκολο, αποτελείται από μία κεντρική και πολλές πλευρικές ρίζες. Το πάχος τους είναι από 0,5-1 cm και ο κύριος όγκος του ριζικού συστήματος βρίσκεται 20-30 cm από την επιφάνεια του εδάφους.

Είναι φυτό ψυχρής εποχής και όχι τόσο ευαίσθητο σε υψηλές και χαμηλές θερμοκρασίες. Για την καλύτερη απόδοση ποιότητας του προϊόντος οι μέσες θερμοκρασίες ανά μήνα είναι απαραίτητο να βρίσκονται μέχρι τους 16 °C. Σε θερμοκρασίες άνω των 25 °C, δεν σχηματίζονται εύκολα συμπαγείς κεφαλές και γενικότερα, σταματάει η ανάπτυξη του φυτού. Αντίθετα, οι χαμηλές θερμοκρασίες κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης, επιφέρουν το σχηματισμό πρώιμων ανώριμων ανθοκεφαλών. Επίσης, σε θερμοκρασίες κάτω των 5 °C, επιβραδύνεται σε μεγάλο βαθμό η ανάπτυξη του φυτού. Η ευαισθησία του είναι μεγάλη, ιδιαίτερα όταν βρίσκεται σε νεαρό στάδιο ανάπτυξης. Οι υφιστάμενες ζημιές στο φυτό παρουσιάζονται μετά το σχηματισμό των ανθοκεφαλών. Για την παραγωγή καλύτερης ποιότητας ανθοκεφαλών, χρειάζονται ψυχρές νύχτες κατά το στάδιο σχηματισμού τους. Ωφέλιμες είναι οι θερμοκρασίες νύχτας 10-15 °C για διάστημα 20-30 ημερών. Σχετικά με τα ανθικά στελέχη, πρέπει να αναφερθεί ότι, ανάλογα με την ποικιλία αλλάζουν και οι ανάγκες έκθεσης σε χαμηλές θερμοκρασίες που απαιτούνται για να παραχθούν. Πιο συγκεκριμένα, οι πρώιμες και μέσης πρωιμότητας ποικιλίες δεν απαιτούν χαμηλές θερμοκρασίες για το σχηματισμό ανθικών στελεχών. Οι όψιμες ποικιλίες και όσες καλλιεργούνται το χειμώνα, χρειάζονται έκθεση σε παρατεταμένες χαμηλές θερμοκρασίες πριν την άνθιση (εαρινοποίηση). Σχετικά με τις εδαφικές απαιτήσεις, το άριστο pH που απαιτεί η συγκεκριμένη καλλιέργεια είναι το 6,5, ελαφρώς όξινο. Ο χρόνος που απαιτείται από τη μεταφύτευση έως τη συγκομιδή για το μπρόκολο, εκτιμάται από 60-110 ημέρες.

1.6.1. Δευτερογενείς μεταβολίτες στο μπρόκολο

Οι γλυκοζινολίτες, είναι μια ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών που απαντώνται σε όλα τα φυτά της οικογένειας *Brassicaceae*. Λαμβάνουν ιδιαίτερη προσοχή λόγω της σημασίας τους στην ανθρώπινη υγεία και στην άμυνα των φυτών. Η δομή τους φαίνεται στην παρακάτω εικόνα 1.3.



Εικόνα 1.3: Δομή γλυκοζινολίτη.

Οι γλυκοζινολίτες περιέχουν θείο και άζωτο. Πρόκειται για μία θειογλυκόζη ενωμένη με μια οξίμη που συνδέεται με τη σειρά της με ένα θειώδες ανιόν και μια πλευρική αλυσίδα προερχόμενη από αμινοξέα. Με βάση τη χημική δομή των πρόδρομων

αμινοξέων, οι γλυκοζινολίτες διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες, τους αλειφατικούς γλυκοζινολίτες από την αλανίνη, τη λευκίνη, την ισολευκίνη, την βαλίνη και την μεθειονίνη, τους αρωματικούς γλυκοζινολίτες από φαινυλαλαλίνη και τυροσίνη και τέλος τους ινδολο-γλυκοζινολίτες από την θρυπτοφάνη (Halkier & Gershenson, 2006). Οι κύριοι γλυκοζινολίτες του φυτού *Arabidopsis thaliana* προέρχονται από μεθειονίνη, φαινυλαλανίνη και θρυπτοφάνη (Grubb & Abel, 2006). Η βιοσύνθεσή τους πραγματοποιείται μέσω τριών ανεξάρτητων σταδίων. Κατά το πρώτο στάδιο, η αλυσίδα του πρόδρομου αμινοξέος επιμηκύνεται, στο δεύτερο στάδιο, γίνεται σχηματισμός του πυρήνα της δομής του γλυκοζινολίτη και στο τρίτο, ακολουθούν οι τελικές τροποποιήσεις στην πλευρική αλυσίδα (Sønderby et al., 2010). Πολλά προϊόντα της ενζυμικής υδρόλυσης των γλυκοζινολιτών είναι βιοδραστικά (Burrow & Halkier, 2017). Το μπρόκολο περιέχει σε μεγάλο ποσοστό τους γλυκοζινολίτες, γλυκοραφανίνη (*glucoraphanin*) και γλυκομπρασικίνη (*glucobrassicin*) (Ávila et al., 2013; Vallejo et al., 2003). Η υδρόλυση των δύο παραπάνω ουσιών, σε ουδέτερο pH, οδηγεί στην παραγωγή της σουλφοραφάνης (*sulforaphane*) και της ινδολοκαρβινόλης (*indole-3-carbinol*), αντίστοιχα (Bones & Rossiter, 2006; Traka & Mithen, 2008; Angelino & Jeffery, 2014). Οι ενώσεις αυτές είναι γνωστές για τις αντικαρκινικές, αντιδιαβητικές και αντιμικροβιακές τους ιδιότητες καθώς και για τη συμβολή τους στη μείωση της χοληστερόλης (Fujioka et al., 2016; Traka & Mithen, 2008; Fimognari & Hrelia, 2007).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το μπρόκολο είναι ένα φυτό το οποίο έχει την ικανότητα να συσσωρεύει Se, συνθέτοντας μεγάλα ποσά Se-μεθυλ-σεληνοκυστεΐνης (Se-methylselenocysteine SeMSCys), όταν καλλιεργείται σε εδάφη ή κάποιο μέσο που περιέχει Se (Whanger, 2002; Lyi et al., 2005). Πρόσφατες έρευνες δείχνουν ότι, το μπρόκολο σε αντίστοιχες περιπτώσεις, παράγει σεληνο-γλυκοζινολίτες (*selenoglucosinolates*), οι οποίοι διαθέτουν αντικαρκινικές ιδιότητες (Matich et al., 2015; Matich et al., 2012; Emmert et al., 2010). Ακόμα, η ενίσχυση της καλλιέργειας μπρόκολου με Se σε μικρές δόσεις, έχει δείξει ότι, επιφέρει μικρή επίδραση στην συγκέντρωση των γλυκοζινολιτών (McKenzie et al., 2017; Hsu et al., 2010; Kim & Juvik, 2011). Οι μικρές δόσεις σεληνίου, κατά την καλλιέργεια, επίσης, οδηγούν σε χαμηλή παραγωγή της βιοδραστικής Se-μεθυλ-σεληνοκυστεΐνης (Se-methylselenocysteine SeMSCys) στο μπρόκολο (Lyi et al., 2005). Καθώς, τα ωφέλιμα συστατικά που περιέχουν Se μπορούν να αυξηθούν σημαντικά με την αύξηση των δόσεων Se, πολλές μελέτες αποδεικνύουν ότι, η βιο-ενίσχυση με Se μειώνει το επίπεδο των γλυκοζινολιτών στο βλαστό και στις ανθοκεφαλές (Ávila et al., 2013; Mahn, 2017; Robbins et al., 2005). Η αρνητική αυτή επίδραση του σεληνίου στο περιεχόμενο των γλυκοζινολιτών, παρατηρήθηκε σε άλλα φυτά του γένους *Brassica* (Barickman et al., 2012; Charron et al., 2001; Schiavon et al., 2016). Αυτό το φαινόμενο, ίσως προκαλείται από την ανταγωνιστική δράση του Se με το θείο κατά την καλλιέργεια των φυτών. Ωστόσο, η επίδραση της βιο-ενίσχυσης με Se στα επίπεδα συγκεντρώσεων των γλυκοζινολιτών δεν είναι ακόμα ξεκάθαρη.

1.7. Φασματομετρία Ατομικής Απορρόφησης

1.7.1. Ατομική Φασματοσκοπία

Η βασική αρχή στην οποία στηρίζεται η ατομική φασματοσκοπία είναι η αλληλεπίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με κβαντωμένες ενεργειακές καταστάσεις των ατόμων. Διαχωρίζεται σε ατομική εκπομπή, ατομική απορρόφηση και ατομικό φθορισμό.

Στην ατομική απορρόφηση χρησιμοποιείται η ιδιότητα των ατόμων, ιόντων ή μορίων να απορροφούν και να εκπέμπουν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, καθώς αλλάζουν ενεργειακή κατάσταση. Η εκτίμηση της διαφοράς μεταξύ των ενεργειακών καταστάσεων βρίσκεται από την εξίσωση του MaxPlanck:

$$E = hv$$

Όπου, E είναι η ενεργειακή διαφορά μεταξύ των ενεργειακών επιπέδων των ατόμων, h είναι η σταθερά του Planck και v η συχνότητα της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας.

Έστω ότι, έχουμε ένα νέφος από άτομα ενός στοιχείου X. Όταν προσφερθεί ενέργεια σε αυτό το νέφος, όπως για παράδειγμα θερμότητα, τότε μερικά ηλεκτρόνια των ατόμων του X θα μεταπηδήσουν σε υψηλότερες στάθμες ενέργειας. Στη συνέχεια, θα αποδιεγερθούν και θα εκπέμψουν ακτινοβολία συγκεκριμένης συχνότητας η ένταση της οποίας είναι ένα μέτρο του αριθμού των ατόμων που έχουν διεγερθεί και συνεπώς των συνολικών ατόμων του νέφους. Χρησιμοποιώντας το κατάλληλο σύστημα, η ένταση της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας ενισχύεται και μετράται. Η διάταξη αυτή αποτελεί την αρχή της φασματομετρίας ατομικής εκπομπής (ΦΑΕ).

Όταν πέσει στο νέφος των ατόμων, ακτινοβολία της ίδιας συχνότητας v , τότε η απορρόφηση της ακτινοβολίας είναι ένα μέτρο της συγκέντρωσης των ατόμων του νέφους. Αυτή η διάταξη αποτελεί την αρχή της φασματομετρίας ατομικής απορρόφησης (ΦΑΑ).

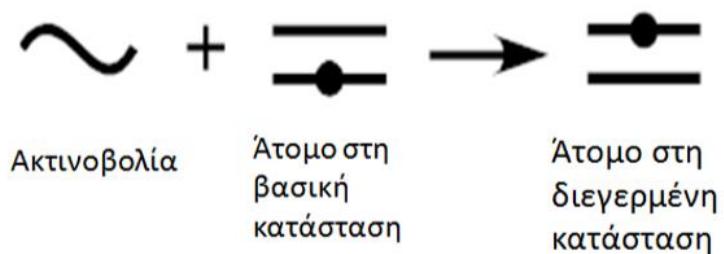
1.7.2. Φασματομετρία Ατομικής Απορρόφησης

Ατομική απορρόφηση ονομάζεται η απορρόφηση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας από τα άτομα. Αυτό συμβαίνει όταν στα άτομα ενός στοιχείου προσπέσει ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία συγκεκριμένου μήκους κύματος. Η εξερχόμενη ακτινοβολία από το νέφος των ατόμων είναι μικρότερης έντασης από την αρχική. Η ένταση της απορρόφησης είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των ατόμων και κατά συνέπεια ανάλογη της συγκέντρωσης του στοιχείου στο διάλυμα από το οποίο προέρχεται το ατομικό νέφος. Η ελάττωση της έντασης συνδέεται με την έννοια της ατομικής απορρόφησης σύμφωνα με τον νόμο των Beer-Lambert:

$$A = \log I_0/I = K_v \beta \log e = 0.4343 K_v \beta$$

Όπου A , συμβολίζεται η ατομική απορρόφηση, I_0 η ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, I η έντασης της εξερχόμενης ακτινοβολίας, K_v είναι συντελεστής ανάλογος του αριθμού των ατόμων ανά μονάδα όγκου και β είναι το μήκος που διασχίζει η ακτινοβολία μέσα από το ομοιογενές ατομικό νέφος.

Στην εικόνα 1.4 φαίνεται, σχηματικά, η διαδικασία της ατομικής απορρόφησης. Τα άτομα στη βασική τους κατάσταση απορροφούν ακτινοβολία συγκεκριμένου μήκους κύματος και μεταπίπτουν στη διεγερμένη κατάσταση. Όσα περισσότερα άτομα του στοιχείου βρίσκονται στην πορεία της ακτινοβολίας τόσο μεγαλύτερη είναι και η απορρόφησή της. Η ποσότητα της ακτινοβολίας που απορροφήθηκε αποτελεί το μέτρο της συγκέντρωσης του προσδιοριζόμενου στοιχείου, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως.



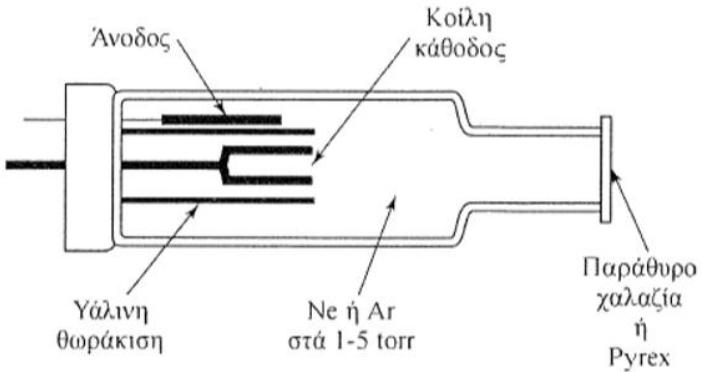
Εικόνα 1.4: Πορεία ατομικής απορρόφησης.

1.7.3. Πηγές ακτινοβολίας

Στη φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης, ως πηγές ακτινοβολίας χρησιμοποιούνται συνήθως λυχνίες γραμμιστού φάσματος κοίλης καθόδου (HCL) και εκκένωσης χωρίς ηλεκτρόδια (EDL).

1.7.3.1 Λυχνίες κοίλης καθόδου (Hollow-cathode lamp HCL)

Οι λυχνίες κοίλης καθόδου (Εικόνα 1.5) αποτελούνται από δύο ηλεκτρόδια που καλύπτονται από γυάλινο περίβλημα με παράθυρο από χαλαζία στο ένα άκρο.

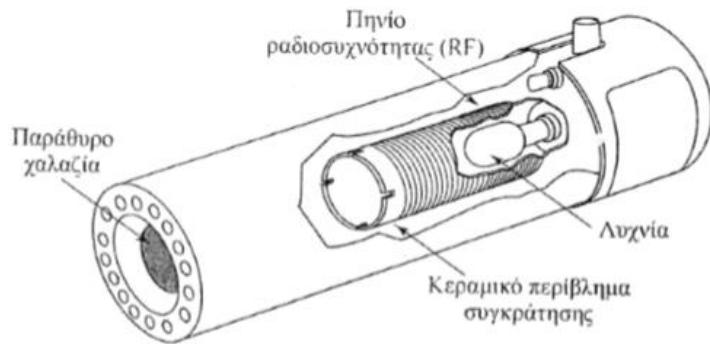


Εικόνα 1.5: Λυχνία κοίλης καθόδου (HCL).

Στον εσωτερικό χώρο υπάρχει μονοατομικό αέριο πλήρωσης νέον ή αργό σε πίεση από 1 – 5 Torr. Όταν εφαρμοστεί υψηλή διαφορά δυναμικού ανάμεσα στην άνοδο και την κάθοδο, τότε έχουμε ιονισμό του αερίου πλήρωσης με τα θετικά φορτισμένα ιόντα να επιταχύνονται προς την κάθοδο, η οποία είναι κατασκευασμένη από το μέταλλο που θα προσδιοριστεί. Κατά την πορεία προς την κάθοδο, η σύγκρουση των ιόντων με αυτή, επιφέρει εκδίωξη ατόμων του στοιχείου στην αέρια φάση. Πολλά από τα άτομα αυτά βρίσκονται σε διεγερμένες καταστάσεις και στην αποδιέγερσή τους εκπέμπουν ακτινοβολία ίδιας συχνότητας με αυτή που απορροφούν τα άτομα που πρόκειται να προσδιοριστούν. Τα περισσότερα από τα άτομα, έπειτα, συμπυκνώνονται και μένουν πάνω στην κάθοδο, ενώ υπάρχει και ένα άλλο μέρος των ατόμων το οποίο παραμένει στα γυάλινα τοιχώματα της λυχνίας.

1.7.3.2. Λυχνίες εκκένωσης χωρίς ηλεκτρόδια (Electrodeless discharge lamps- EDL)

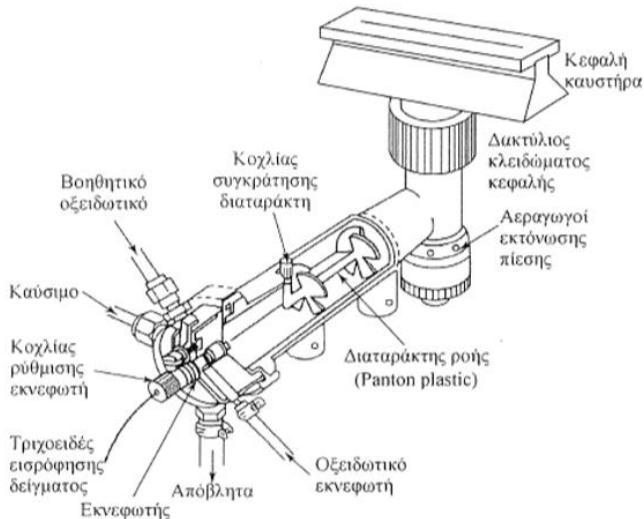
Οι λυχνίες εκκένωσης χωρίς ηλεκτρόδια (Εικόνα 1.6) παράγουν φάσματα ατομικών γραμμών και παρέχουν εντάσεις ακτινοβολίας μεγαλύτερες κατά δύο τάξεις μεγέθους από αυτές των λυχνιών κοίλης καθόδου. Αποτελούνται από ένα γυάλινο σωλήνα που είναι σφραγισμένος και περιέχει αδρανές αέριο (π.χ. αργό), σε πίεση λίγων Torr και μία μικρή ποσότητα του μετάλλου ή του άλατός του, το οποίο θα μετρηθεί. Για την ενεργοποίησή της χρειάζονται ισχυρά πεδία ραδιοσυχνοτήτων ή ακτινοβολία μικροκυμάτων. Έτσι, το αργό ιοντίζεται και παράγονται ιόντα του, επιταχύνονται και αποκτούν ενέργεια η οποία διεγείρει τα άτομα του μετάλλου. Εκπέμπουν ακτινοβολία πιο έντονη από αυτή των λυχνιών κοίλης καθόδου (HCL) και κατά συνέπεια έχουν μεγαλύτερη ευαισθησία.



Εικόνα 1.6: Λυγνία εκκένωσης χωρίς ηλεκτρόδια.

1.7.4. Φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης με φλόγα ως ατομοποιητή

Στη διάταξη της φασματοσκοπίας ατομικής απορρόφησης με φλόγα, αρχικά, υπάρχει ο λύχνος προανάμιξης (Εικόνα 1.7), στον οποίο το δείγμα μαζί με το οξειδωτικό (π.χ. αέρας, οξυγόνο, N_2O) και το καύσιμο αέριο (π.χ. ακετυλένιο, υδρογόνο) αναμιγνύονται πριν την εισαγωγή τους στη φλόγα, με θερμοκρασίες από 2300 - 3400 °K. Το υγρό δείγμα αναρριφάται στον ψεκαστήρα με ταχεία ροή οξειδωτικού και εκεί μετατρέπεται σε νέφος λεπτής υφής. Υστερα, διέρχεται σε έναν μετατροπέα, όπου διασπάται σε ακόμη μικρότερα σταγονίδια και τέλος, εισάγεται στη φλόγα. Όταν τα σταγονίδια εισέρχονται στη φλόγα, ο διαλύτης εξατμίζεται και λαμβάνει χώρα η ατομοποίηση των στοιχείων που μπορούν να απορροφήσουν ακτινοβολία χαρακτηριστικού μήκους κύματος για κάθε στοιχείο.



Εικόνα 1.7: Ο λύχνος προανάμιξης.

1.7.5. Φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης με γεννήτρια υδριδίων (HG-AAS)

Τα στοιχεία των ομάδων IVB, VB και VIB του περιοδικού πίνακα Ge, As, Se, Sn, Sb, Te, Pb, Bi, σχηματίζουν πτητικά υδρίδια. Έτσι, εμφανίζεται πρόβλημα σε σχέση με τη μικρή ευαισθησία και αρκετές παρεμποδίσεις στον προσδιορισμό αυτών των στοιχείων. Η ατομική απορρόφηση με γεννήτρια υδριδίων παρέχει την ικανότητα προσδιορισμού των παραπάνω στοιχείων χωρίς παρεμποδίσεις και προβλήματα ευαισθησίας. Στον πίνακα 1.3 φαίνονται τα μήκη κύματος της ακτινοβολίας που απορροφάται από τα παραπάνω στοιχεία.

Πίνακας 1.3: Μήκη κύματος των στοιχείων που σχηματίζουν υδρίδια.

Στοιχείο	Μήκος κύματος
Ge	265,2
As	193,7
Se	196,0
Sn	286,3
Sb	217,6
Te	214,3
Pb	283,3
Bi	223,1

Κατά το πρώτο στάδιο της διαδικασίας, προστίθεται στο διάλυμα κατάλληλο αναγωγικό αντιδραστήριο και σχηματίζεται το υδρίδιο του στοιχείου. Σε δεύτερο στάδιο, το υδρίδιο απελευθερώνεται στην αέρια φάση και τέλος, στο τρίτο στάδιο μεταφέρεται με απαέρωση στον ατομοποιητή / ανιχνευτή. Λόγω του ότι, τα μέταλλα όπως το αρσενικό (As) και το Se απορροφούν σε περιοχές κάτω των 200 nm, είναι απαραίτητος ο σωλήνας χαλαζία για την αποφυγή της παράλληλης απορρόφησης των παραπροϊόντων καύσης της φλόγας που επηρεάζουν σημαντικά τα όρια ανίχνευσης.

1.7.5.1. Αναγωγή με βοριοϋδρίδιο του νατρίου (NaBH_4)

Για τον σχηματισμό υδριδίων χρησιμοποιείται ως αναγωγικό το βοριοϋδρίδιο του νατρίου (NaBH_4) υπό όξινες συνθήκες. Σχηματίζονται τα πτητικά υδρίδια και με τη βοήθεια ενός αερίου (αργό ή άζωτο) μεταφέρονται στο θερμαινόμενο σωλήνα χαλαζία. Εκεί, τα υδρίδια ατομοποιούνται με μηχανισμούς θερμικής αποσύνθεσης, οξείδωσης με O_2 και με αντιδράσεις με ελεύθερες ρίζες υδρογόνου.

1.7.6. Παρεμποδίσεις στη ΦΑΑ

Στη φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης μπορούν να δημιουργηθούν παρεμποδίσεις, οι οποίες προκύπτουν από διάφορους παράγοντες. Η εμφάνιση παρεμποδίσεων προϋποθέτει τη θετική ή αρνητική μεταβολή του σήματος όταν η

συγκέντρωση του προσδιοριζόμενου στοιχείου παραμένει αμετάβλητη. Διακρίνονται σε φυσικές, χημικές και ιοντικές παρεμποδίσεις.

Στις φυσικές παρεμποδίσεις, σημαντικό ρόλο παίζουν το ιξώδες, η πυκνότητα, η επιφανειακή τάση και η τάση ατμών που επηρεάζουν τη μετατροπή του δείγματος σε νέφος. Κατά συνέπεια, το τελικό ποσοστό δείγματος που φτάνει στη φλόγα δεν είναι το πραγματικό. Για την αποφυγή αυτής της παρεμπόδισης είναι καλό τα διαλύματα να έχουν κοινές ιδιότητες (πυκνότητα κ.α.).

Οι φασματικές παρεμποδίσεις μπορεί να δημιουργηθούν όταν υπάρχει επικάλυψη του προσδιοριζόμενου στοιχείου από σήματα άλλων στοιχείων ή μορίων που συνυπάρχουν στο δείγμα. Ωστόσο, μπορεί να συμβεί και από σήματα που οφείλονται στη φλόγα. Υπάρχει, όμως, η δυνατότητα να αρθούν κάνοντας διόρθωση υποβάθρου με τη μέθοδο Zeeman και με τη μέτρηση του τυφλού δείγματος.

Οι χημικές παρεμποδίσεις είναι οι συνηθέστερες. Προέρχονται από τα συστατικά του δείγματος το οποίο μειώνει το ποσοστό ατομοποίησης του ζητούμενου στοιχείου. Αυτό γίνεται διακριτό, για παράδειγμα, στα ανιόντα SO_4^{2-} και PO_4^{3-} , τα οποία παρεμποδίζουν την ατομοποίηση του Ca^{2+} λόγω σχηματισμού μη πτητικών αλάτων. Η αποφυγή αυτής της παρεμπόδισης μπορεί να γίνει με αύξηση της θερμοκρασίας της φλόγας ή με χρήση ορισμένων αντιδραστηρίων που βοηθούν στην αποδέσμευση του ενδιαφερόμενου στοιχείου.

Στις παρεμποδίσεις ιοντισμού, η θερμοκρασία της φλόγας είναι αρκετά μεγάλη με αποτέλεσμα τα άτομα που βρίσκονται στη βασική κατάσταση να ιοντίζονται και να μειώνεται η απορρόφησή τους. Για την αντιμετώπιση αυτών των παρεμποδίσεων, μπορεί να προστεθεί περίσσεια του ιοντιζόμενου στοιχείου.

1.7.7. Προκατεργασία δειγμάτων στην ατομική απορρόφηση για τον προσδιορισμό των μετάλλων

Στην ατομική απορρόφηση για τον προσδιορισμό των μετάλλων, χρειάζεται να προηγηθεί μία προκατεργασία στα δείγματα, με σκοπό να μετατραπούν σε μία κατάλληλη μορφή για την ανάλυση. Οι τεχνικές προκατεργασίας είναι, η ξηρή και η υγρή τεφροποίηση καθώς και η πέψη με τη βοήθεια μικροκυμάτων.

Στην ξηρή τεφροποίηση το δείγμα θερμαίνεται σε ελεγχόμενη ατμόσφαιρα μέχρι να καταστραφεί η οργανική ύλη και τα ανόργανα συστατικά να γίνουν τέφρα. Υστερα, διαλυτοποιείται το στερεό υπόλειμμα με ένα οξύ ή με μίγματα οξέων και πραγματοποιείται μέτρηση των μετάλλων στο τελικό διάλυμα.

Από την άλλη, στην υγρή τεφροποίηση το δείγμα με τη χρήση ορυκτών οξέων και υγρών αντιδραστηρίων, αποσυντίθενται και διαλυτοποιείται. Αυτές οι δύο τεχνικές, ωστόσο, έχουν το μειονέκτημα της απαίτησης αρκετού χρόνου, της πιθανής απώλειας μετάλλων κατά την εξάτμιση των διαλυτών καθώς και ατελή πέψη του δείγματος.

Τα τελευταία χρόνια, όμως, έχουν γίνει περισσότερο χρήσιμοι στις εργαστηριακές έρευνες, οι φούρνοι μικροκυμάτων οι οποίοι δίνουν τη δυνατότητα πέψης μεγάλου αριθμού δειγμάτων, σε μικρό χρονικό διάστημα (Altundag & Tuzen, 2011; Demirel et al, 2008; McCarthy & Ellis, 1991).

1.7.7.1. Υγρή πέψη με οξειδωτική αποσύνθεση

Η προκατεργασία της υγρής όξινης πέψης είναι κατάλληλη για τα δείγματα με οργανικές ουσίες πριν τον προσδιορισμό των μετάλλων. Η διαδικασία αυτή προϋποθέτει ότι τα ζητούμενα στοιχεία μεταφέρονται πλήρως στο τελικό διάλυμα πριν τον προσδιορισμό τους. Στόχος της τεχνικής αυτής είναι, η διαλυτοποίηση του δείγματος με τα μεταφερόμενα συστατικά να βρίσκονται σε διαλυτή μορφή, το αρχικό υπόστρωμα του δείγματος να διασπαστεί καθώς και να αποφευχθούν τυχόν επιμολύνσεις του δείγματος.

Τα χρησιμοποιούμενα διαλύματα στην υγρή όξινη πέψη είναι οξέα ή μίγματα οξέων (HCl , HNO_3 , HF , H_2SO_4), υπεροξείδιο του υδρογόνου H_2O_2 κ.α.. Μεταφέρονται σε ανοιχτά ή κλειστά δοχεία για να γίνει η διαλυτοποίηση του δείγματος. Στην περίπτωση των κλειστών δοχείων με ταυτόχρονη θέρμανση, η πίεση αυξάνεται με αποτέλεσμα πιο έντονες συνθήκες εντός του δοχείου. Αυτό προσφέρει μεγαλύτερη απόδοση στην πέψη του δείγματος και λιγότερο χρόνο. Αντίθετα, όταν η διαδικασία πραγματοποιείται σε ανοιχτά δοχεία, η θέρμανση γίνεται στη θερμοκρασία βρασμού του οξέος. Όσο μεγαλύτερη είναι η θερμοκρασία πέψης του δείγματος, τόσο περισσότερος χρόνος απαιτείται για την ψύξη αυτού μέχρι τη θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Στην πέψη οργανικών δειγμάτων, οι οργανικές ενώσεις αποκοδομούνται και ο άνθρακας μετατρέπεται σε διοξείδιο του άνθρακα. Έτσι, έχουμε απελευθέρωση και μεταφορά των ζητούμενων στοιχείων στο τελικό διάλυμα. Άρα, για να γίνει η λήψη των μετάλλων από τις πρωτεΐνες με τις οποίες είναι συνδεδεμένα χρειάζεται να προηγηθεί η ολοκληρωτική καταστροφή του οργανικού υποστρώματος.

1.7.7.2. Υγρή όξινη πέψη υποβιοηθούμενη από μικροκύματα

Η τεχνική της υγρής όξινης πέψης με μικροκύματα σε ανοιχτά ή κλειστά δοχεία είναι μία πρότυπη μέθοδος στη στοιχειακή ανάλυση. Η ενέργεια των μικροκυμάτων στη διαδικασία πέψης, μειώνει τον χρόνο χώνευσης, παρέχει τη δυνατότητα ελέγχου πίεσης και θερμοκρασίας, την ασφάλεια του χειριστή, την αυτοματοποίηση της διαδικασίας, την ελαχιστοποίηση της απώλειας των μετάλλων, αλλά και επιμόλυνσης εφόσον χρησιμοποιούνται κλειστά δοχεία.

Τα τμήματα από τα οποία αποτελείται ένας εργαστηριακός φούρνος μικροκυμάτων είναι, η γεννήτρια μικροκυμάτων, ο οδηγός μικροκυμάτων, ο κυρίως θάλαμος, ο αναμίκτης, ο τελικός κυκλοφορητής και η περιστρεφόμενη τράπεζα.

1.7.7.3. Οξέα στην υγρή όξινη πέψη

Όπως έχει αναφερθεί, η χρησιμότητα της όξινης πέψης είναι η απελευθέρωση των μετάλλων από το οργανικό υπόστρωμα του δείγματος και η διαλυτοποίησή τους ώστε να είναι δυνατή η μέτρησή τους. Για να πραγματοποιηθεί αυτό, σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν τα οξέα που θα χρησιμοποιηθούν. Η μέθοδος μέτρησης καθώς και το υπόστρωμα του δείγματος είναι δύο βασικοί παράγοντες για την επιλογή των οξέων. Πιο συγκεκριμένα, στην περίπτωση του προσδιορισμού βαρέων μετάλλων με φασματομετρία ατομικής απορρόφησης με φούρνο γραφίτη, η χρήση HCl θα αποτελούσε πρόβλημα λόγω της εμφάνισης παρεμποδίσεων από τα χλωριούχα ιόντα. Από την άλλη, το παραπάνω οξύ επαρκεί σε δείγματα που οξειδώνονται εύκολα αλλά θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν και μίγματα όπως, HCl–HNO₃ και HCl–H₂SO₄. Το σύνηθες οξύ που χρησιμοποιείται είναι το νιτρικό οξύ (HNO₃) μεμονωμένα ή σε συνδυασμό με άλλα οξέα. Το κύριο πλεονέκτημα αυτού του οξέος είναι η διπλή δράση που διαθέτει ως οξύ και ως οξειδωτικό. Λειτουργώντας σαν οξύ, διαλυτοποιεί τα ανόργανα οξείδια των μετάλλων και σαν οξειδωτικό, οξειδώνει μεταλλα μηδενικού σθένους και τα μετατρέπει σε ευδιάλυτη ιοντική μορφή.

Κεφάλαιο 2. Στόχοι της μεταπτυχιακής μελέτης

Όπως ήδη έχει αναφερθεί στο θεωρητικό μέρος της παρούσας μελέτης, το μπρόκολο περιέχει υψηλό ποσοστό θειούχων ενώσεων. Από αυτές, οι γλυκοζινολίτες και τα προϊόντα υδρόλυσης τους έχουν ερευνηθεί για τις αντικαρκινικές, αντιδιαβητικές και αντιμικροβιακές τους ιδιότητες. Το μπρόκολο έχει την ικανότητα να απορροφά το Se μέσα από το μεταβολικό μονοπάτι του θείου. Το Se είναι ένα βασικό ιχνοστοιχείο το οποίο συμβάλλει στην προστασία των κυττάρων από την επίδραση των υπεροξειδασών, αλλά κυρίως στην καλή λειτουργία του θυρεοειδούς αδένα. Λόγω της έλλειψης σεληνίου που παρουσιάζεται σε πολλούς ανθρώπους, η οποία οφείλεται σε διατροφικούς παράγοντες, καταβάλλονται προσπάθειες για την ενίσχυση των τροφίμων με Se.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, πρώτος στόχος της μεταπτυχιακής μελέτης είναι η καλλιέργεια του μπρόκολου με βιοενίσχυση Se. Για το λόγο αυτό θα επιλεγούν δύο διαφορετικοί τρόποι καλλιέργειας, α) συμβατική και β) υδροπονική. Η συμβατική καλλιέργεια θα γίνει με φυτά μπρόκολου ποικιλίας Marathon. Τα φυτά μπρόκολου θα χωριστούν σε τρεις ομάδες, ώστε να γίνει σύγκριση του ποσοστού σεληνίου που θα απορροφηθεί από αυτά. Η μία ομάδα θα είναι τα δείγματα ελέγχου, όπου δεν θα χορηγηθεί Se. Στις επόμενες δύο ομάδες θα χορηγηθεί διάλυμα Se δυο διαφορετικών συγκεντρώσεων (6 mM & 12 mM / L χώματος) ανά εφαρμογή.

Η υδροπονική καλλιέργεια θα γίνει σε φυτά μπρόκολου ποικιλίας Sonora σε ελεγχόμενες συνθήκες. Τα φυτά θα χωριστούν σε ομάδες. Η πρώτη ομάδα θα ποτιστεί μόνο με το θρεπτικό υλικό (χωρίς Se), η δεύτερη ομάδα με το θρεπτικό υλικό και διάλυμα σεληνίου 1,5 mM, η τρίτη ομάδα με το θρεπτικό υλικό και διάλυμα σεληνίου 3 mM. Η τέταρτη θα χωριστεί σε δυο υποομάδες εκ των οποίων η μια θα ποτιστεί με το διάλυμα σεληνίου 1,5 mM και η άλλη υποομάδα με το διάλυμα σεληνίου 3 mM. Από την τέταρτη μέχρι και την έβδομη εβδομάδα καλλιέργειας θα εφαρμοστεί στην τέταρτη ομάδα το θρεπτικό υλικό άνευ θείου. Η αφαίρεση του θείου θα γίνει με στόχο να διευρευνηθεί το ενδεχόμενο της αυξημένης απορρόφησης του Se από τα φυτά λόγω της απουσίας του θείου.

Μετά την ολοκλήρωση της καλλιέργειας, θα ακολουθήσει η συγκομιδή των φυτών και η δημιουργία δειγμάτων. Ο διαχωρισμός των φυτών μπρόκολου θα περιλαμβάνει, δείγματα ανθοκεφαλών, φύλλων, βλαστών και ριζών μπρόκολου. Τα δείγματα αυτά θα καταψυχθούν και ακολούθως θα γίνει ξήρανση με λυοφιλίωση μέχρι την πραγματοποίηση των αναλύσεων.

Επόμενος στόχος της μελέτης είναι, η μέτρηση του ολικού σεληνίου με Φασματοσκοπία Ατομικής Απορρόφησης με γεννήτρια υδριδίων (HG-AAS). Η συγκεκριμένη μέθοδος θεωρείται η καταλληλότερη για τη μέτρηση του σεληνίου, καθότι το σελήνιο είναι ένα πτητικό ιχνοστοιχείο και επιπλέον παρουσιάζει το πλεονέκτημα ότι περιορίζει το πρόβλημα των φασματικών παρεμβολών.

Τέλος, θα γίνει ταυτοποίηση των προϊόντων ενζυμικής υδρόλυσης των γλυκοζινολιτών (ισοθειοκυανικές ενώσεις και παράγωγα του ινδολίου) στα δείγματα της συμβατικής καλλιέργειας μπρόκολου με αέρια χρωματογραφία – φασματομετρία μάζας χρησιμοποιώντας τη βιβλιοθήκη της NIST.

Κεφάλαιο 3. Πειραματικό Μέρος

Τα φυτά της οικογένειας *Brassicaceae*, στην οποία ανήκει το μπρόκολο (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) απορροφούν το σελήνιο σε μεγάλες ποσότητες. Η χορήγηση του Se στα φυτά αυτά μπορεί να γίνει με τρεις τρόπους. Ο πρώτος είναι με υδροπονική καλλιέργεια, εμπλουτίζοντας το θρεπτικό διάλυμα με το σελήνιο. Ο δεύτερος πραγματοποιείται στη συμβατική καλλιέργεια, ποτίζοντας απευθείας με διάλυμα σεληνίου και τέλος ο τρίτος τρόπος είναι με ψεκασμό των φύλλων του φυτού με το αντίστοιχο διάλυμα. Ο σχεδιασμός του πειράματος βασίστηκε σε βιβλιογραφικές αναφορές (Hsu et al., 2011; Mahn, 2017; Wiesner-Reinhold et al., 2017).

Η εισαγωγή του σεληνίου στην καλλιέργεια του μπρόκολου γίνεται με τη λίπανση και διακρίνεται σε βασική και επιφανειακή. Η βασική λίπανση λαμβάνει χώρα κατά το στάδιο της προετοιμασίας του εδάφους και πριν την εγκατάσταση των φυτών σε αυτό, ενώ η επιφανειακή λίπανση πραγματοποιείται σε δύο ή και περισσότερες δόσεις μετά την εγκατάσταση των φυτών στο χωράφι, ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας (Σάββας και Παπάζης, 2009).

Ο πειραματικός σχεδιασμός της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης βασίζεται στην επιφανειακή λίπανση του μπρόκολου σε συμβατική καλλιέργεια στο χώμα και σε υδροπονική καλλιέργεια υπό ελεγχόμενες συνθήκες.

Τα στάδια της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης είναι: 3.1. Συμβατική καλλιέργεια μπρόκολου, 3.2. Υδροπονική καλλιέργεια μπρόκολου, 3.3. Ξήρανση φυτικού υλικού, 3.4. Προσδιορισμός ολικού σεληνίου στα δείγματα με φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης με γεννήτρια υδριδίων, 3.5. Ταυτοποίηση ισοθειοκυανικών και ινδολικών ενώσεων με αέρια χρωματογραφία – φασματομετρία μάζας (GC-MS).

3.1 Συμβατική καλλιέργεια μπρόκολου

3.1.1 Διαδικασία συμβατικής καλλιέργειας μπρόκολου

Για την υλοποίηση της συμβατικής καλλιέργειας μπρόκολου, χρειάστηκαν:

- 16 Φυτά μπρόκολου, ποικιλίας Marathon
- Χώμα εμπορίου για λαχανικά
- 16 γλάστρες χωρητικότητας 8 L και 16 πλαστικά πιάτα
- Οικιακό φτυάρι
- Ογκομετρικός σωλήνας
- Sodium Selenate 98%, Na₂SeO₄
- 2 ογκομετρικές φιάλες των 1000 mL
- Αναλυτικός ζυγός
- Αλουμινόχαρτο
- Μεταλλική σπάτουλα

- Ποτήρια ζέσεως
- Γάντια

Για την πραγματοποίηση της καλλιέργειας, αγοράστηκαν από την αγορά της Αθήνας 16 φυτά μπρόκολου, ποικιλίας Marathon.



Εικόνα 3.1: Τα φυτά μπρόκολου ποικιλίας Marathon.

Στις 24/9/2018 τα φυτά μεταφυτεύθηκαν σε γλάστρες χρησιμοποιώντας χώμα εμπορίου 8 L. Το πότισμα γινόταν αρχικά σε καθημερινή βάση και στην πορεία εβδομαδιαίως με 250 mL νερού δικτύου.



Εικόνα 3.2: Η πρώτη μεταφύτευση 10 φυτών.

Ακολούθησε ομαδοποίηση των φυτών ανά συγκέντρωση διαλύματος Na_2SeO_4 που χρησιμοποιήθηκε σε 3 ομάδες ως εξής:

A Control → 4 φυτά (0 mM Na₂SeO₄)

B → 6 φυτά (6 mM Na₂SeO₄)

Γ → 6 φυτά (12 mM Na₂SeO₄)

Ομάδα A Control	Ομάδα B	Ομάδα Γ
	Six plants in black pots labeled B (6 mM Na ₂ SeO ₄). The plants appear slightly taller and more robust than the control.	Six plants in black pots labeled Γ (12 mM Na ₂ SeO ₄). The plants appear slightly shorter and less dense than the B group.

Παρασκευάστηκαν δύο διαλύματα Na₂SeO₄, διαφορετικής συγκέντρωσης. Η ομάδα Β ποτίστηκε με 40 mL διαλύματος 6 mM και η ομάδα Γ με 40 mL διαλύματος 12 mM.

Για τις παρασκευές των διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι τύποι: C = n / V και n = m/Mr.

Παρασκευή διαλύματος Na₂SeO₄ 6 mM: Ζυγίζονται 1,129 g Na₂SeO₄ (M.B. 188) σε αναλυτικό ζυγό ακριβείας και διαλύονται σε απιονισμένο νερό και μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 1000 mL. Ο όγκος συμπληρώνεται με απιονισμένο νερό μέχρι τη χαραγή και η φιάλη ανακινείται.

Παρασκευή διαλύματος Na₂SeO₄ 12 mM: Ζυγίζονται 2,258 g Na₂SeO₄ σε αναλυτικό ζυγό ακριβείας και διαλύονται σε απιονισμένο νερό και μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 1000 mL. Ο όγκος συμπληρώνεται με απιονισμένο νερό μέχρι τη χαραγή και η φιάλη ανακινείται.

Το πότισμα με το διάλυμα Se ξεκίνησε στις 15/10/2018 και διήρκησε μέχρι τις 28/11/2018, συνολικά 7 εβδομάδες. Η εφαρμογή γινόταν μία φορά την εβδομάδα, ρίχνοντας 40 mL δ/τος με πλαστική σύριγγα από το κάθε διάλυμα στα αντίστοιχα φυτά ένα προς ένα. Η συγκομιδή των φυτών έγινε στις 21/12/2018.

Επειδή ο όγκος του χώματος στις γλάστρες ήταν 8 L η ποσότητα του σεληνίου για τα φυτά της ομάδας Β θα είναι [40 mL*6 mmol/L]/8 L = 30 μmol / L χώματος, ανά εφαρμογή. Συνολικά 30 μmol*7 εβδομάδες = 210 μmol / L χώματος. Αντίστοιχα για τα φυτά της ομάδας Γ η τελική ποσότητα σεληνίου θα είναι [40 mL*12 mmol/L]/8 L = 60 μmol / L χώματος, ανά εφαρμογή. Συνολικά 60 μmol*7 εβδομάδες = 420 μmol.

Παρακάτω, φαίνεται ο εβδομαδιαίος πίνακας ποτίσματος των φυτών για την συμβατική καλλιέργεια που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο.

Πίνακας 3.1: Πρόγραμμα ποτίσματος συμβατικής καλλιέργειας των φυτών μπρόκολου.

(α)

Ομάδες φυτών	1η Εβδομάδα		2η Εβδομάδα		3η Εβδομάδα		4η Εβδομάδα		5η Εβδομάδα		6η Εβδομάδα	
	Λίπανση με Se 6 mM	Λίπανση με Se 12 mM	Λίπανση με Se 6 mM	Λίπανση με Se 12 mM	Λίπανση με Se 6 mM	Λίπανση με Se 12 mM	Λίπανση με Se 6 mM	Λίπανση με Se 12 mM	Λίπανση με Se 6 mM	Λίπανση με Se 12 mM	Λίπανση με Se 6 mM	Λίπανση με Se 12 mM
A Control	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	-	-	-	-	-	-	√	-	√	-	√	-
Γ	-	-	-	-	-	-	-	-	√	-	-	√

(β)

Ομάδες φυτών	7η Εβδομάδα		8η Εβδομάδα		9η Εβδομάδα		10η Εβδομάδα		11η Εβδομάδα		12η Εβδομάδα		13η Εβδομάδα	
	Λίπανση με Se 6 mM	Λίπανση με Se 12 mM	Λίπανση με Se 6 mM	Λίπανση με Se 12 mM	Λίπανση με Se 6 mM	Λίπανση με Se 12 mM	Λίπανση με Se 6 mM	Λίπανση με Se 12 mM	Λίπανση με Se 6 mM	Λίπανση με Se 12 mM	Λίπανση με Se 6 mM	Λίπανση με Se 12 mM	Λίπανση με Se 6 mM	Λίπανση με Se 12 mM
A Control	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	√	-	√	-	√	-	√	-	-	-	-	-	-	-
Γ	-	√	-	√	-	√	-	√	-	-	-	-	-	-

Στις 21/12/2018, όπου συμπληρώθηκαν 13 εβδομάδες καλλιέργειας για τις ομάδες των φυτών Α (control), Β και Γ, έγινε η συλλογή των φύλλων και των βλαστών από όλα τα φυτά. Στην πορεία, ζυγίστηκαν αμέσως σε αναλυτικό ζυγό, μεταφέρθηκαν σε σακούλα polybag και καταψύχθηκαν στους -20 °C μέχρι το επόμενο στάδιο, την ξήρανση με λυοφιλίωση.

3.1.2 Εικόνες της συμβατικής καλλιέργειας μπρόκολου

Παρακάτω παρουσιάζονται ανά εβδομάδα, τα φυτά που καλλιεργήθηκαν συμβατικά, στο χώμα, στο χώρο του εργαστηρίου Χημείας.

1^η Εβδομάδα (24 - 30/9) – Μεταφύτευση



2^η Εβδομάδα (1 – 7/10) – Διαχωρισμός στις 3 ομάδες.

Ομάδα Α Control	Ομάδα Β	Ομάδα Γ

3 ^η Εβδομάδα (8 – 14/10)	
Ομάδα A Control και ομάδα B	Ομάδα Γ
	

4 ^η Εβδομάδα (15 – 21/10) – Εφαρμογή του 1 ^{ον} ποτίσματος με Se	
Ομάδα A Control (οι γλάστρες πίσω δεξιά), ομάδα B (οι γλάστρες μπροστά) και ομάδα Γ (οι γλάστρες πίσω αριστερά).	

5 ^η Εβδομάδα (22 – 28/10) – Εφαρμογή του 2 ^{ον} ποτίσματος με Se	
Ομάδα A Control (οι γλάστρες πίσω δεξιά), ομάδα B (οι γλάστρες μπροστά) και ομάδα Γ (οι γλάστρες πίσω αριστερά).	

6^η Εβδομάδα (29/10 – 4/11) – Εφαρμογή 3^{ου} ποτίσματος με Se

Ομάδα A Control (οι γλάστρες πίσω δεξιά), ομάδα B (οι γλάστρες μπροστά) και ομάδα Γ (οι γλάστρες αριστερά).



9^η Εβδομάδα (19 – 25/11) – Εφαρμογή 6^{ου} ποτίσματος με Se

Ομάδα A Control (οι γλάστρες πίσω δεξιά), ομάδα B (οι γλάστρες μπροστά) και ομάδα Γ (οι γλάστρες αριστερά).



10^η Εβδομάδα (26/11 – 2/12) – Εφαρμογή 7^{ου} ποτίσματος με Se
(τελευταίο πότισμα)

Ομάδα A Control (οι γλάστρες πίσω δεξιά), ομάδα B (οι γλάστρες μπροστά) και ομάδα Γ (οι γλάστρες αριστερά).



13 ^η Εβδομάδα (17 – 21/12) – Τελευταία εβδομάδα πριν τη συγκομιδή		
Ομάδα A Control	Ομάδα B	Ομάδα Γ
		

3.2 Υδροπονική καλλιέργεια μπρόκολου

3.2.1 Διαδικασία υδροπονικής καλλιέργειας μπρόκολου

Για την διεξαγωγή της υδροπονικής καλλιέργειας μπρόκολου, χρειάστηκαν:

- 60 Φυτάρια μπρόκολου ποικιλίας Sonora
- 60 γλάστρες 4 L
- Περλίτης
- KNO_3
- $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$
- $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$
- MgSO_4
- KCl
- H_3BO_3
- MnSO_4
- ZnSO_4
- CuSO_4
- H_2MoO_4
- NaFeEDTA
- Διάλυμα KOH
- Πεχάμετρο
- Πλαστικά δοχεία
- Πλαστική σύριγγα
- Μεγάλο πλαστικό χωνί
- 2 ογκομετρικές φιάλες των 2000mL
- 1 ογκομετρική φιάλη των 1000mL

Η συγκεκριμένη καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σε θερμοκήπιο, το οποίο παραχωρήθηκε από τη «Γεωπονική ΑΕ» στην περιοχή του Κορωπίου Αττικής. Χορηγήθηκαν 60 φυτά μπρόκολου, ποικιλίας Sonora, τα οποία ομαδοποιήθηκαν ανά 15 και δημιουργήθηκαν 4 κύριες ομάδες, Α, Β, Γ, Δ.

Η κάθε ομάδα είχε 15 φυτά, στα οποία εφαρμόστηκε κοινό πότισμα με το ίδιο θρεπτικό υλικό εκτός της τελευταίας. Η ομάδα Δ, με 15 φυτά, ποτίστηκε με θρεπτικό υλικό που δεν περιείχε το στοιχείο του θείου (S). Επιπλέον χωρίστηκε σε δύο υποομάδες, τη Δ1 και τη Δ2, όπου χορηγήθηκε διάλυμα Se 1,5 mM και 3 mM αντίστοιχα ανά εφαρμογή. Ο διαχωρισμός βασίστηκε στη διαφορετική συγκέντρωση του διαλύματος Se που χορηγήθηκε κατά τη λίπανση των φυτών και στη διαφορά σύστασης του θρεπτικού υλικού, για την ομάδα Δ και τις υποομάδες της. Συνεπώς, η ομάδα Α αποτέλεσε τα 15 φυτά control και ποτίστηκε μόνο με το θρεπτικό υλικό, η ομάδα Β ποτίστηκε με διάλυμα Se 1,5 mM και το θρεπτικό υλικό, η ομάδα Γ με διάλυμα Se 3 mM και το θρεπτικό υλικό, η ομάδα Δ με το θρεπτικό υλικό άνευ θείου (S), η υποομάδα Δ1 με το διάλυμα Se 1,5 mM και το θρεπτικό υλικό άνευ S και η υποομάδα Δ2 με το διάλυμα Se 3 mM και το θρεπτικό υλικό άνευ S.

Όπως και στην καλλιέργεια του εδάφους, έτσι και στην υδροπονική απαιτούνται ορισμένα στοιχεία προκειμένου το φυτό να αναπτυχθεί. Στην υδροπονική καλλιέργεια χρησιμοποιείται το θρεπτικό διάλυμα, το οποίο έρχεται σε άμεση επαφή με το ριζικό σύστημα του φυτού και αποτελείται από νερό και λιπάσματα. Σημαντικά θρεπτικά στοιχεία του διαλύματος αυτού αποτελούν τα μακροθρεπτικά, άζωτο (N), φώσφορο (P), κάλιο (K), ασβέστιο (Ca), μαγνήσιο (Mg), τα μικροθρεπτικά, μαγγάνιο (Mn), ψευδάργυρος (Zn), σίδηρος (Fe), χαλκός (Cu), βόριο (B), μολυβδαίνιο (Mo), χλώριο (Cl), και τα ωφέλιμα στοιχεία, νάτριο (Na), πυρίτιο (Si) και κοβάλτιο (Co). Το κάθε ένα παίζει το δικό του ρόλο στην ανάπτυξη του μπρόκολου. Το άζωτο συμμετέχει στη δημιουργία αμινοξέων που παράγουν τις πρωτεΐνες, ο φώσφορος επηρεάζει, μέσω των βιοχημικών αντιδράσεων στις οποίες συμμετέχει, το μεταβολισμό των υδατανθράκων και τη μεταφορά ενέργειας, το κάλιο συμμετέχει στη ρύθμιση της υδατικής ισορροπίας στους φυτικούς ιστούς γιατί παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της λειτουργίας των στομάτων στα φύλλα, το ασβέστιο αποτελεί συνδετική ουσία μεταξύ των κυτταρικών τοιχωμάτων, συμβάλλει στην ενεργοποίηση ενζύμων, στη γονιμοποίηση των ανθέων και συμμετέχει ενεργά στην επιμήκυνση των κυττάρων και ιδιαίτερα των βλαστών. Το μαγνήσιο συνδέεται άμεσα με τη φωτοσυνθετική δραστηριότητα του φυτού, το θείο αποτελεί συστατικό των αμινοξέων και των γλυκοζινολιτών στα οποία οφείλεται η ξεχωριστή οσμή και γεύση των σταυρανθών. Ο σίδηρος είναι συστατικό ενζύμων και κύριο στοιχείο της πρωτεΐνης που ονομάζεται φερεδοξίνη και συμμετέχει έμμεσα στη παραγωγή της χλωροφύλλης, στον έλεγχο της αλανίνης και στη σύνθεση των πρωτεΐνων. Ο ψευδάργυρος σχετίζεται με το μεταβολισμό των υδατανθράκων, των πρωτεΐνων και του RNA των φυτών, ενώ παίζει σημαντικό ρόλο σαν μεταλλικό συστατικό ενζύμων ή σαν ρυθμιστικός παράγοντάς της δραστηριότητάς τους, αφού λαμβάνει μέρος στις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις. Το μαγγάνιο εμπλέκεται στην αύξηση και στην ανάπτυξη των φυτών

επειδή παράγει ηλεκτρόνια εξαιτίας των μεταβολών του σθένους του και έτσι εμπλέκεται στις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στο φυτό. Ο χαλκός λαμβάνει μέρος σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, συμβάλλει στη φωτοσύνθεση, συμμετέχει στους χλωροπλάστες και αποτελεί συστατικό ενζύμων που συνδέονται με την αύξηση των φυτών. Το μολυβδαίνιο συμμετέχει σε δύο ενζυμικά συστήματα που ονομάζονται νιτρογενάση και νιτρική ρεδουκτάση. Το βόριο συμμετέχει στη δημιουργία αζωτούχων βάσεων και στη σύνθεση των πρωτεϊνών μέσω του RNA. Το χλώριο συμμετέχει στη διάσπαση του νερού, στη φωτοσύνθεση, στη φωσφοριλίωση και στην έκκληση του οξυγόνου (Κουκουλάκης, Παπαδόπουλος, 2003).

Το πότισμα και η προετοιμασία του θρεπτικού υλικού έγινε ως εξής:

Στις 24/10/2018 έγινε η φύτευση των 60 φυτών μπρόκολου, ποικιλίας Sonora, σε γλάστρες των 4 L με αδρανές υλικό, περλίτη. Χωρίστηκαν σε τέσσερις ομάδες και οι γλάστρες τοποθετήθηκαν σε διαμορφωμένο χώρο που έφερε νάυλον και προστέθηκε νερό σε κάθε χώρο όπως φαίνεται στην παρακάτω φωτογραφία.



Εικόνα 3.3: Τα φυτά μπρόκολου την ημέρα της μεταφύτευσης

Εφαρμόστηκε φυτοπροστασία με ψεκασμό με εντομοκτόνα (Acetamiprid, Abamectin, Pymetrozine) και μυκητοκτόνα (Mancozeb, Propineb, Captan), ανά τακτά χρονικά διαστήματα (13-15-20-22-27/1/2019).

Θρεπτικό υλικό ποτίσματος:

Παρασκευή διαλύματος Δ1 KNO₃ 1M: Ζυγίστηκαν 101,1 g νιτρικού καλίου KNO₃ σε αναλυτικό ζυγό και διαλύθηκαν σε ένα ποτήρι ζέσεως με απιονισμένο νερό. Μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 1000 mL, προστέθηκε απιονισμένο νερό, πραγματοποιήθηκε η διάλυση του άλατος με ανακίνηση και τέλος συμπληρώθηκε ο όγκος της φιάλης μέχρι την χαραγή με απιονισμένο νερό.

Παρασκευή διαλύματος Δ2 Ca(NO₃)₂·4H₂O 1M: Ζυγίστηκαν 236,16 g νιτρικού ασβεστίου Ca(NO₃)₂·4H₂O σε αναλυτικό ζυγό και διαλύθηκαν σε ένα ποτήρι ζέσεως με απιονισμένο. Μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 1000 mL, προστέθηκε απιονισμένο νερό, πραγματοποιήθηκε η διάλυση του άλατος με ανακίνηση και τέλος συμπληρώθηκε ο όγκος της φιάλης μέχρι την χαραγή με απιονισμένο νερό.

Παρασκευή διαλύματος Δ3 NH₄H₂PO₄ 1M: Ζυγίστηκαν 115,08 g φωσφορικού αμμωνίου NH₄H₂PO₄ σε αναλυτικό ζυγό και διαλύθηκαν σε ένα ποτήρι ζέσεως με απιονισμένο. Μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 1000 mL, προστέθηκε απιονισμένο νερό, πραγματοποιήθηκε η διάλυση του άλατος με ανακίνηση και τέλος συμπληρώθηκε ο όγκος της φιάλης μέχρι την χαραγή με απιονισμένο νερό.

Παρασκευή διαλύματος Δ4 MgSO₄·7H₂O 1M: Ζυγίστηκαν 246,48 g θειϊκού μαγνησίου MgSO₄·7H₂O σε αναλυτικό ζυγό και διαλύθηκαν σε ένα ποτήρι ζέσεως με απιονισμένο νερό. Μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 1000 mL, προστέθηκε απιονισμένο νερό, πραγματοποιήθηκε η διάλυση του άλατος με ανακίνηση και τέλος συμπληρώθηκε ο όγκος της φιάλης μέχρι την χαραγή με απιονισμένο νερό.

Παρασκευή διαλύματος Δ5 KCl 25 mM: Ζυγίστηκαν 1,864 g χλωριούχου καλίου KCl σε αναλυτικό ζυγό και διαλύθηκαν σε ένα ποτήρι ζέσεως με απιονισμένο. Μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 1000 mL, προστέθηκε απιονισμένο νερό, πραγματοποιήθηκε η διάλυση του άλατος με ανακίνηση και τέλος συμπληρώθηκε ο όγκος της φιάλης μέχρι την χαραγή με απιονισμένο νερό.

Παρασκευή διαλύματος Δ6 H₃BO₃ 12,5 mM: Ζυγίστηκαν 0,773 g βορικού οξεος H₃BO₃ σε αναλυτικό ζυγό και διαλύθηκαν σε ένα ποτήρι ζέσεως με απιονισμένο νερό. Μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 1000 mL, προστέθηκε απιονισμένο νερό, πραγματοποιήθηκε η διάλυση του άλατος με ανακίνηση και τέλος συμπληρώθηκε ο όγκος της φιάλης μέχρι την χαραγή με απιονισμένο νερό.

Παρασκευή διαλύματος Δ7 MnSO₄·H₂O 1 mM: Ζυγίστηκαν 0,169 g θειϊκού μαγγανίου MnSO₄·H₂O σε αναλυτικό ζυγό και διαλύθηκαν σε ένα ποτήρι ζέσεως με απιονισμένο νερό. Μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 1000 mL, προστέθηκε απιονισμένο νερό, πραγματοποιήθηκε η διάλυση του άλατος με ανακίνηση και τέλος συμπληρώθηκε ο όγκος της φιάλης μέχρι την χαραγή με απιονισμένο νερό.

Παρασκευή διαλύματος Δ8 ZnSO₄·7H₂O 1 mM: Ζυγίστηκαν 0,288 g θειϊκού ψευδαργύρου ZnSO₄·7H₂O σε αναλυτικό ζυγό και διαλύθηκαν σε ένα ποτήρι ζέσεως με απιονισμένο νερό. Μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 1000 mL,

προστέθηκε απιονισμένο νερό, πραγματοποιήθηκε η διάλυση του άλατος με ανακίνηση και τέλος συμπληρώθηκε ο όγκος της φιάλης μέχρι την χαραγή με απιονισμένο νερό.

Παρασκευή διαλύματος Δ9 CuSO₄·5H₂O 1 mM: Ζυγίστηκαν 0,2497 g θειϊκού χαλκού CuSO₄·5H₂O σε αναλυτικό ζυγό και διαλύθηκαν σε ένα ποτήρι ζέσεως με απιονισμένο νερό. Μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 1000 mL, προστέθηκε απιονισμένο νερό, πραγματοποιήθηκε η διάλυση του άλατος με ανακίνηση και τέλος συμπληρώθηκε ο όγκος της φιάλης μέχρι την χαραγή με απιονισμένο νερό.

Παρασκευή διαλύματος Δ10 H₂MoO₄ 1 mM: Ζυγίστηκαν 0,162 g μολυβδαινικού οξέος H₂MoO₄ σε αναλυτικό ζυγό και διαλύθηκαν σε ένα ποτήρι ζέσεως με απιονισμένο νερό. Μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 1000 mL, προστέθηκε απιονισμένο νερό, πραγματοποιήθηκε η διάλυση του άλατος με ανακίνηση και τέλος συμπληρώθηκε ο όγκος της φιάλης μέχρι την χαραγή με απιονισμένο νερό.

Παρασκευή διαλύματος Δ11 NaFeEDTA 100 mM: Ζυγίστηκαν 36,71 g χηλικού σιδήρου NaFeEDTA σε αναλυτικό ζυγό και διαλύθηκαν σε ένα ποτήρι ζέσεως με απιονισμένο νερό. Μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 1000 mL, προστέθηκε απιονισμένο νερό, πραγματοποιήθηκε η διάλυση του άλατος με ανακίνηση και τέλος συμπληρώθηκε ο όγκος της φιάλης μέχρι την χαραγή με απιονισμένο νερό.



Εικόνα 3.4: Τα έντεκα διαλύματα αλάτων που χρησιμοποιήθηκαν για το θρεπτικό διάλυμα.

Παρασκευή πλήρους θρεπτικού υλικού

Για την παρασκευή 1 L πλήρους θρεπτικού διαλύματος, χρησιμοποιήθηκαν τα 11 διαλύματα αλάτων με την αναλογία που φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 3.2: Ποσότητες (mL) διαλυμάτων αλάτων που απαιτούνται στο 1 L θρεπτικού διαλύματος.

Διάλυμα άλατος	mL / 1 L Θρεπτικού δ/τος
Δ1. $\text{KNO}_3 \cdot 1\text{M}$	6
Δ2. $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} \cdot 1\text{M}$	4
Δ3. $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot 1\text{M}$	2
Δ4. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} \cdot 1\text{M}$	1
Δ5. $\text{KCl} \cdot 25\text{mM}$	2
Δ6. $\text{H}_3\text{BO}_3 \cdot 12,5\text{mM}$	2
Δ7. $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot 1\text{mM}$	2
Δ8. $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} \cdot 1\text{mM}$	2
Δ9. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} \cdot 1\text{mM}$	0,5
Δ10. $\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot 1\text{mM}$	0,5
Δ11. $\text{NaFeEDTA} \cdot 100\text{mM}$	1

Με βάση την αναλογία των διαλυμάτων αλάτων για την παρασκευή 1 L θρεπτικού υλικού, υπολογίστηκε η αντίστοιχη απαιτούμενη ποσότητα για να παραχθεί μεγαλύτερη ποσότητα θρεπτικού διαλύματος. Πιο συγκεκριμένα, η κάθε γλάστρα είχε χωρητικότητα 4 L και χρειαζόταν 500 mL θρεπτικό διάλυμα. Έτσι, για το σύνολο των φυτών, που ήταν σε αριθμό 60, χρειάστηκαν 30 L από το διάλυμα. Με την αναγωγή των ποσοτήτων, των διαλυμάτων των αλάτων, που αντιστοιχούν στα 30 L παρασκευαζόταν το θρεπτικό υλικό την ημέρα του ποτίσματος. Πιο κάτω θα δειχθεί το πρόγραμμα ποτίσματος των φυτών της υδροπονικής καλλιέργειας.

Θρεπτικό υλικό ποτίσματος άνευ θείου:

Για το θρεπτικό υλικό ποτίσματος άνευ θείου χρειάστηκε να παρασκευαστούν περαιτέρω διαλύματα ορισμένων αλάτων σε σχέση με το πλήρες θρεπτικό υλικό ποτίσματος. Στον πίνακα 3.3 φαίνονται τα απαιτούμενα διαλύματα για την παρασκευή του θρεπτικού υλικού άνευ θείου.

Παρασκευή διαλύματος Δ2 $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 1\text{ M}$: Ζυγίστηκαν 136,1 g δισόξινου φωσφορικού καλίου KH_2PO_4 σε αναλυτικό ζυγό και διαλύθηκαν σε ένα ποτήρι ζέσεως με απιονισμένο νερό. Μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 1000 mL, προστέθηκε απιονισμένο νερό, πραγματοποιήθηκε η διάλυση του άλατος με ανακίνηση και τέλος συμπληρώθηκε ο όγκος της φιάλης μέχρι την χαραγή με απιονισμένο νερό.

Παρασκευή διαλύματος Δ3 $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} \cdot 1\text{ M}$: Ζυγίστηκαν 256,4 g νιτρικού μαγνησίου $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ σε αναλυτικό ζυγό και διαλύθηκαν σε ένα ποτήρι ζέσεως με απιονισμένο νερό. Μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 1000 mL, προστέθηκε απιονισμένο νερό, πραγματοποιήθηκε η διάλυση του άλατος με

ανακίνηση και τέλος συμπληρώθηκε ο όγκος της φιάλης μέχρι την χαραγή με απιονισμένο νερό.

Παρασκευή διαλύματος Δ6 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 M: Ζυγίστηκαν 147 g χλωριούχου ασβεστίου $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ σε αναλυτικό ζυγό και διαλύθηκαν σε ένα ποτήρι ζέσεως με απιονισμένο νερό. Μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 1000 mL, προστέθηκε απιονισμένο νερό, πραγματοποιήθηκε η διάλυση του άλατος με ανακίνηση και τέλος συμπληρώθηκε ο όγκος της φιάλης μέχρι την χαραγή με απιονισμένο νερό.

Παρασκευή διαλύματος Δ7 ZnCl_2 10 mM, H_3BO_3 - 300mM, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 10mM, H_2MoO_4 - 5mM, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 200mM: Ζυγίστηκαν 1,36 g χλωριούχου ψευδαργύρου ZnCl_2 , 18,6 g βορικού οξέος H_3BO_3 , 1,7 g χλωριούχου χαλκού $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,85 g μολυβδανικού οξέος H_2MoO_4 , 39,6 g χλωριούχου μαγγανίου $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ σε αναλυτικό ζυγό, μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 1000 mL και συμπληρώθηκε ο όγκος της φιάλης μέχρι την χαραγή με απιονισμένο νερό.

Παρασκευή θρεπτικού διαλύματος άνευ θείου

Με τον ίδιο τρόπο υπολογισμού, όπως πριν, για τα 15 φυτά της ομάδας αυτής, φτιάχτηκαν 7,5 L λαμβάνοντας, τις ανάλογες ποσότητες από τα διαλύματα των αλάτων. Ακόμα, πραγματοποιήθηκε διόρθωση του pH στο τελικό διάλυμα άνευ θείου, με προσθήκη διαλύματος υδροξιδείου του καλίου, KOH 1 M σε pH = 7. Παρακάτω, παρουσιάζεται ο πίνακας με την αναλογία των διαλυμάτων αλάτων για την παρασκευή 1 L διαλύματος άνευ θείου.

Πίνακας 3.3: Ποσότητα διαλυμάτων αλάτων σε mL για την παρασκευή 1 L θρεπτικού υλικού άνευ S.

Διαλύματα αλάτων	mL / 1 L Θρεπτικού υλ. άνευ S
Δ1. KNO_3 - 1M	5
Δ2. KH_2PO_4 - 1M	1
Δ3. $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 1M	2
Δ4. NaFeEDTA - 100mM	1
Δ5. $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 1M	4
Δ6. $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 1M	1
Δ7. ZnCl_2 - 10mM, H_3BO_3 - 300mM, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 10mM, H_2MoO_4 - 5mM, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 200mM	1,2

Τέλος, παρασκευάστηκαν τα δύο διαλύματα σεληνίου, που χρειάστηκαν για τα φυτά των ομάδων B, Γ, Δ1 και Δ2. Εφαρμόζοντας την ίδια διαδικασία με της συμβατικής καλλιέργειας στο χώμα, παρασκευάστηκαν δύο διαλύματα Se, ένα με συγκέντρωση 1,5 mM και ένα 3 mM. Η ποσότητα που χρειάστηκε ήταν 8 L από το κάθε ένα διάλυμα, εφόσον εφαρμόστηκαν 40 mL σε κάθε γλάστρα με πλαστική σύριγγα και το κάθε ένα από τα διαλύματα αντιστοιχούσε σε 20 φυτά / εφαρμογή.

Για τις παρασκευές των διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι τόποι: C = n / V και

$$n = m/M_r.$$

Παρασκευή διαλύματος Na₂SeO₄ 1,5 mM: Ζυγίζονται 0,282 g Na₂SeO₄ (M.B. 188) σε αναλυτικό ζυγό ακριβείας και διαλύονται σε απιονισμένο νερό και μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 1000 mL. Ο όγκος συμπληρώνεται με απιονισμένο νερό μέχρι τη χαραγή και η φιάλη ανακινείται.

Παρασκευή διαλύματος Na₂SeO₄ 3 mM: Ζυγίζονται 0,564 g Na₂SeO₄ (M.B. 188) σε αναλυτικό ζυγό ακριβείας και διαλύονται σε απιονισμένο νερό και μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 1000 mL. Ο όγκος συμπληρώνεται με απιονισμένο νερό μέχρι τη χαραγή και η φιάλη ανακινείται.

Η τελκή ποσότητα σεληνίου για τα φυτά των ομάδων Β και Δ1 ήταν [40 mL * 1,5 mmol/L] / 4 L = 15 μmol / L χώματος με περλίτη ανά εφαρμογή. Συνολικά, 15 μmol * 4 εβδομάδες = 60 μmol. Για τα φυτά των ομάδων Γ και Δ2, η τελική συγκέντρωση σεληνίου ήταν [40 mL * 3 mmol/L] / 4 L = 30 μmol / L χώματος με περλίτη ανά εφαρμογή. Συνολικά, 30 μmol * 4 εβδομάδες = 120 μmol.

Η εβδομαδιαία διαδικασία ποτίσματος των φυτών περιλάμβανε αρχικά, τον καθαρισμό του πλαστικού νάυλου πάνω στο οποίο ήταν οι γλάστρες και ύστερα την εφαρμογή των διαλυμάτων με βάση το πρόγραμμα που είχε σχεδιαστεί. Έτσι, έγιναν οι εξής διαδικασίες: α) αφαίρεση των φυτών ανά ομάδες, β) αφαίρεση των νάυλων και καθαρισμό αυτών από το άλγος και τα προηγούμενα διαλύματα, γ) επανατοποθέτηση των καθαρών νάυλων και των φυτών ομαδικά και με τήρηση της σειράς τους και δ) πότισμα με τα αντίστοιχα διαλύματα κάθε φορά.

Έπειτα από 15 εβδομάδες υδροπονικής καλλιέργειας ακολουθήσε η συγκομιδή των φυτών με τα εξής βήματα: α) συλλογή του υπέργειου τμήματος των φυτών, β) ζύγιση και τεμαχισμός σε μέρη (φύλλα, ανθοκεφαλές, βλαστός), γ) ζύγιση νωπών τμημάτων του φυτού, δ) αποθήκευση σε πλαστικές σακούλες polybag στους -20 °C.

Παρακάτω παρουσιάζεται με σειρά το πρόγραμμα ποτίσματος με τα διαλύματα που ακολουθήθηκε για την υδροπονική καλλιέργεια.

Πίνακας 3.4: Πρόγραμμα ποτίσματος διαλυμάτων της υδροπονικής καλλιέργειας για την πρώτη έως την τρίτη εβδομάδα (α), για την τέταρτη έως την έκτη εβδομάδα (β), για την έβδομη έως την ένατη εβδομάδα (γ) και για τη δέκατη και ενδέκατη εβδομάδα (δ).

(α)

Ομάδες φυτών	1η Εβδομάδα				2η Εβδομάδα				3η Εβδομάδα			
	Πλήρες θρεπτικό υλικό	Θρεπτικό υλικό -S	Λίπανση με Se 1,5 mM	Λίπανση με Se 3 mM	Πλήρες θρεπτικό υλικό	Θρεπτικό υλικό -S	Λίπανση με Se 1,5 mM	Λίπανση με Se 3 mM	Πλήρες θρεπτικό υλικό	Θρεπτικό υλικό -S	Λίπανση με Se 1,5 mM	Λίπανση με Se 3 mM
A	√	-	-	-	√	-	-	-	√	-	-	-
B	√	-	-	-	√	-	-	-	√	-	-	-
Γ	√	-	-	-	√	-	-	-	√	-	-	-
Δ	√	-	-	-	√	-	-	-	√	-	-	-
Δ1	√	-	-	-	√	-	-	-	√	-	-	-
Δ2	√	-	-	-	√	-	-	-	√	-	-	-

(β)

Ομάδες φυτών	4η Εβδομάδα				5η Εβδομάδα				6η Εβδομάδα			
	Πλήρες θρεπτικό υλικό	Θρεπτικό υλικό -S	Λίπανση με Se 1,5 mM	Λίπανση με Se 3 mM	Πλήρες θρεπτικό υλικό	Θρεπτικό υλικό -S	Λίπανση με Se 1,5 mM	Λίπανση με Se 3 mM	Πλήρες θρεπτικό υλικό	Θρεπτικό υλικό -S	Λίπανση με Se 1,5 mM	Λίπανση με Se 3 mM
A	√	-	-	-	√	-	-	-	√	-	-	-
B	√	-	-	-	√	-	√	-	√	-	-	-
Γ	√	-	-	-	√	-	-	√	√	-	-	-
Δ	-	√	-	-	-	√	-	-	-	√	-	-
Δ1	-	√	-	-	-	√	√	-	-	√	-	-
Δ2	-	√	-	-	-	√	-	√	-	√	-	-

(γ)

Ομάδες φυτών	7η Εβδομάδα				8η Εβδομάδα				9η Εβδομάδα			
	Πλήρες θρεπτικό υλικό	Θρεπτικό υλικό -S	Λίπανση με Se 1,5 mM	Λίπανση με Se 3 mM	Πλήρες θρεπτικό υλικό	Θρεπτικό υλικό -S	Λίπανση με Se 1,5 mM	Λίπανση με Se 3 mM	Πλήρες θρεπτικό υλικό	Θρεπτικό υλικό -S	Λίπανση με Se 1,5 mM	Λίπανση με Se 3 mM
A	√	-	-	-	√	-	-	-	√	-	-	-
B	√	-	√	-	√	-	-	-	√	-	√	-
Γ	√	-	-	√	√	-	-	-	√	-	-	√
Δ	-	√	-	-	√	-	-	-	√	-	-	-
Δ1	-	√	√	-	√	-	-	-	√	-	√	-
Δ2	-	√	-	√	√	-	-	-	√	-	-	√

(δ)

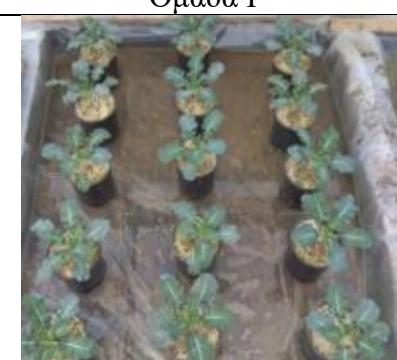
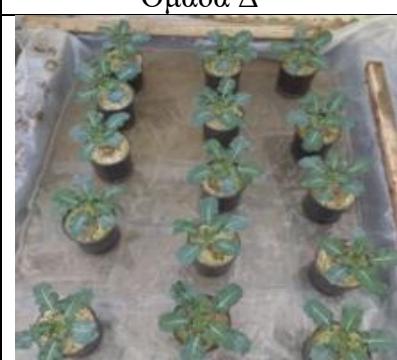
Ομάδες φυτών	10η Εβδομάδα				11η Εβδομάδα			
	Πλήρες θρεπτικό υλικό	Θρεπτικό υλικό -S	Λίπανση με Se 1,5 mM	Λίπανση με Se 3 mM	Πλήρες θρεπτικό υλικό	Θρεπτικό υλικό -S	Λίπανση με Se 1,5 mM	Λίπανση με Se 3 mM
A	√	-	-	-	√	-	-	-
B	√	-	√	-	√	-	-	-
Γ	√	-	-	√	√	-	-	-
Δ	√	-	-	-	√	-	-	-
Δ1	√	-	√	-	√	-	-	-
Δ2	√	-	-	-	√	√	-	-

3.2.2 Εικόνες υδροπονικής καλλιέργειας μπρόκολου

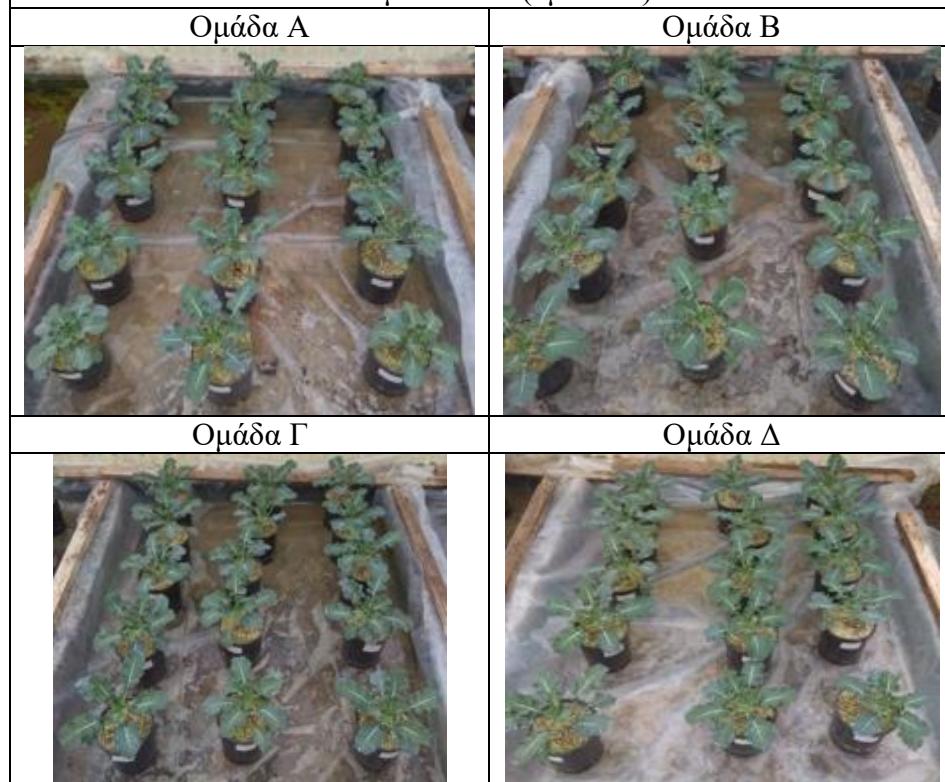
Παρακάτω παρουσιάζονται ανά εβδομάδα τα φυτά που καλλιεργήθηκαν υπό ελεγχόμενες συνθήκες στο φυτώριο της εταιρείας «Γεωπονική ΑΕ».

1 ^η Εβδομάδα – Πότισμα: Θρεπτικό υλικό σε όλα τα φυτά			
Ομάδα Α	Ομάδα Β	Ομάδα Γ	Ομάδα Δ
			

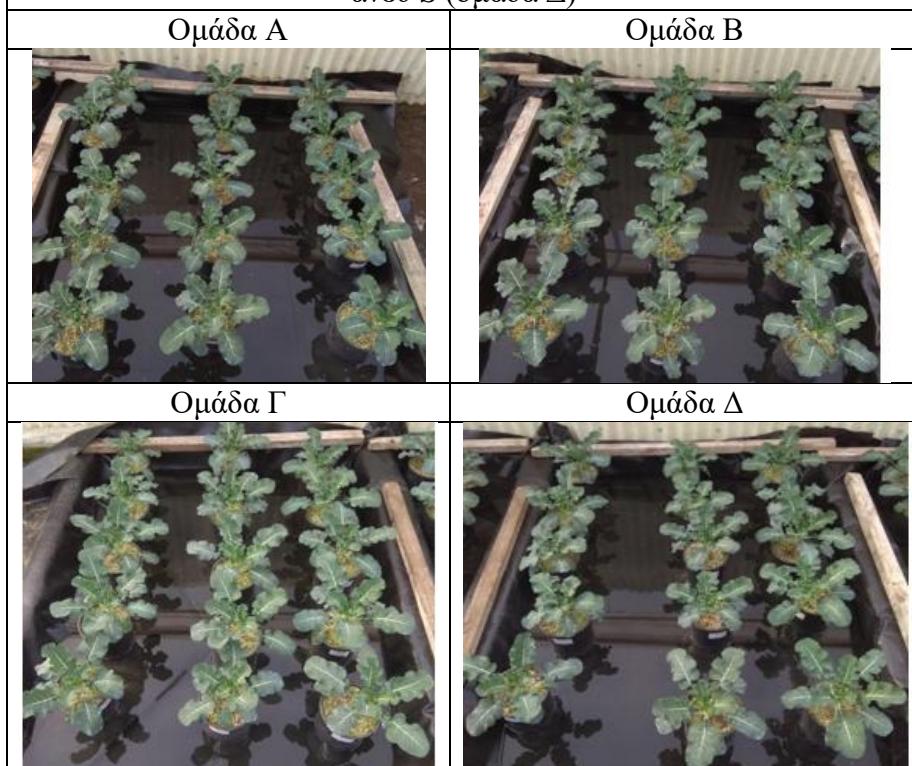
2 ^η Εβδομάδα – Πότισμα: Θρεπτικό υλικό σε όλα τα φυτά			
Ομάδα A		Ομάδα B	
			
Ομάδα Γ		Ομάδα Δ	
			

3 ^η Εβδομάδα – Πότισμα: Θρεπτικό υλικό σε όλα τα φυτά			
Ομάδα A		Ομάδα B	
			
Ομάδα Γ		Ομάδα Δ	
			

4^η Εβδομάδα – Πότισμα: Θρεπτικό υλικό (ομάδες Α, Β, Γ) και διάλυμα ánev S (ομάδα Δ)



5^η Εβδομάδα –Πότισμα: Θρεπτικό υλικό (ομάδες Α, Β, Γ), διαλύματα Se (ομάδες Β, Γ και υποομάδες Δ1, Δ2) και διάλυμα ánev S (ομάδα Δ)



6^η Εβδομάδα –Πότισμα: Θρεπτικό υλικό (ομάδες A, B, Γ) και διάλυμα άνευ S (ομάδα Δ).

Ομάδα A	Ομάδα B
	
Ομάδα Γ	Ομάδα Δ (με υποομάδες Δ1, Δ2)
	

<p>7^η Εβδομάδα –Πότισμα: Θρεπτικό υλικό, διάλυμα Se (ομάδες A, B, Γ) και διάλυμα άνευ Se (ομάδα B, Γ, υποομάδες Δ1, Δ2)</p>			
Ομάδα A		Ομάδα B	
			
Ομάδα Γ		Ομάδα Δ (με υποομάδες Δ1, Δ2)	
			

<p>10^η Εβδομάδα –Πότισμα: Θρεπτικό υλικό σε όλα τα φυτά και διαλύματα Se (ομάδες B, Γ, Δ1, Δ2)</p>			
Ομάδα A		Ομάδα B	
			
Ομάδα Γ		Ομάδα Δ (με υποομάδες Δ1, Δ2)	
			

11 ^η Εβδομάδα –Πότισμα: Θρεπτικό υλικό σε όλα τα φυτά	
Ομάδα A	Ομάδα B
	
Ομάδα Γ	Ομάδα Δ (με υποομάδες Δ1, Δ2)
	

12 ^η Εβδομάδα –Πότισμα: Θρεπτικό υλικό σε όλα τα φυτά	
Ομάδα A	Ομάδα B
	
Ομάδα Γ	Ομάδα Δ
	

3.2.3 Αποτελέσματα – Συζήτηση

Οι συγκεντρώσεις που ποτίστηκαν τα φυτά στη συμβατική και την υδροπονική καλλιέργεια, βασίστηκαν σε αντίστοιχες μελέτες (Wiesner-Reinhold et al., 2017). Για τη βιο-ενίσχυση με Se επιλέχθηκε η εφαρμογή του υδατικού διαλύματος Na_2SeO_4 (selenate) έναντι του Na_2SeO_3 (selenite) καθότι με βάση τη βιβλιογραφία, το Na_2SeO_4 απορροφάται σε μεγαλύτερο βαθμό από τα φυτά σε σχέση με το Na_2SeO_3 (Chen et al., 2002; Sharma et al., 2010; Ramos et al., 2011a; Ávila et al., 2013).

3.2.3.1 Συμβατική καλλιέργεια μπρόκολου

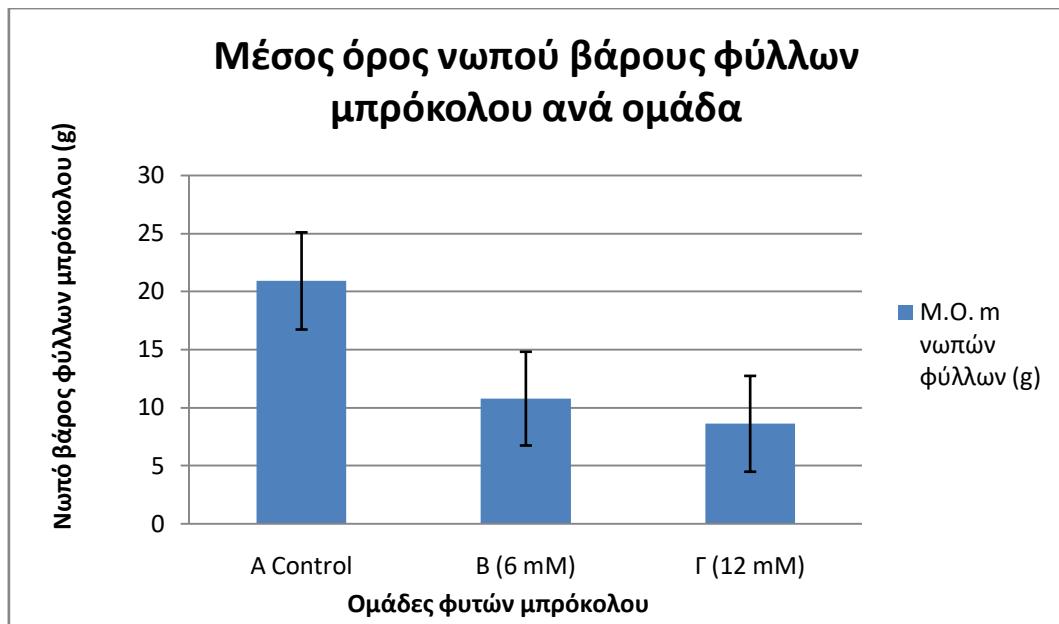
Το Se δεν είναι απαραίτητο στοιχείο για την ανάπτυξη των φυτών, ωστόσο σε χαμηλές συγκεντρώσεις θεωρείται ότι έχει θετική επίδραση στην ανάπτυξη τους. Όμως όταν η βιο-ενίσχυση με Se υπερβαίνει τα ανώτερα όρια τότε το σελήνιο είναι τοξικό για τα φυτά. Στη συμβατική καλλιέργεια δεν προστέθηκε λίπασμα παρά μόνο οι δυο διαφορετικές συγκεντρώσεις Se (6 mM & 12 mM).

Πίνακας 3.5: Επίδραση του Se στο νωπό βάρος των φύλλων μπρόκολου της συμβατικής καλλιέργειας.

Ομάδα	M.O. ^a m νωπών φύλλων (g) ± SD ^b
A (Control)	20,9 ± 4
B (6 mM Se)	10,8 ± 4
Γ (12 mM Se)	8,6 ± 4

^aM.O.: Μέσος Όρος, ^bS.D.: Τυπική απόκλιση

Από τον πίνακα 3.5 και το ραβδόγραμμα της εικόνας 3.4 παρατηρούμε ότι αυξανομένης της συγκέντρωσης βιο-ενίσχυσης του σεληνίου στα φυτά, μειώθηκε αντίστοιχα και το νωπό βάρος των φύλλων του μπρόκολου. Επομένως συμπεραίνουμε ότι η βιο-ενίσχυση με Se στη συμβατική καλλιέργεια επηρέασε αρνητικά την ανάπτυξη των φυτών.



Εικόνα 3.4: Ραβδόγραμμα απεικόνισης νωπού βάρους των φύλλων μπρόκολου της συμβατικής καλλιέργειας ανά ομάδα φυτών.



Εικόνα 3.5: Εμφάνιση τοξικότητας σε φύλλα των φυτών μπρόκολου συμβατικής καλλιέργειας της ομάδας Γ (12 mM).

Στα φυτά μπρόκολου στα οποία εφαρμόστηκε βιο-ενίσχυση με Se συγκέντρωσης 12 mM παρατηρήθηκε τοξικότητα στα φύλλα των φυτών (Εικόνα 3.5) λόγω του ότι δεν προστέθηκε S στην καλλιέργεια. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, καθώς οι Tian et al. (2017) που μελέτησαν την τοξικότητα που προκαλείται από την υψηλή συγκέντρωση βιο-ενίσχυσης με Se στα φυτά μπρόκολου, διαπίστωσαν ότι η υψηλή συγκέντρωση βιο-ενίσχυσης με Se στο μπρόκολο είναι τοξική όταν οι συγκεντρώσεις του S είναι χαμηλές.

3.2.3.2 Υδροπονική καλλιέργεια μπρόκολου

Στον πίνακα 3.6 παρουσιάζεται το νωπό βάρος των: α) ολόκληρων φυτών, β) φύλλων, γ) βλαστών και δ) ανθοκεφαλών μπρόκολου ανάλογα με την λίπανση, στην υδροπονική καλλιέργεια.

Πίνακας 3.6: Επίδραση του Se στο νωπό βάρος των: α) ολόκληρων φυτών (πλην ρίζας), β) φύλλων, γ) βλαστών και δ) ανθοκεφαλών μπρόκολου.

Ομάδα	M.O. ^a m ολόκλ. φυτού (g) ± SD ^b	M.O. ^a m νωπών φύλλων (g) ± SD ^b	M.O. ^a m νωπών βλαστών (g) ± SD ^b	M.O. ^a m νωπών ανθοκεφ. (g) ± SD ^b
A (Control)	361,5 ± 21,9	129,3 ± 12,4	91,4 ± 4,9	122,3 ± 12,9
B (1,5 mM Se)	341,9 ± 19,1	147,8 ± 14,6	82,1 ± 6,5	110,6 ± 14,1
Γ (3 mM Se)	310,5 ± 33,7	169,8 ± 23,6	63,2 ± 8,5	77,7 ± 14,2
Δ άνευ S	341,2 ± 55,5	135,4 ± 13,5	76,4 ± 12,7	127,2 ± 31,2
Δ1 άνευ S (1,5 mM Se)	297,8 ± 45,8	128,2 ± 10,7	68,0 ± 12,5	100,6 ± 27,8
Δ2 άνευ S (3 mM Se)	233,4 ± 42,6	135,4 ± 14,5	53,6 ± 11,8	44,2 ± 19,8

^aM.O.: Μέσος Όρος, ^bS.D.: Τυπική απόκλιση

Παρατηρούμε ότι η μεγαλύτερη τιμή νωπού βάρους ολόκληρου φυτού μπρόκολου (πλην ρίζας) αντιστοιχεί στην ομάδα A, στην οποία δεν είχε προστεθεί Se στο θρεπτικό υλικό. Ενώ, το μικρότερο βάρος είχε η ομάδα Δ2, στην οποία είχε αφαιρεθεί το S από το θρεπτικό υλικό και είχε προστεθεί Se συγκέντρωσης 3 mM.

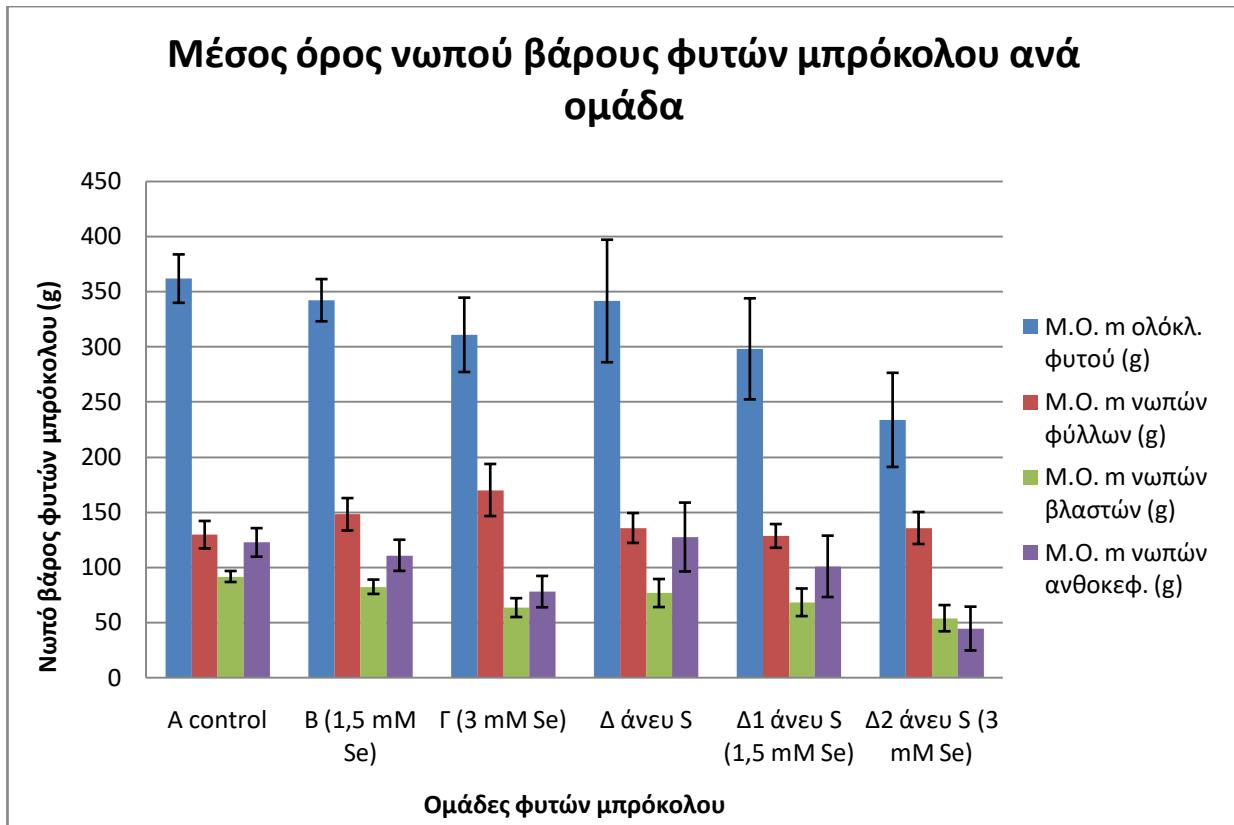
Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι στην ομάδα Δ, όπου είχε αφαιρεθεί το θείο από το θρεπτικό υλικό, το νωπό βάρος ολόκληρου του φυτού (πλην ρίζας) μειώθηκε σε σχέση με την ομάδα A. Επομένως η απουσία του θείου στο θρεπτικό υλικό επηρέασε αρνητικά την ανάπτυξη των φυτών.

Ακόμα, φαίνεται ότι στην ομάδα Γ, με προσθήκη Se συγκέντρωσης 3 mM, τα φύλλα είχαν το μεγαλύτερο νωπό βάρος, σε αντίθεση με τα φύλλα της ομάδας Δ1, (όπου απουσίαζε το S, με προσθήκη 1,5 mM Se) τα οποία είχαν το μικρότερο βάρος.

Μεγάλη διαφορά στο νωπό βάρος των βλαστών παρατηρήθηκε μεταξύ των ομάδων A και Δ2, όπως επίσης και στο νωπό βάρος των ανθοκεφαλών μεταξύ των ομάδων Δ και Δ2.

Όπως φαίνεται στο ραβδόγραμμα της εικόνας 3.6, η ανάπτυξη των φυτών στις ομάδες B, Γ, Δ1 και Δ2, που είχαν Se ήταν μειωμένη σε σχέση με αυτά της ομάδας A (χωρίς Se). Άρα, η βιο-ενίσχυση με Se, επηρέασε την ανάπτυξη ολόκληρου του φυτού.

Η βιο-ενίσχυση με Se απουσία S, στις ομάδες Δ1 και Δ2, οδήγησε σε επιβράδυνση της ανάπτυξης των φυτών. Αυτό το γεγονός έχει παρατηρηθεί και στη βιβλιογραφία (Tian et al., 2017) για τις ποικιλίες Diplomat και Gypsy. Στα φυτά της ομάδας Δ2, στην οποία προστέθηκε Se συγκέντρωσης 3 mM, απουσία S, παρατηρήθηκε η μικρότερη ανάπτυξη σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες. Η μείωση αυτή παρατηρήθηκε σε ολόκληρο το φυτό αλλά και στα μέρη του φυτού (φύλλα, βλαστός, ανθοκεφαλές).



Εικόνα 3.6: Ραβδόγραμμα απεικόνισης νιωπού βάρους των φυτών και των μερών τους, όλων των ομάδων στην υδροπονική καλλιέργεια.

Από τα παραπάνω δεδομένα συμπεραίνεται ότι, όπως στη συμβατική καλλιέργεια έτσι και στην υδροπονική, η αυξημένη συγκέντρωση βιο-ενίσχυσης Se σε συνδυασμό με την απουσία S επιδρά αρνητικά στην ανάπτυξη του φυτού.

3.3 Ξήρανση φυτικού υλικού

Από τα πολύ παλιά χρόνια, η ξήρανση των τροφίμων αποτελούσε μία μέθοδο συντήρησής τους για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Με την πάροδο των ετών, η τεχνική αυτή μελετήθηκε και βελτιώθηκε. Ως αποτέλεσμα, υπάρχουν διάφορες μέθοδοι ξήρανσης, οι οποίες βασίζονται στα τελικά επιθυμητά χαρακτηριστικά των προϊόντων. Το βασικό αντικείμενο της αφυδάτωσης των τροφίμων, είναι η

απομάκρυνση νερού να φτάσει σε τέτοιο σημείο όπου η μικροβιακή προσβολή και οι ανεπιθύμητες χημικές αντιδράσεις να ελαχιστοποιηθούν. Ο στόχος της είναι η παράταση του χρόνου ζωής του τροφίμου (Reza et al., 2009).

Φτάνοντας στη σύγχρονη εποχή, η ξήρανση λαμβάνει χώρα σε συσκευές που ονομάζονται ξηραντήρια. Σε αυτή τη μέθοδο, γίνεται έκθεση του προϊόντος σε ρεύμα ζεστού και ξηρού αέρα. Η θερμότητα μεταφέρεται μέσω του αέρα προκειμένου να εξατμιστεί το νερό από το προϊόν και στη συνέχεια, ο αέρας αυτός απομακρύνει τους παραγόμενους υδρατμούς. Η αρχή στην οποία στηρίζεται η ξήρανση με ξηραντήρα αέρα είναι η μετατροπή του νερού από την υγρή στην αέρια φάση. Ωστόσο, άλλες μέθοδοι όπως η ξήρανση με κατάψυξη – εξάχνωση (Freeze-drying) ή λυοφιλίωση (Lyophilization).

Μια άλλη μέθοδος ξήρανσης είναι με κατάψυξη – εξάχνωση, στην οποία το νερό μεταφέρεται από τη στερεά κατάσταση (πάγος) στην αέρια (υδρατμός), χωρίς τη μεσολάβηση της υγρής κατάστασης. Αυτό μπορεί να γίνει, αν η τάση ατμών και η θερμοκρασία διατηρούνται κάτω του τριπλού σημείου (σημείο στο οποίο υφίστανται και οι τρεις καταστάσεις). Η μετατροπή αυτή αποτελεί την εξάχνωση και θα πρέπει να προσφερθεί η λανθάνουσα θερμότητα εξάχνωσης. Για να πραγματοποιηθεί η διαδικασία αυτή, χρειάζεται στο θάλαμο ξήρανσης να διατηρείται η απόλυτη πίεση κάτω από 4,58 Torr ή 610,6 Pa και η θερμοκρασία κάτω από τους 0 °C. Για την απομάκρυνση των ατμών του νερού από το τρόφιμο, απαιτείται χαμηλότερη πίεση των ατμών στο θάλαμο εξάχνωσης από την πίεση των ατμών στην επιφάνεια του πάγου. Για να επιτευχθεί αυτό, γίνεται χρήση αντλίας κενού. Στο τελικό στάδιο, οι υδρατμοί που απάγονται από το τρόφιμο συμπυκνώνονται και έχουμε ολοκλήρωση της διαδικασίας.

Για τη φυσική μεταβολή του νερού, από την στερεή στην αέρια κατάσταση, απαιτείται σημαντική ενέργεια, λόγω θερμοδυναμικής απαίτησης για την αλλαγή της φάσης, ακόμα και αν επικρατούν χαμηλές θερμοκρασίες κατά τη διαδικασία. Τα στάδια της διεργασίας είναι συνολικά, τρία. Αρχικά, στο πρώτο στάδιο γίνεται η κατάψυξη του τροφίμου, στο δεύτερο ακολουθεί η πρωτογενής ξήρανση και τέλος η δευτερογενής.

Στη μεταπυχιακή διατριβή επιλέχθηκε για την ξήρανση του φυτικού υλικού η λυοφιλίωση.

3.3.1. Λυοφιλίωση των δειγμάτων μπρόκολου

Για το στάδιο της λυοφιλίωσης, χρειάστηκαν:

- Φιάλες λυοφιλιωτή
- Γουδί

- Μπλέντερ
- Μαχαίρι
- Μεταλλική σπάτουλα
- Πλαστικοί περιέκτες
- Σακούλες polybag
- Αλουμινόχαρτο

Αρχικά, μεταχειρίστηκαν τα δείγματα φύλλων της συμβατικής καλλιέργειας μπρόκολου και στη συνέχεια τα δείγματα υδροπονικής καλλιέργειας. Εφόσον τα δείγματα είχαν καταψυχθεί, τεμαχίστηκαν σε μικρότερα κομμάτια και τοποθετήθηκαν στις γυάλινες φιάλες του οργάνου. Στη συνέχεια, λυοφιλιώθηκαν στο λυοφιλιωτή του εργαστηρίου, Virtis freeze mobile 25EL επί 48 h.



Εικόνα 3.6: Λυοφιλίωση των δειγμάτων

Μετά το πέρας των 48 h, τα δείγματα ζυγίστηκαν σε αναλυτικό ζυγό ένα προς ένα και κονιοποιήθηκαν με γουδί και μπλέντερ. Τέλος, αποθηκεύτηκαν στους -20 °C σε σακούλες polybag.

3.3.3 Ποσοστό υγρασίας δειγμάτων μπρόκολου

Παρακάτω φαίνεται το ποσοστό υγρασίας των δειγμάτων της συμβατικής και υδροπονικής καλλιέργειας μπρόκολου, με βάση το νωπό και ξηρό βάρος κάθε δείγματος.

Πίνακας 3.7: Μέσος όρος της % υγρασίας των δειγμάτων φύλλων μπρόκολου της συμβατικής καλλιέργειας.

Ομάδα	M.O. ^a % Υγρασίας φύλλων \pm SD ^b
A (Control)	88,9 \pm 0,2
B (6 mM Se)	88,8 \pm 2,2
Γ (12 mM Se)	89,3 \pm 1,3

^aM.O.: Μέσος Όρος, ^bS.D.: Τυπική απόκλιση

Πίνακας 3.8: Μέσος όρος της % υγρασίας των δειγμάτων φύλλων και ανθοκεφαλών μπρόκολου της υδροπονικής καλλιέργειας.

Ομάδα	M.O. ^a % Υγρασίας φύλλων \pm SD ^b	M.O. ^a % Υγρασίας ανθοκεφαλών \pm SD ^b
A (Control)	87,6 \pm 1,9	87,7 \pm 0,3
B (1,5 mM Se)	89,2 \pm 0,6	87,5 \pm 1,3
Γ (3 mM Se)	86,9 \pm 1,1	86,2 \pm 2,0
Δ άνευ S	89,4 \pm 0,3	87,7 \pm 0,7
Δ1 άνευ S (1,5 mM Se)	88,6 \pm 0,4	87,4 \pm 0,5
Δ2 άνευ S (3 mM Se)	86,2 \pm 0,3	85,8 \pm 0,9

^aM.O.: Μέσος Όρος, ^bS.D.: Τυπική απόκλιση

3.4 Προσδιορισμός ολικού σεληνίου (Se) στα δείγματα με Φασματοσκοπία Ατομικής Απορρόφησης με γεννήτρια υδριδίων.

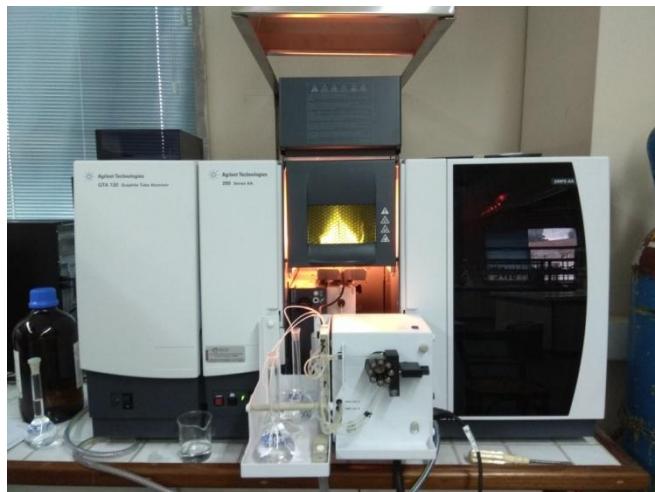
3.4.1 Υλικά και όργανα

Για τη μέτρηση του σεληνίου με Ατομική Απορρόφηση με γεννήτρια Υδριδίων, χρησιμοποιήθηκαν:

- Ποτήρια ζέσεως
- Αλουμινόχαρτο
- Γυάλινο χωνί
- HCl 10%
- H₂O₂30%
- HNO₃65%
- NaOH
- NaBH₄
- Κωνικές φιάλες

- Γυάλινα σιφώνια
- Ογκομετρικές φιάλες των 100 mL
- Parafilm
- Αυτόματες πιπέτες 0-50 μL, 100-1000 μL
- Πλαστικά ρύγχη πιπέτας
- Υπερκάθαρο νερό

Τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν, ο φούρνος μικροκυμάτων Start D Microwave Digestion System (MILESTONE Helping Chemists) με τα δοχεία του και το Φασματοφωτόμετρο της εταιρίας Agilent Technologies (μοντέλο Agilent 240 FSAA). Ακόμα, η γεννήτρια υδριδίων ήταν της Agilent Technologies, (μοντέλο VGA 77 AA).



Εικόνα 3.7: Όργανο ατομικής απορρόφησης με γεννήτρια υδριδίων (HG-AAS)

3.4.2 Προετοιμασία προτύπων διαλυμάτων για την HG-AAS και καμπύλες αναφοράς

Για τις καμπύλες αναφοράς χρησιμοποιήθηκε πρότυπο διάλυμα Se 1000 ppm της εταιρείας Chem-Lab. Ελήφθησαν 100 μL πρότυπου διαλύματος Se 1000 ppm και μεταφέρθηκαν στο αντίστοιχο δοχείο χώνευσης. Προστέθηκαν τα οξέα, HNO₃ 65 % (MerckKgaA) και H₂O₂ 30 % (MerckKgaA) σε αναλογία 7:1 και το δοχείο κλείστηκε και τοποθετήθηκε στο φούρνο μικροκυμάτων. Για τα δείγματα προς μέτρηση ζυγίστηκαν 0,3 g κονιοποιημένου δείγματος και μεταφέρθηκαν στο δοχείο χώνευσης. Προστέθηκαν τα διαλύματα HNO₃ 65 % και H₂O₂ 30 % σε αναλογία 7:1, τα δοχεία κλείστηκαν πολύ καλά και τοποθετήθηκαν στο φούρνο μικροκυμάτων. Επιπλέον προστέθηκαν σε ένα δοχείο χώνευσης μόνο τα διαλύματα HNO₃ 65 % και H₂O₂ 30 % σε αναλογία 7:1 για την παρασκευή του τυφλού διαλύματος (blanc), το οποίο θα χρησιμοποιηθεί κατά την διάρκεια των μετρήσεων στην HG-AAS ώστε να

αφαιρεθούν οι παρεμποδίσεις που δεν οφείλονται στο δείγμα. Στη συνέχεια, ορίστηκε το πρόγραμμα χώνευσης με προβλεπόμενη άνοδο θερμοκρασίας μέχρι τους 200 °C εντός 25 min και παραμονή σε αυτή τη θερμοκρασία για 15 min. Συνολικός χρόνος χώνευσης 40 min.

Μετά το τέλος της διαδικασίας χώνευσης, ακολούθησε κοινή μεταχείριση για το πρότυπο διάλυμα των 1000 ppb, το τυφλό διάλυμα και των δειγμάτων για την μέτρησή τους στην HG-AAS. Όλα τα γυάλινα σκεύη ήταν πλυμένα με υπερκάθαρο νερό. Τα διαλύματα που προέκυψαν από το στάδιο της χώνευσης μεταφέρθηκαν σε κωνικές φιάλες, των 50 και 100 mL. Όταν ήρθαν σε θερμοκρασία δωματίου, προστέθηκαν 6 mL HCl 10 % (MerckKGaA) και τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο στους 85 °C για 30 min. Ύστερα, βγήκαν και μεταφέρθηκαν σε ογκομετρικές φιάλες των 100 mL, όπου πληρώθηκε ο όγκος τους μέχρι τη χαραγή με υπερκάθαρο νερό και έτσι δημιουργήθηκαν τα αρχικά διαλύματα των δειγμάτων και του τυφλού. Από αυτά προέκυψαν τα επόμενα με αραίωση.

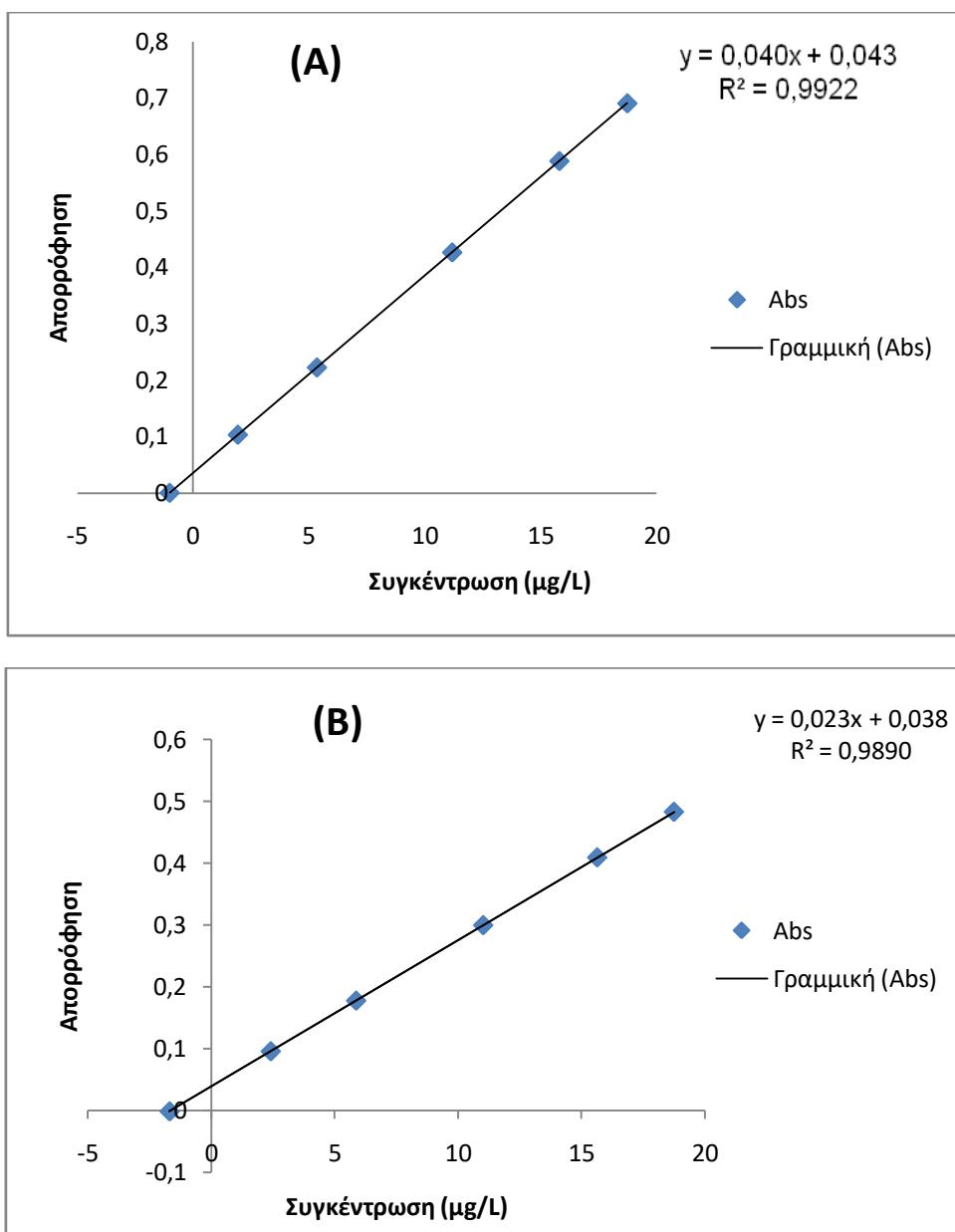
Με αυτόματη πιπέτα των 1000 μL λήφθηκε 1 mL από το αρχικό διάλυμα, το οποίο μεταφέρθηκε σε νέα ογκομετρική φιάλη των 100 mL και με πλήρωση της φιάλης με υπερκάθαρο νερό δημιουργήθηκαν τα διαλύματα μέτρησης των δειγμάτων (αραίωση 1:100).

Στη συνέχεια, παρασκευάστηκαν τα πρότυπα διαλύματα της μεθόδου, συγκέντρωσης 2 ppb, 5 ppb, 10 ppb, 15 ppb και 20 ppb, με αραίωση με υπερκάθαρο νερό. Η παρασκευή των διαλυμάτων πραγματοποιήθηκε ως εξής: από το αρχικό διάλυμα που δημιουργήθηκε μετά τη χώνευση και τη διαδικασία του υδατόλουτρου, λήφθηκαν 200 μL, 500 μL, 1000 μL, (500+1000) μL και 2 x 1000 μL, αντίστοιχα για το κάθε ένα πρότυπο (2, 5, 10, 15, 20 ppb) και μεταφέρθηκαν σε ογκομετρικές φιάλες των 100 mL όπου αραιώθηκαν με υπερκάθαρο νερό μέχρι τη χαραγή.

Με τα παραπάνω πρότυπα διαλύματα, διεξαγόταν κάθε φορά καμπύλη αναφοράς (Εικόνα 3.9) για να πραγματοποιηθεί η μέτρηση των δειγμάτων. Έτσι, προκύπτουν τα όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ) της μεθόδου για τα δείγματα των φύλλων, των ανθοκεφαλών και των ριζών μπρόκολου, που εμφανίζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 3.9: Στοιχεία καμπυλών βαθμονόμησης για τα φύλλα, τις ανθοκεφαλές και τις ρίζες

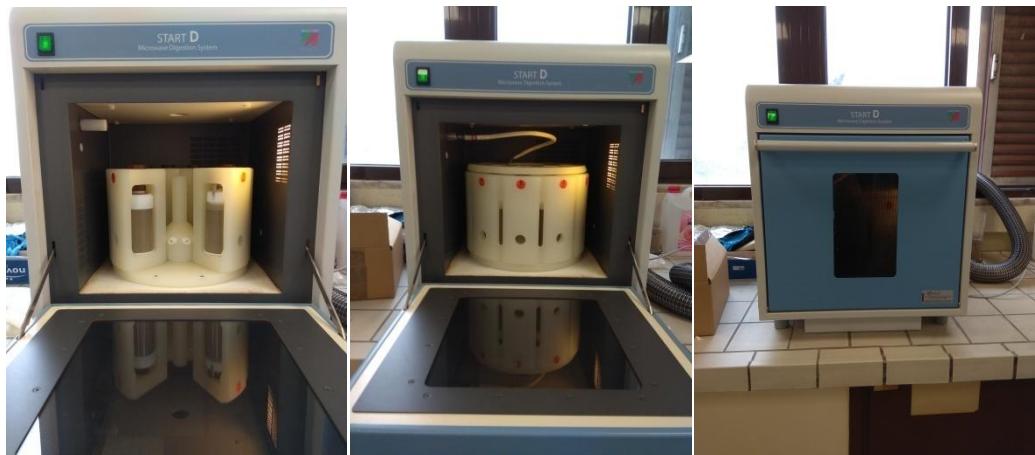
Καμπύλη βαθμονόμησης	Συντελεστής γραμμικότητας r	LOD ($\mu\text{g/L}$)	LOQ ($\mu\text{g/L}$)	Γραμμική περιοχή ($\mu\text{g/L}$)
Φύλλα	0,9922	0,016	0,049	2,0-20,0
Ανθοκεφαλές	0,9922	0,016	0,049	2,0-20,0
Ρίζες	0,9890	0,013	0,040	2,0-20,0



Εικόνα 3.9: Καμπύλη αναφοράς για τον προσδιορισμό του Se στα φύλλα και στις ανθοκεφαλές (A) και για τις ρίζες (B).



Εικόνα 3.10: Τα πρότυπα διαλύματα Se για την HG-AAS



Εικόνα 3.11: Υγρή χώνευση με οξέα στο φούρνο μικροκυμάτων Start D Microwave Digestion System.



Εικόνα 3.12: Τα προς μέτρηση διαλύματα των δειγμάτων για HG-AAS

3.4.3 Συνθήκες στην Ατομική Απορρόφηση με γεννήτρια υδριδίων (HG-AAS)

Για την πραγματοποίηση της τεχνικής γεννήτριας υδριδίων χρειάστηκαν επιπλέον υδατικά διαλύματα. Ένα από αυτά ήταν το HCl 10% (Chem-Lab). Για την παρασκευή του διαλύματος του βοριοϋδριδίου του νατρίου (NaBH_4) σε καυστικό νάτριο (NaOH) της εταιρείας Chem-Lab, ζυγίστηκαν 2,5 g NaOH αρχικά, τα οποία διαλύθηκαν σε 500 mL υπερκάθαρο νερό και έτσι, παρασκευάστηκε το διάλυμα 0,5 % w/v NaOH. Στη συνέχεια, ζυγίστηκε 1,5 g NaBH_4 και διαλύθηκε σε 250 mL του διαλύματος 0,5 % w/v NaOH που παρασκευάστηκε προηγουμένως. Το τελικό διάλυμα που χρειάστηκε η μέθοδος ήταν 0,6 % w/v NaBH_4 σε 0,5 % w/v NaOH.

Για τον σχηματισμό υδριδίων με αναγωγικό βοριοϋδρίδιο του νατρίου (NaBH_4), πραγματοποιείται αντίδραση του NaBH_4 , υπό όξινες συνθήκες, με το διάλυμα που περιέχει μέσα το συστατικό που μας ενδιαφέρει. Στη συνέχεια, σχηματίζονται τα πτητικά υδρίδια και με τη βοήθεια ενός αερίου (αργό ή άζωτο) μεταφέρονται στο θερμαινόμενο σωλήνα χαλαζία. Εκεί, τα υδρίδια ατομοποιούνται με μηχανισμούς θερμικής αποσύνθεσης, οξείδωσης με O_2 και με αντιδράσεις με ελεύθερες ρίζες υδρογόνου.

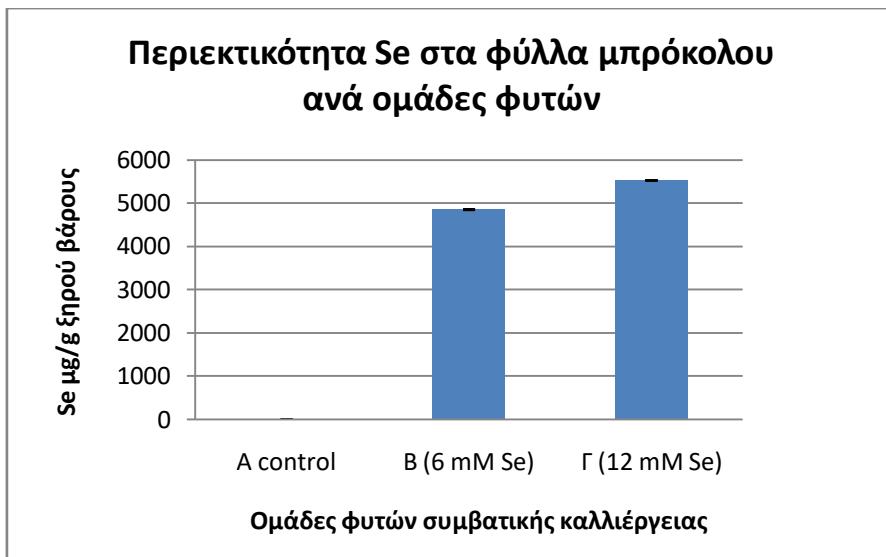
3.4.4 Αποτελέσματα - Συζήτηση

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται η περιεκτικότητα του σεληνίου στα φύλλα των φυτών μπρόκολου της συμβατικής καλλιέργειας ανά ομάδες (Α, Β, Γ).

Πίνακας 3.10: Τιμές περιεκτικότητας Se σε $\mu\text{g/g}$ ξηρού βάρους για τα φύλλα των φυτών μπρόκολου της συμβατικής καλλιέργειας.

Ομάδες	$\mu\text{g Se/g DW}^a \pm \text{SD}^b$
A 0,0 $\mu\text{M Se}$	$0,00 \pm 0,00$
B 6 mM Se	$4847 \pm 1,63$
Γ 12 mM Se	$5525 \pm 3,65$

^aDW: Ξηρό βάρος, ^bSD: Τυπική απόκλιση.



Εικόνα 3.13: Διάγραμμα απεικόνισης της απορρόφησης Se σε μg/ξηρού βάρους των φυτών της συμβατικής καλλιέργειας, ανά ομάδες διαφορετικής συγκέντρωσης.

Η περιεκτικότητα του σεληνίου στα φυτά της ομάδας Β ήταν $4847 \pm 1,63$ μg Se/g DW ενώ στην ομάδα Γ η περιεκτικότητα των φυτών σε σελήνιο ήταν $5525 \pm 3,65$ μg Se/g DW. Από το διάγραμμα της εικόνας 3.13 παρατηρούμε ότι με την αύξηση της συγκέντρωσης του σεληνίου αυξήθηκε και η απορρόφησή του από τα φυτά. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται και από προηγούμενες μελέτες καθώς η ποικιλία Marathon που επιλέχθηκε για τη συμβατική καλλιέργεια έχει μελετηθεί στη βιβλιογραφία (Bañuelos et al., 2003; Šindelářová et al., 2015; Bañuelos et al, 2016).

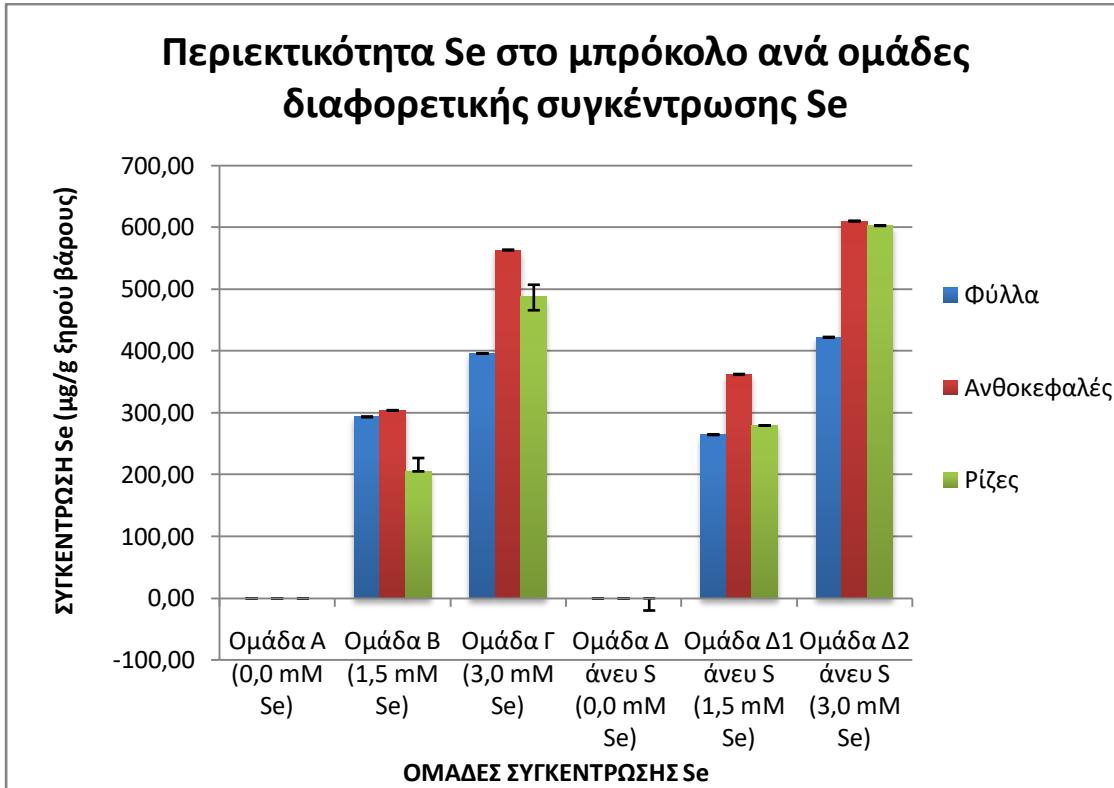
Στον παρακάτω πίνακα παρατηρούμε την περιεκτικότητα του Se στα διάφορα μέρη των φυτών μπρόκολου στην υδροπονική καλλιέργεια.

Πίνακας 3.11: Τιμές περιεκτικότητας Se σε μg/g ξηρού βάρους για τα φύλλα, τις ανθοκεφαλές και τις ρίζες των φυτών μπρόκολου όλων των ομάδων (Α, Β, Γ, Δ, Δ1, Δ2) της υδροπονικής καλλιέργειας.

Ομάδες	Φύλλα μgSe/gDW ^a ± SD ^b	Ανθοκεφαλές μgSe/gDW ^a ± SD ^b	Ρίζες μgSe/gDW ^a ± SD ^b
Α 0,0 mM Se	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0 \pm 0,00$
Β 1,5 mM Se	$293,40 \pm 0,47$	$304,11 \pm 0,19$	$205,33 \pm 21,57$
Γ 3 mM Se	$395,93 \pm 0,29$	$563,33 \pm 0,19$	$487,50 \pm 19,68$
Δ 0,0 mM Se (άνευ S)	$0,00 \pm 0,04$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$
Δ1 1,5 mM Se (άνευ S)	$264,67 \pm 0,50$	$362,17 \pm 0,56$	$279,33 \pm 0,19$
Δ2 3 mM Se (άνευ S)	$422,33 \pm 0,38$	$610,17 \pm 0,38$	$602,50 \pm 0,34$

^aDW: Ξηρό βάρος, ^bSD: Τυπική απόκλιση.

Από τον παραπάνω πίνακα φαίνεται ότι, οι ανθοκεφαλές των φυτών της ομάδας Δ2, έδωσαν την υψηλότερη τιμή μg Se/g ξηρού βάρους. Οι ομάδες Α και Δ που δεν ποτίστηκαν με διάλυμα Se, έδωσαν μηδενικό αποτέλεσμα. Τέλος, τη μικρότερη απορρόφηση Se έδειξαν οι ρίζες των φυτών της ομάδας Β.



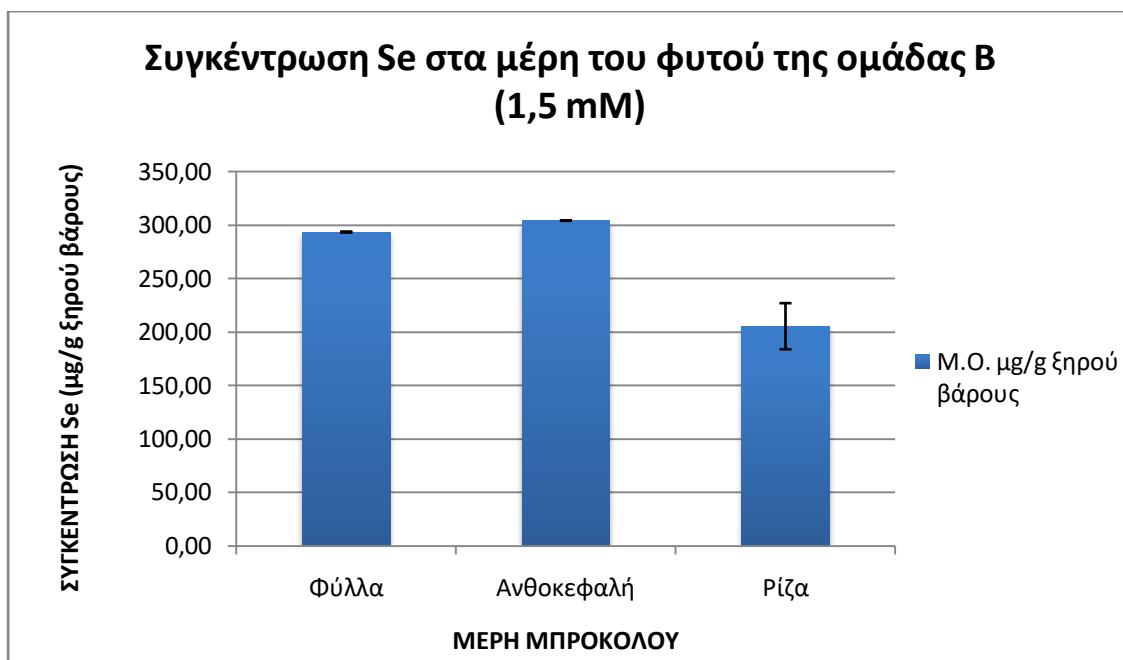
Εικόνα 3.14: Διάγραμμα απεικόνισης της περιεκτικότητας Se, σε μg/ξηρού βάρους, στα φυτά ανά ομάδες διαφορετικής συγκέντρωσης Se στην υδροπονική καλλιέργεια.

Στα φυτά της υδροπονικής καλλιέργειας, όπως φαίνεται από την εικόνα 3.14, μεταξύ των συγκεντρώσεων του Se 1,5 mM και 3 mM, παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στα επίπεδα Se. Στις ομάδες Γ και Δ2, η πρόσληψη Se ήταν αυξημένη, εφόσον τους είχε χορηγηθεί διάλυμα Na_2SeO_4 συγκέντρωσης 3 mM. Αντιθέτως, στις ομάδες Β και Δ1, όπου είχαν ποτιστεί με διάλυμα Na_2SeO_4 1,5 mM, η πρόσληψη Se ήταν μειωμένη σε όλα τα μέρη του φυτού. Η απουσία θείου στις ομάδες Δ1 και Δ2 δεν επηρρέασε σημαντικά τα επίπεδα συγκέντρωσης Se σε σχέση με τις αντίστοιχες ομάδες Β και Γ που είχαν ποτιστεί με την ίδια συγκέντρωση Se.

Ωστόσο, η απορρόφηση του Se από το φυτό εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως τον τρόπο καλλιέργειας αλλά και την ποικιλία (Ramos et al., 2011b). Η ποικιλία Sonora που επιλέχθηκε για την υδροπονική καλλιέργεια, δεν έχει μελετηθεί στη βιβλιογραφία σχετικά με την απορρόφηση του Se.

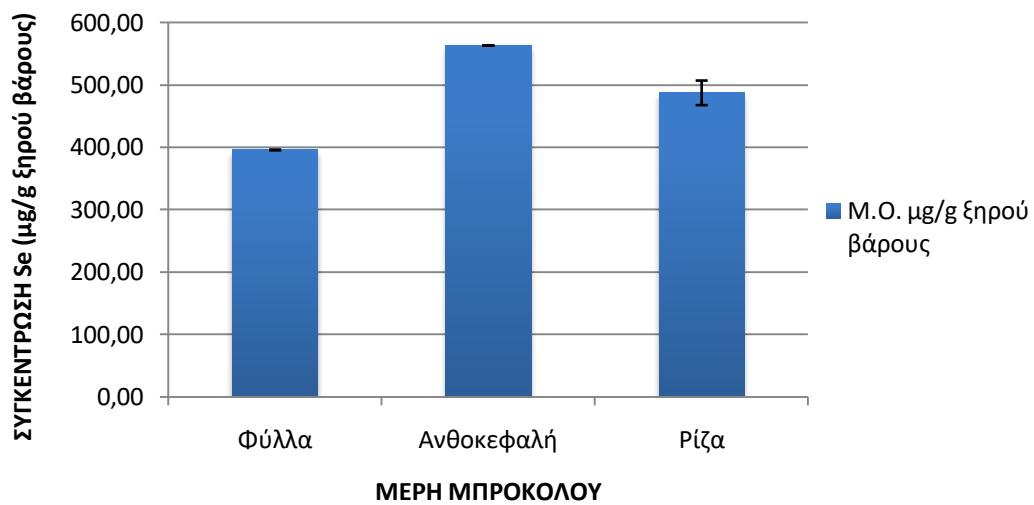
Στις εικόνες 3.15 έως 3.18 παρουσιάζεται η περιεκτικότητα του Se στα φύλλα, τις ανθοκεφαλές και τη ρίζα των φυτών για την κάθε ομάδα (Β, Γ, Δ1, Δ2). Από τα αποτελέσματα παρατηρούμε ότι σε όλες τις ομάδες οι ανθοκεφαλές είχαν την

υψηλότερη συγκέντρωση Se σε σχέση με τα φύλλα και τις ρίζες. Όπως προαναφέρθηκε στην §1.5, η απορρόφηση του σεληνίου από το μπρόκολο γίνεται μέσω της μεταβολικής οδού του S. Επίσης, είναι γνωστό ότι η συγκέντρωση των γλυκοζινολιτών στις ανθοκεφαλές είναι πολύ υψηλότερη από ότι στα υπόλοιπα μέρη του φυτού (Wiesner – Reinhold et al., 2017). Έτσι, οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι οι γλυκοζινολίτες του φυτού έχουν ενσωματώσει το Se αντί του S, δημιουργώντας πιθανότατα σεληνο-γλυκοζινολίτες. Αρκετά υψηλή ήταν η συγκέντρωση του Se, στις ρίζες των φυτών, η οποία στις ομάδες Γ, Δ1 και Δ2 ήταν υψηλότερη από τη συγκέντρωση του Se στα φύλλα. Ενώ, στην ομάδα Β που ποτίστηκε με διάλυμα Se 1,5 mM τα φύλλα απορρόφησαν περισσότερο Se σε σχέση με τη ρίζα.



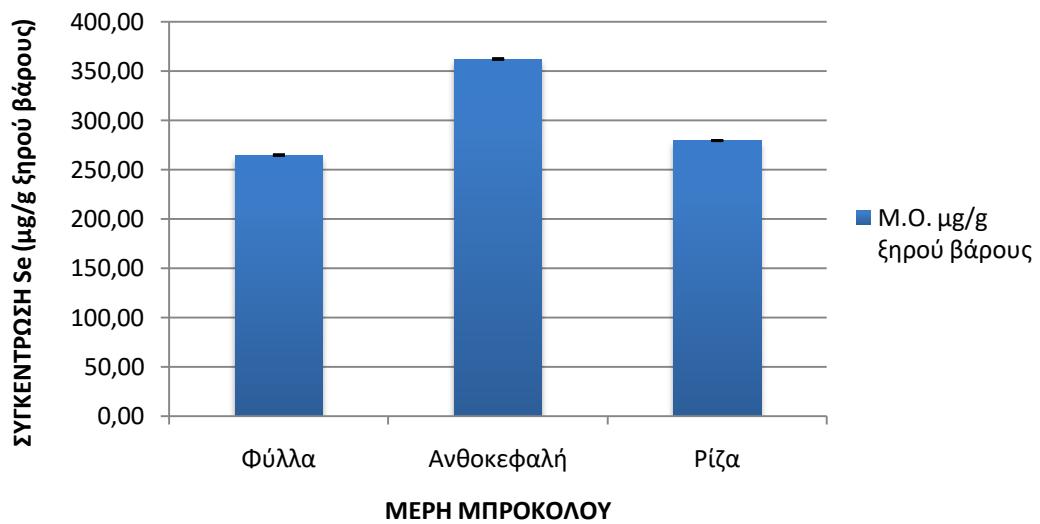
Εικόνα 3.15: Διάγραμμα απεικόνισης της περιεκτικότητας Se στα μέρη του φυτού της ομάδας Β (1,5 mM)

**Συγκέντρωση Se στα μέρη του φυτού της ομάδας Γ
(3 mM)**

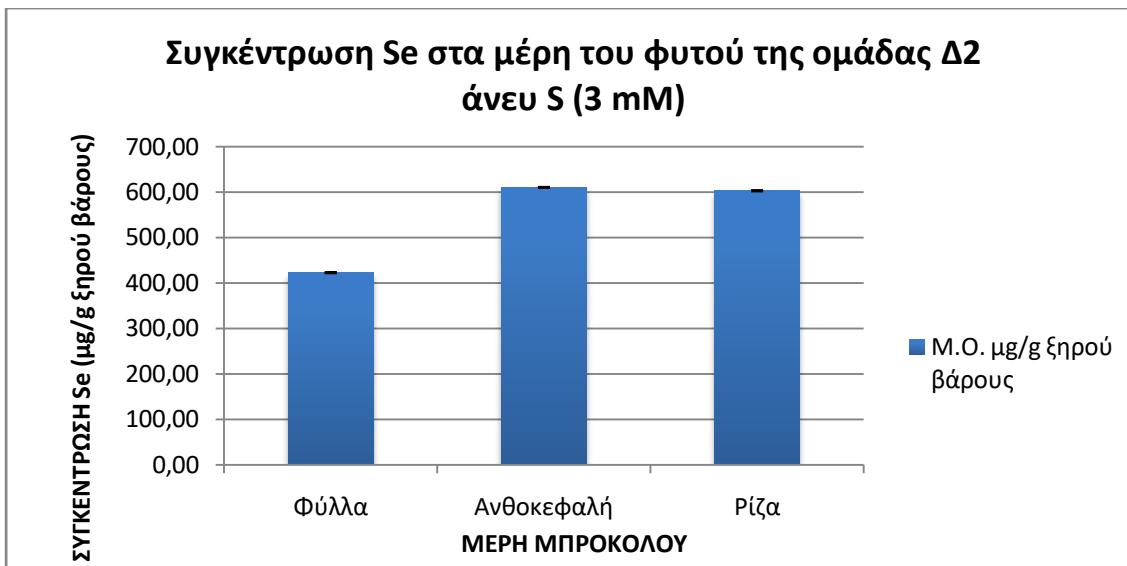


Εικόνα 3.16: Διάγραμμα απεικόνισης της περιεκτικότητας Se στα μέρη του φυτού της ομάδας Γ (3 mM)

**Συγκέντρωση Se στα μέρη του φυτού της ομάδας Δ1
άνευ S (1,5 mM)**

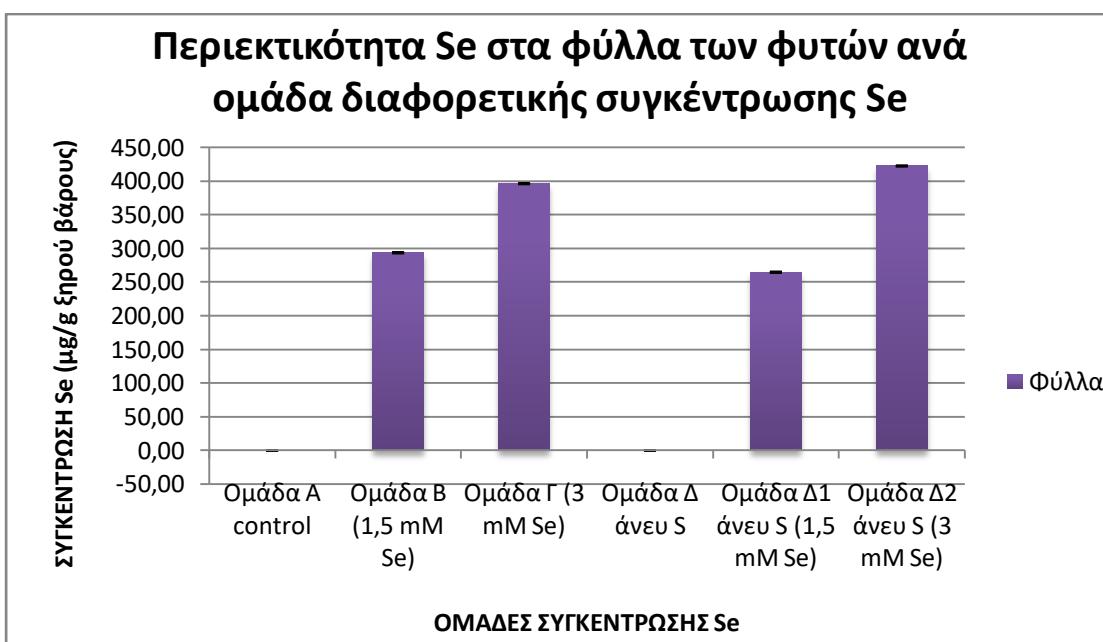


Εικόνα 3.17: Διάγραμμα απεικόνισης της περιεκτικότητας Se στα μέρη του φυτού της ομάδας Δ1 άνευ S (1,5 mM)



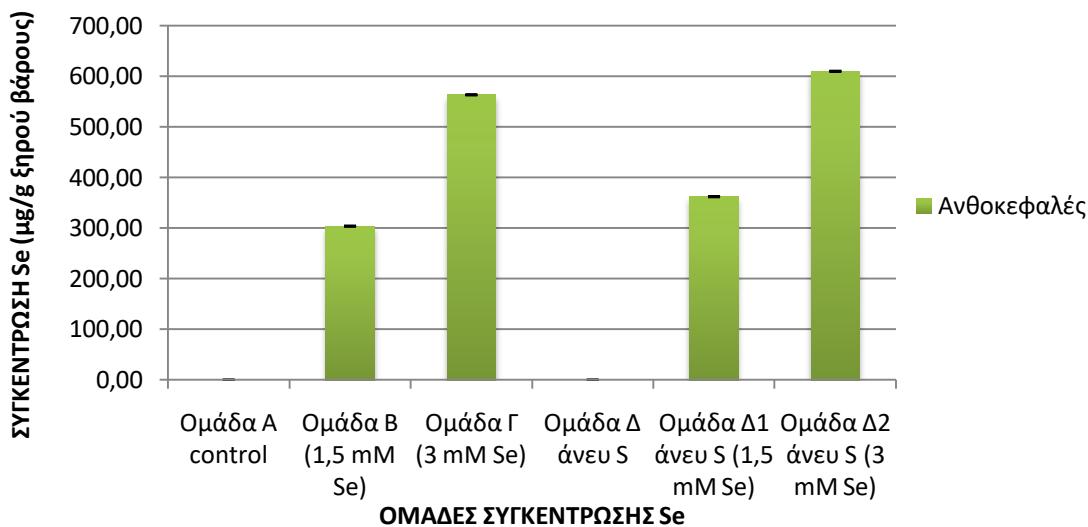
Εικόνα 3.18: Διάγραμμα απεικόνισης της περιεκτικότητας Se στα μέρη του φυτού της ομάδας Δ2 άνευ S (3 mM)

Από τα ραβδογράμματα των εικόνων 3.19, 3.20 και 3.21, συγκρίνοντας την απορρόφηση του Se στα μέρη του φυτού (φύλλα, ανθοκεφαλές, ρίζα), παρατηρούμε ότι αυξανόμενης της συγκέντρωσης βιο-ενίσχυσης του Se στην καλλιέργεια αυξήθηκε παράλληλα και η απορρόφηση του Se σε όλα τα μέρη του φυτού. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση Se παρατηρήθηκε στις ανθοκεφαλές της ομάδας Δ2, όπου αφαιρέθηκε το S από το θρεπτικό υλικό. Τα αποτελέσματα είναι αναμενόμενα καθώς, το Se απορροφάται από το φυτό μέσω της μεταβολικής οδού του S (Hsu et al., 2011). Ωστόσο, όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 3.2.4, η αφαίρεση του S οδήγησε σε μειωμένη ανάπτυξη του φυτού.



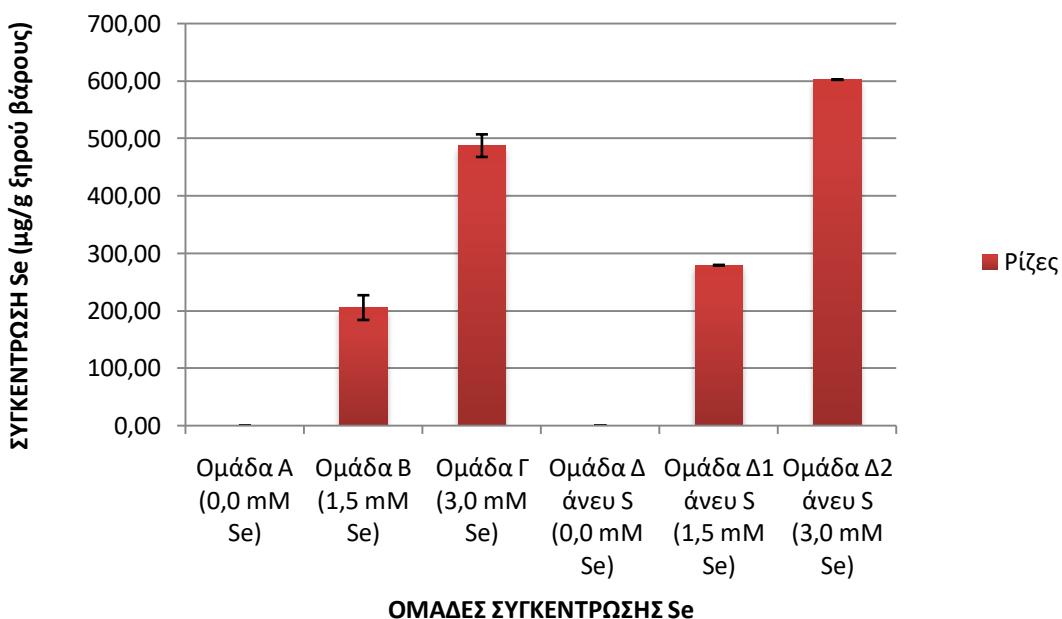
Εικόνα 3.19: Διάγραμμα απεικόνισης της περιεκτικότητας Se στα φύλλα των φυτών ανά ομάδα συγκέντρωσης Se

Περιεκτικότητα Se στις ανθοκεφαλές των φυτών ανά ομάδα διαφορετικής συγκέντρωσης Se



Εικόνα 3.20: Διάγραμμα απεικόνισης της περιεκτικότητας Se στις ανθοκεφαλές των φυτών ανά ομάδα διαφορετικής συγκέντρωσης Se

Περιεκτικότητα Se στις ρίζες των φυτών ανά ομάδα διαφορετικής συγκέντρωσης Se



Εικόνα 3.21: Διάγραμμα απεικόνισης της περιεκτικότητας Se στις ρίζες των φυτών ανά ομάδα διαφορετικής συγκέντρωσης Se

3.5 Ταυτοποίηση ισοθειοκυανικών και ινδολικών ενώσεων με αέρια χρωματογραφία – φασματομετρία μάζας (GC-MS).

3.5.1 Υλικά και όργανα

Για τις κατεργασίες των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν:

- Διχλωρομεθάνιο
- Χωνί διήθησης Buchner
- Διαχωριστική χοάνη
- Άνυδρο Na_2SO_4
- Sample vials
- Σφαιρικές φιάλες

Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε για την αέρια χρωματογραφία και φασματομετρία μάζας GC-MS, ήταν της εταιρίας ThermoScientific, το μοντέλο DSQII, με απλό τετράπολο (Εικόνα 3.22).



Εικόνα 3.22: Όργανο αέριας χρωματογραφίας – φασματομετρίας μάζας ThermoScientificDSQII

3.5.2 Προετοιμασία δειγμάτων στον αέριο χρωματογράφο GC-MS

Η διαδικασία για την εκχύλιση των ισοθειοκυανικών και ινδολικών ενώσεων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Kokotou et al., 2017) ως εξής: Ζυγίστηκαν 0,5 g από κάθε δείγμα και μεταφέρθηκαν σε ποτήρι ζέσεως. Ύστερα, προστέθηκαν 15 mL απιονισμένο νερού pH 7.0. Ανακινήθηκαν και σκεπάστηκαν με

αλουμινόχαρτο. Τοποθετήθηκαν σε υδατόλουντρο στους 40 °C για 3 h ώστε να ολοκληρωθεί η ενζυμική υδρόλυση των γλυκοζινολιτών.

Μετά από το παραπάνω χρονικό διάστημα, προστέθηκαν 20 mL διχλωρομεθανίου (CH_2Cl_2) σε κάθε δείγμα. Τοποθετήθηκαν σε μαγνητικό αναδευτήρα επί 20 min. Ακολούθησε διήθηση με Buchner, τρεις φορές συνολικά, προσθέτοντας 20 mL CH_2Cl_2 κάθε φορά. Στην πορεία, η υδατική φάση απομακρύνθηκε με διαχωριστική χοάνη. Η οργανική φάση συλλέχθηκε και αφυδατώθηκε περεταίρω με προσθήκη μικρής ποσότητας άνυδρου Na_2SO_4 . Έγινε μεταφορά σε σφαιρική φιάλη και συμπύκνωση στους 35 °C υπό κενό μέχρι ξηρού. Υστερα, μεταφέρθηκε το ξηρό υπόλειμμα χρησιμοποιώντας CH_2Cl_2 σε γυάλινο φιαλίδιο.

Ακόμα, ετοιμάστηκε και φιαλίδιο που περιείχε μόνο το διαλύτη, διχλωρομεθάνιο (CH_2Cl_2). Αυτό χρησιμοποιήθηκε ως τυφλό (blanc) στη διαδικασία.

Τα φιαλίδια με τα δείγματα μετρήθηκαν χρησιμοποιώντας τη σύριγγα του οργάνου, χωρητικότητας 1 μL . Πρώτα, περάστηκε ο διαλύτης και ακολούθησαν τα δείγματα. Το κάθε δείγμα περάστηκε τρεις φορές, ενώ ενδιάμεσα διεξάγονταν ενέσεις μόνο με το διαλύτη (blanc) για τον καθαρισμό της στήλης.

3.5.3 Συνθήκες στην Αέρια Χρωματογραφία – Φασματομετρία Μαζών (GC-MS)

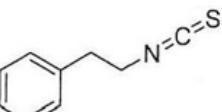
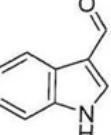
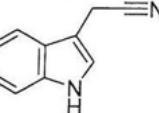
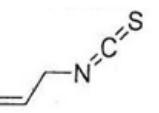
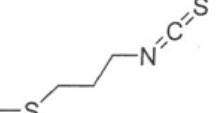
Το όργανο της αέριας χρωματογραφίας είχε, θερμοκρασία εγχυτή 210 °C και στήλη Restek (μήκος 30 m, διάμετρος 0,25 mm και πάχος επένδυσης 0,25 μm). Με βάση τη βιβλιογραφία (Ciska et al., 2015), το θερμοκρασιακό πρόγραμμα ορίστηκε με 35 °C για 5 min, ύστερα άνοδος της θερμοκρασίας 8 °C/min μέχρι τους 210 °C για 10 min. Ο συνολικός χρόνος του προγράμματος ήταν 36.88 min. Η θερμοκρασία γραμμής μεταφοράς (transfer line): 240 °C. Το φέρον αέριο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το ήλιο (He) καθαρότητας 99,999 % με ταχύτητα ροής 1,5 mL/min. Τέλος, εφαρμόστηκε η μέθοδος splitless για 3 λεπτά και στη συνέχεια split με λόγο 1:50.

Για τη φασματομετρία μαζών, χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτής MS με θερμοκρασία πηγής (source): 230°C και εύρος μαζών σάρωσης (mass range): $m/z = 35-550$. Η λήψη των φασμάτων GC-MS πραγματοποιήθηκε στον θετικό ιοντισμό.

3.5.4 Ταυτοποίηση ενώσεων με αέρια χρωματογραφία – φασματομετρία μάζας GC-MS

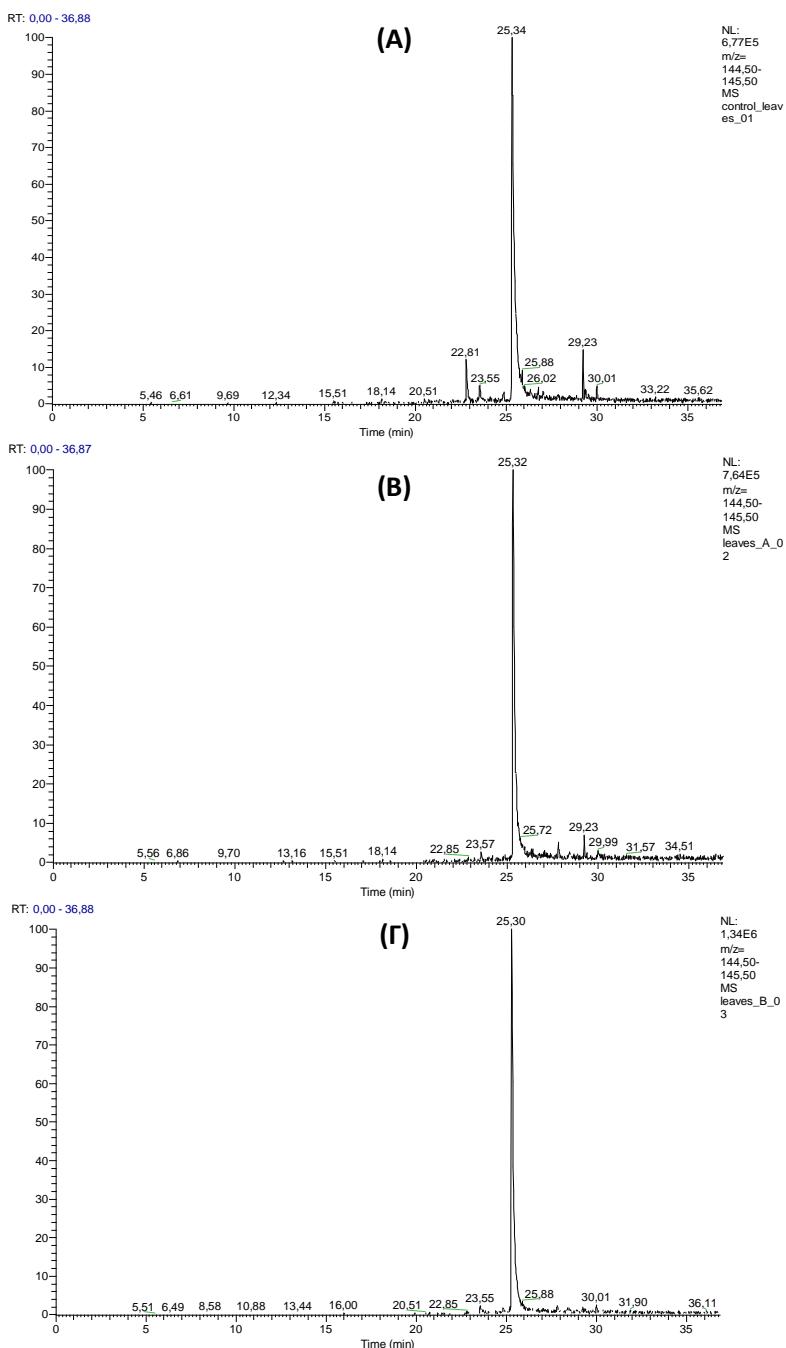
Η ταυτοποίηση των ισοθειοκυανικών και των ινδολικών ενώσεων πραγματοποιήθηκε στα 16 δείγματα της συμβατικής καλλιέργειας (τέσσερα δείγματα χωρίς βιο-ενίσχυση Se, έξι δείγματα με βιο-ενίσχυση Se 6 mM και έξι δείγματα με βιο-ενίσχυση Se 12 mM). Στον πίνακα 3.12 παρουσιάζονται οι ενώσεις που ερευνήθηκαν στα εκχυλίσματα φύλλων μπρόκολου της συμβατικής καλλιέργειας. Η ταυτοποίηση των ενώσεων βασίστηκε στη σύγκριση των φασμάτων μαζών με τα αντίστοιχα φάσματα μάζας της βιβλιοθήκης NIST που υπάρχει στο λογισμικό του οργάνου.

Πίνακας 3.12: Ισοθειοκυανικές και ινδολικές ενώσεις που ερευνήθηκαν στα εκχυλίσματα φύλλων μπρόκολου συμβατικής καλλιέργειας.

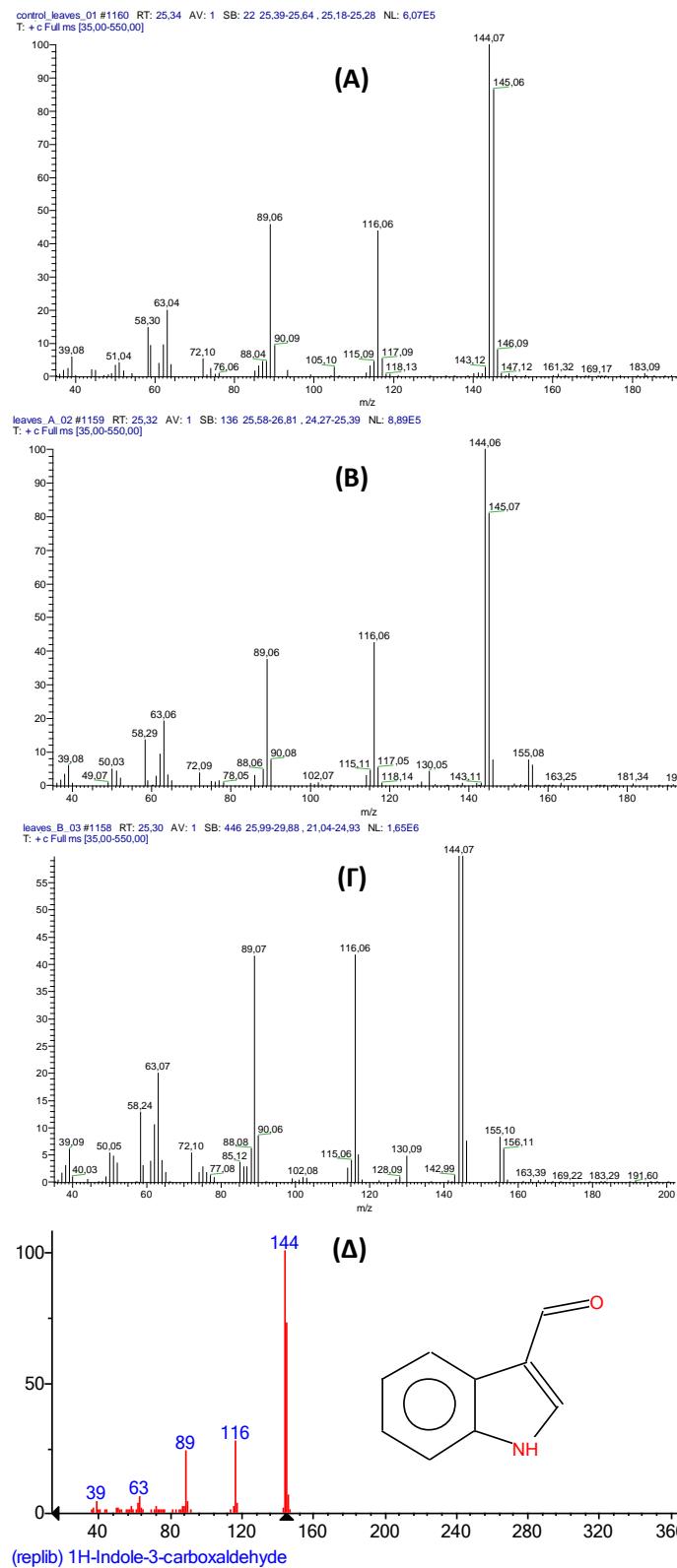
Αριθμός ένωσης	Ενώσεις	Μοριακό βάρος
[1]	 (2-Isothiocyanatoethyl)benzene (2-Ισοθειοκυανατοαιθυλο)βενζόλιο	163,04
[2]	 5-(Methylthio)pentanenitrile 5-(Μεθυλθειο)πεντανονιτρίλιο	129,06
[3]	 1 <i>H</i> -Indole-3-carbaldehyde 1 <i>H</i> -Ινδολο-3-καρβαλδεΰδη	145,05
[4]	 1 <i>H</i> -ινδολο-3-ακετονιτρίλιο 1 <i>H</i> -Ινδολο-3-ακετονιτρίλιο	156,06
[5]	 3-Isothiocyanatoprop-1-ene 3-Ισοθειοκυανατοπροπ-1-ένιο	99,01
[6]	 (4-Isothiocyanatobutyl)(methyl)sulfane (4-Ισοθειοκυανατοβουτυλο)(μεθυλο)σουλφάνιο	161,03
[7]	 (3-Isothiocyanatopropyl)(methyl)sulfane (3-Ισοθειοκυανατοπροπυλο)(μεθυλο)σουλφάνιο	147,02

3.5.5 Αποτελέσματα - Συζήτηση

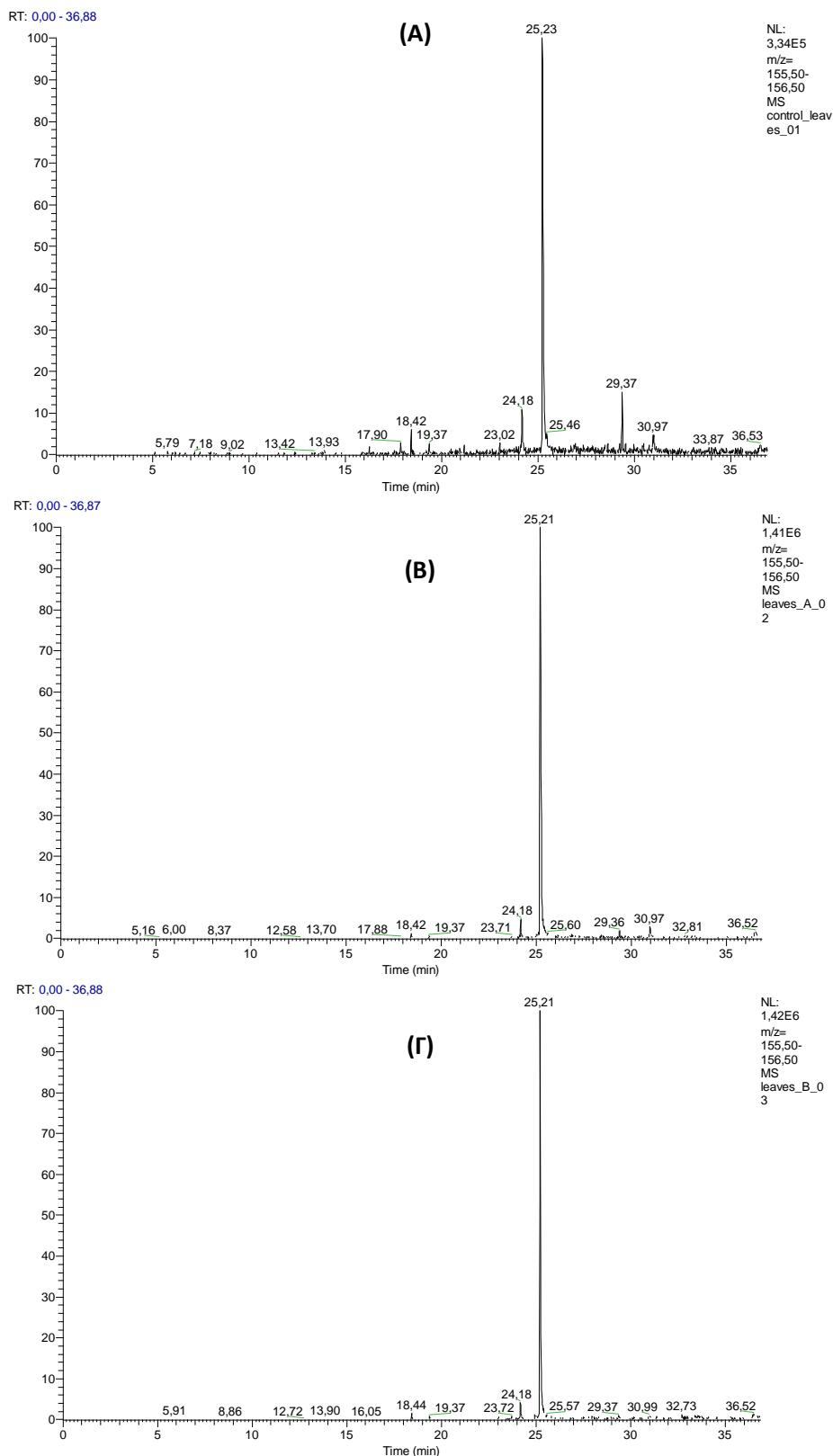
Η ανάλυση των εκχυλισμάτων από τα φύλλα του μπρόκολου της συμβατικής καλλιέργειας κατέληξε στην ταυτοποίηση των ενώσεων *1H*-ινδολο-3-καρβαλδεϋδη [3](Εικόνες 3.23 & 3.24) και *1H*-ινδολο-3-ακετονιτρίλιο [4] σε όλα τα δείγματα (Εικόνες 3.25 & 3.26).



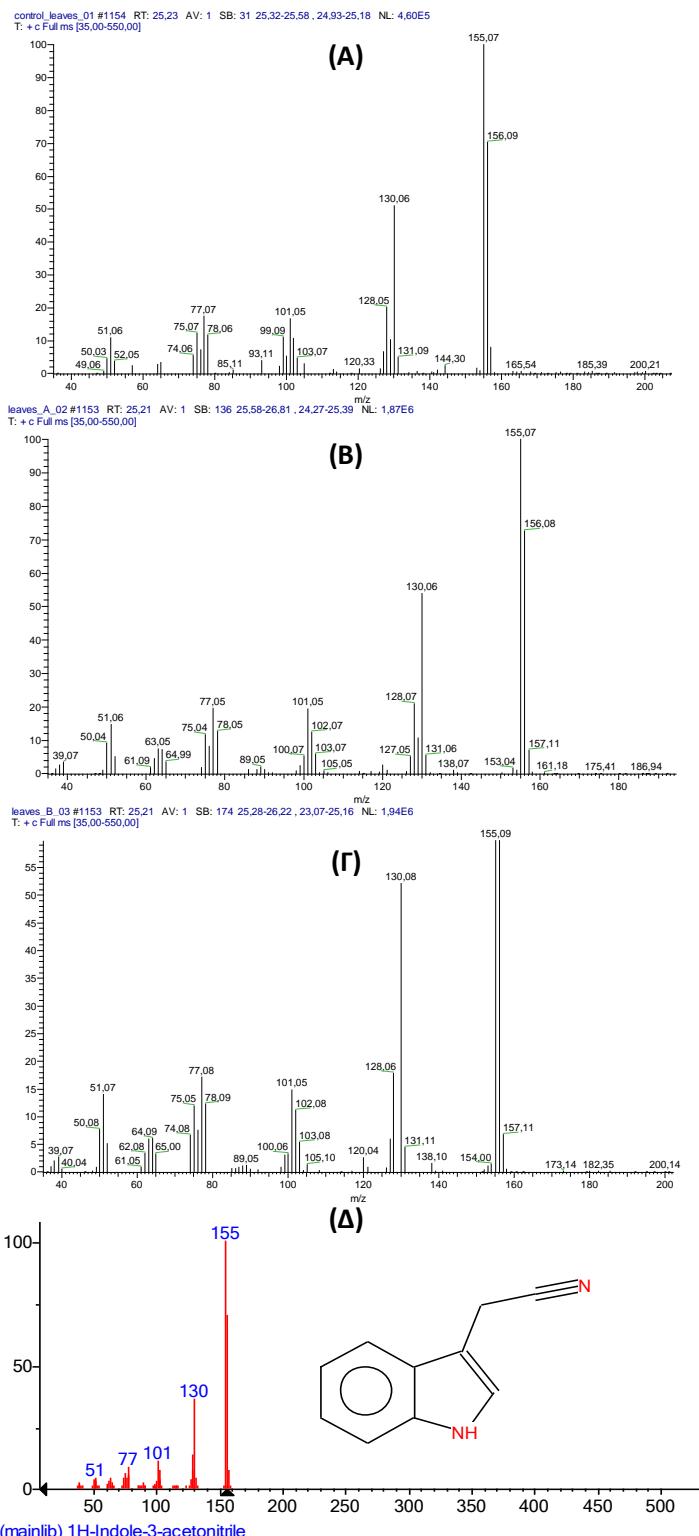
Εικόνα 3.23: (Α) Αέριο χρωματογράφημα εκχυλίσματος μπρόκολου χωρίς βιο-ενίσχυση με Se, σε εύρος μαζών m/z 144,50-145,50. (Β) Αέριο χρωματογράφημα εκχυλίσματος μπρόκολου με βιο-ενίσχυση με Se 6 mM, σε εύρος μαζών m/z 144,50-145,50. (Γ) Αέριο χρωματογράφημα εκχυλίσματος μπρόκολου με βιο-ενίσχυση με Se 12 mM, σε εύρος μαζών m/z 144,50-145,50.



Εικόνα 3.24: (Α) Φάσμα μαζών της ένωσης [3] σε χρόνο κατακράτησης 25,34 min σε εκχύλισμα μπρόκολου χωρίς βιο-ενίσχυση με Se. (Β) Φάσμα μαζών της ένωσης [3] σε χρόνο κατακράτησης 25,32 min σε εκχύλισμα μπρόκολου με βιο-ενίσχυση με Se 6 mM. (Γ) Φάσμα μαζών της ένωσης [3] σε χρόνο κατακράτησης 25,30 min σε εκχύλισμα μπρόκολου με βιο-ενίσχυση με Se 12 mM. (Δ) Φάσμα μαζών της ένωσης [3] από τη βιβλιοθήκη της NIST.

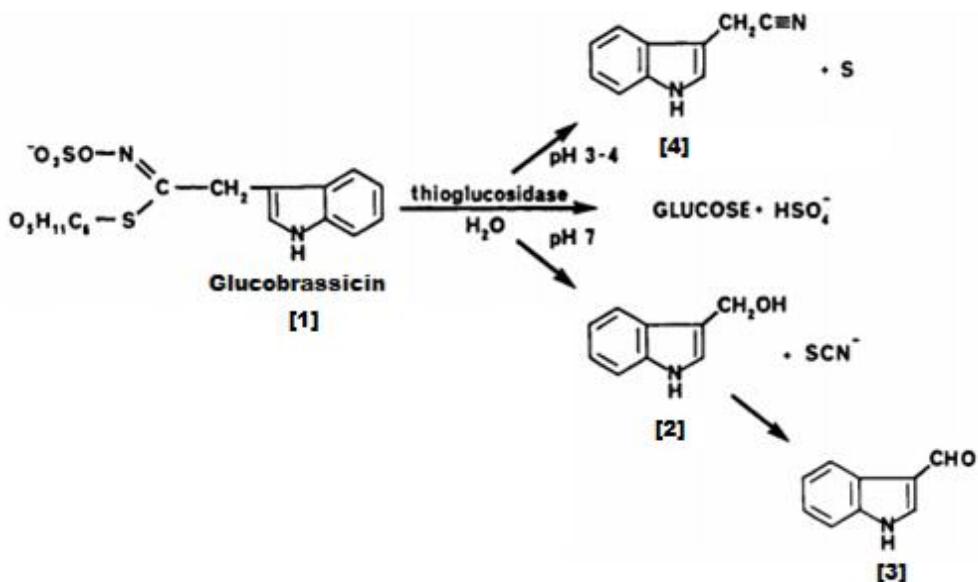


Εικόνα 3.25: (Α) Αέριο χρωματογράφημα εκχυλίσματος μπρόκολου χωρίς βιο-ενίσχυση με Se, σε εύρος μαζών m/z 155,50-156,50. (Β) Αέριο χρωματογράφημα εκχυλίσματος μπρόκολου με βιο-ενίσχυση με Se 6 mM, σε εύρος μαζών m/z 155,50-156,50. (Γ) Αέριο χρωματογράφημα εκχυλίσματος μπρόκολου με βιο-ενίσχυση με Se 12 mM, σε εύρος μαζών m/z 155,50-156,50.



Εικόνα 3.26: (Α) Φάσμα μαζών της ένωσης [4] σε χρόνο κατακράτησης 25,23 min σε εκχύλισμα μπρόκολου χωρίς βιο-ενίσχυση με Se. (Β) Φάσμα μαζών της ένωσης [4] σε χρόνο κατακράτησης 25,21 min σε εκχύλισμα μπρόκολου με βιο-ενίσχυση με Se 6 mM. (Γ) Φάσμα μαζών της ένωσης [4] σε χρόνο κατακράτησης 25,21 min σε εκχύλισμα μπρόκολου με βιο-ενίσχυση με Se 12 mM. (Δ) Φάσμα μαζών της ένωσης [4] από τη βιβλιοθήκη της NIST.

Η ταυτοποίηση των ενώσεων [3] και [4] στα εκχυλίσματα ήταν αναμενόμενη καθότι οι ενώσεις αυτές αποτελούν προϊόντα της ενζυμικής υδρόλυσης του γλυκοζινολίτη γλυκομπρασικίνη (glucobrassicin) (Εικόνα 3.27), ο οποίος βρίσκεται σε υψηλή συγκέντρωση στο μπρόκολο (Bradfield & Bjeldanes, 1987). Ειδικότερα, η ένωση [4] λαμβάνεται κυρίως όταν η ενζυμική υδρόλυση γίνεται υπό οξινες συνθήκες pH, ενώ η ένωση [3] λαμβάνεται κυρίως σε ουδέτερο pH. Ωστόσο, ένα ποσοστό της ένωσης [4] προϋπάρχει στο μπρόκολο καθώς η ίδια ένωση αποτελεί και ενδιάμεσο προϊόν κατά τη βιοσύνθεση της αυξίνης ινδολο-3-οξικό οξύ (Korasick et al., 2013).



Εικόνα 3.27: Ενζυμική υδρόλυση του γλυκοζινολίτη γλυκομπρασικίνη.

Οι ενώσεις [1], [2], [5], [6] και [7] δεν ταυτοποιήθηκαν στα εκχυλίσματα καθώς σύμφωνα με τη βιβλιογραφία περιέχονται σε αρκετά μικρές ποσότητες στο μπρόκολο. Η ένωση [1] είναι μια ισοθειοκυανική ένωση η οποία προέρχεται από την ενζυμική υδρόλυση του γλυκοζινολίτη γλυκοναστορτιίνη (gluconasturtiin). Στο μπρόκολο υπάρχει σε χαμηλές συγκεντρώσεις οι οποίες υπάρχουν κυρίως στις ρίζες του φυτού. Η ένωση [2] είναι ένα νιτρίλιο που προέρχεται από την ενζυμική υδρόλυση της γλυκοραφανίνης (glucoraphanine) παρουσία ιόντων Fe²⁺ σε pH 4 (Hanschen & Schreiner, 2017). Περιέχεται κυρίως στα γογγύλια, ενώ στο μπρόκολο έχει ταυτοποιηθεί αλλά δεν έχει ποσοτικοποιηθεί λόγω της χαμηλής του συγκέντρωσης (Buttery et al., 1976). Η ισοθειοκυανική ένωση [5] παράγεται κατά την ενζυμική υδρόλυση του γλυκοζινολίτη σινιγκρίνη (sinigrin) και βρίσκεται σε μικρές συγκεντρώσεις, κυρίως στις ανθοκεφαλές του μπρόκολου (Hansen et al., 1995; Hanschen & Schreiner, 2017). Οι ισοθειοκυανικές ενώσεις [6] και [7] προέρχονται από τους γλυκοζινολίτες γλυκοερουκίνη (glucoerucin) και γλυκοϊμπερίνη (glucoiberin), αντίστοιχα. Η γλυκοερουκίνη περιέχεται κυρίως στη ρόκα και πολύ λιγότερο στις ανθοκεφαλές του μπρόκολου (Arora et al., 2014; Hanschen &

Schreiner, 2017), ενώ η γλυκοϊμπερίνη περιέχεται στο μπρόκολο επίσης σε μικρές ποσότητες (Hansen et al., 1995).

Όπως προαναφέρθηκε το μπρόκολο μπορεί να απορροφήσει μεγάλες ποσότητες σεληνίου μέσω της μεταβολικής οδού του θείου. Ωστόσο σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η απορρόφηση υψηλών συγκεντρώσεων σεληνίου από το μπρόκολο δεν επηρρεάζει τη συγκέντρωση του ολικού θείου και των θειούχων ενώσεων όπως οι γλυκοζινολίτες (McKenzie et al., 2017). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης με GC-MS των εκχυλισμάτων από φύλλα μπρόκολου είναι σύμφωνα με τη βιβλιογραφία καθώς οι ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν στα δείγματα μπρόκολου χωρίς τη βιο-ενίσχυση με σελήνιο, βρέθηκαν και στα υπόλοιπα δείγματα με βιο-ενίσχυση με σελήνιο συγκέντρωσης 6 mM και 12 mM.

Βιβλιογραφία

- Achibat, H., AlOmari, N.A., Messina, F., Sancinetto, L., Khouili, M., Santi, C. 2015. Organoselenium compounds as phytochemicals from the natural kingdom. *Natural Product Communication*, 10(10), 1885–1892.
- Alfthan, G., Eurola, M., Ekholm, P., Venäläinen, E.R., Root, T., Korkalainen, K., Hartikainen, H., Salminen, P., Hietaniemi, V., Aspila, P., Aro, A. 2015. Effects of nationwide addition of selenium to fertilizers on foods, and animal and human health in Finland: From deficiency to optimal selenium status of the population. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 31, 142–147.
- Altundag, H. & Tuzen, M. 2011. Comparison of dry, wet and microwave digestion methods for the multi element determination in some dried fruit samples by ICP-OES. *Food and Chemical Toxicology*, 49(11), 2800–2807.
- Alvez, M.R., Starling, A.L., Kanufre, V.C., Soares, R.D., Norton, R.C., Aguiar, M.J., Januario, J.N. 2012. Selenium intake and nutritional status of children with phenylketonuria in Minas Gerais, Brazil. *Jornal de Pediatria (Rio J.)*, 88, 396–400.
- Angelino, D., Jeffery, E. 2014. Glucosinolate hydrolysis and bioavailability of resulting isothiocyanates: Focus on glucoraphanin. *Journal of Functional Foods*, 7, 67–76.
- Arora, R., Sharma, D., Kumar, R., Singh, B., Vig, A. P., Arora, S. 2014. Evaluating extraction conditions of glucosinolate hydrolytic products from seeds of *Eruca sativa* (Mill.) Thell. using GC-MS. *Journal of Food Science*, 79(10), C1964–1969.
- Ávila, F.W., Faquin, V., Yang, Y., Ramos, S.J., Guilherme, L.R.G., Thannhauser, T.W., Li, L. 2013. Assessment of the anticancer compounds Se-methylselenocysteine and glucosinolates in Se-biofortified broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) sprouts and florets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(26), 6216–6223.
- Bañuelos, G. S., Pasakdee, S., Finley, J. W. 2003. Growth response and selenium and boron distribution in broccoli varieties irrigated with poor quality water. *Journal of Plant Nutrition*, 26(12), 2537–2549.
- Bañuelos, G. S., Arroyo, I. S., Dangi, S. R., Zambrano, M. C. 2016. Continued selenium biofortification of carrots and broccoli grown in soils once amended with Se-enriched *S. pinnata*. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1251.
- Barickman, T.C., Kopsell, D.A., Sams, C.E. 2012. Selenium influences glucosinolate and isothiocyanates and increases sulfur uptake in *Arabidopsis thaliana* and rapid-cycling *Brassica oleracea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(1), 202–209.
- Bitterli, C., Banuelos, G.S., Schulin, R. 2010. Use of transfer factors to characterize uptake of selenium by plants. *Journal of Geochemical Exploration*, 107, 206–216.

- Bones, A. & Rossiter, J. 2006. The enzymic and chemically induced decomposition of glucosinolates. *Phytochemistry*, 67, 1053–1067.
- Bourre, J.M.& Galea, F. 2006. An important source of omega-3 fatty acids, vitamins D and E, carotenoids, iodine and selenium: A new natural multi-enriched egg. *The Journal of Nutrition Health and Aging*, 10, 371–376.
- Bradfield, C. A., Bjeldanes, L. F. 1987. High-performance liquid chromatographic analysis of anticarcinogenic indoles in *Brassica oleracea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 35(1), 46–49.
- Burrow, M. & Halkier, B.A.2017. How does a plant orchestrate defense in time and space? Using glucosinolates in *Arabidopsis* as case study. *Current Opinion in Plant Biology*, 38, 142–147.
- Butterly, R.G., Dan G. Guadagni, D.G., Ling, L.C., Seifert, R.M., Lipton, W. 1976. Additional volatile components of cabbage, broccoli, and cauliflower. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 24(4), 829–832.
- Charron, C.S., Kospell, D.A., Randle, W.M., Sams, C.E. 2001. Sodium selenate fertilisation increases selenium accumulation and decreases glucosinolate concentration in rapid-cycling *Brassica oleracea*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 962–966.
- Chen, L., Yang, F., Xu, J., Hu, Y., Hu, Q., Zhang, Y., Pan, G. 2002. Determination of selenium concentration of rice in China and effect of fertilization of selenite and selenate on selenium content of rice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(18), 5128–5130.
- Ciska, E., Drabińska, N., Honke, J., Narwojsz, A. 2015. Boiled Brussels sprouts: A rich source of glucosinolates and the corresponding nitriles. *Journal of Functional Foods*, 19, 91–99.
- Combs G. F. Jr. 2001. Selenium in global food systems. *British Journal of Nutrition*, 85, 517–547.
- Demirel, S., Tuzen, M., Saracoglu, S., Soylak, M. 2008. Evaluation of various digestion procedures for trace element contents of some food materials. *Journal of Hazardous Materials*, 152(3), 1020–1026.
- Diowksz, A., Pęczkowska, B., Włodarczyk, M., Ambroziak, W. 2000. Bacteria/yeast and plant biomass enriched in Se via bioconversion process as a source of Se supplementation in food. *Progress in Biotechnology*, 17, 295–300.
- Drutel, A., Archambeaud, F.,Caron, P. 2013. Selenium and the thyroid gland: more good news for clinicians. *Clinical Endocrinology*, 78(2), 155–164.
- Dumont, E., Vanhaecke, F., Cornelis, R. 2006. Selenium speciation from food source to metabolites: A critical review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 385(7), 1304–1323.
- Emmert, S.W., Desai, D., Amin, S., Richie, J.P. 2010. Enhanced Nrf2-dependent induction of glutathione in mouse embryonic fibroblasts by isoselenocyanate analog of sulforaphane. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20(8), 2675–2679.

- Eroglu, C., Unal, D., Cetin, A., Orhan, O., Sivgin, S., Oztürk, A. 2012. Effect of serum selenium levels on radiotherapy-related toxicity in patients undergoing radiotherapy for head and neck cancer. *Anticancer Research*, 32, 3587–3590.
- European Food Safety Authority (EFSA) 2008. Scientific opinion of the panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food [AFC] on a request from the commission on selenium-enriched yeast as source for selenium. *EFSA Journal*, 766, 1–42.
- Fairweather-Tait, S.J., Collins, R. 2010. Selenium bioavailability: Current knowledge and future research requirements. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 91(5), 1484S–1491S.
- FDA, 2008. Agency Response Letter GRAS Notice No GRN 000260, FDA: Silver Spring, MD, USA.
- Fedor, J. 2005. Οργανική Κηπουρική για τον 21ο Αιώνα, Εκδόσεις για την Ελληνική γλώσσα Γιάννης Β. Βασδέκης, Αθήνα.
- Fernández-Martínez, A., Charlet, L. 2009. Selenium bioavailability and cycling in the environment: A structural chemist point of view. *Reviews in Environment Science and Bio/Technology*, 8(1), 81–110.
- Fimognari, C., Hrelia, P., (2007). Sulforaphane as a promising molecule for fighting cancer. *Mutation Research / Reviews in Mutation Research*, 635(2-3), 90–104.
- Finley, J.W. 2005. Selenium accumulation in plant foods. *Nutrition Reviews*, 63(6), 196–202.
- Finley, J.W. 2006. Bioavailability of selenium from foods. *Nutrition Reviews*, 64(3), 146–151.
- Fisinin, V.I., Papazyan, T.T., Surai, P.F. 2009. Producing selenium-enriched eggs and meat to improve the selenium status of the general population. *Critical Reviews in Biotechnology*, 29(1), 18–28.
- Fordyce, F. 2007. Selenium geochemistry and health. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*, 36(1), 94-97.
- Fordyce, F.M. 2005. Essentials of medical geology, Selenium deficiency and toxicity in the environment. Elsevier Academic Press: Amsterdam, The Netherlands, 373–416.
- Fujioka, N., Fritz, V., Upadhyaya, P., Kassie, F., Hecht, S.S. 2016. Research on cruciferous vegetables, indole-3-carbinol, and cancer prevention: A tribute to Lee W. Wattenberg. *Molecular Nutrition & Food Research*, 60(6), 1228–1238.
- Grubb, C.D., Abel, S. 2006. Glucosinolate metabolism and its control. *Trends in Plant Science*, 11(2), 89–100.
- Haddadin M.S.Y., Khattari S., Caretto Daniela, Robinson R.K. 2001. Potential intake of selenium by the inhabitants of different regions in Jordan. *Nutrition & Food Science*, 31(5), 230–233.
- Halkier, B.A., Gershenson, J. 2006. Biology and chemistry of glucosinolates. *Annual Review of Plant Biology*, 57(1), 303–333.

- Hanschen F.S.& Schreiner M. 2017. Isothiocyanates, nitriles, and epithionitriles from glucosinolates are affected by genotype and developmental stage in *Brassica oleracea* varieties. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1095.
- Hansen, M., Møller, P., Sørensen, H., Cantwell de Trejo, M. 1995. Glucosinolates in broccoli stored under controlled atmosphere. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 120(6), 1069–1074.
- Hawkesford, M. J. & Zhao, F.-J. 2007. Strategies for increasing the selenium content of wheat. *Journal of Cereal Science*, 46(3), 282–292.
- Holben, D.H. & Smith, A.M. 1999. The diverse role of selenium within selenoproteins: a review. *Journal of the American Dietetic Association*, 99(7), 836–843.
- Hsu, F.-C., Wirtz, M., Heppel, S.C., Bogs, J., Krämer, U., Khan, M.S., Bub, A., Hell, R., Rausch, T. 2010. Generation of Se-fortified broccoli as functional food: impact of Se fertilization on S metabolism. *Plant, Cell & Environment*, 34(2), 192–207.
- Kieliszek, M.& Błażejak, S. 2013. Selenium: Significance, and outlook for supplementation. *Nutrition*, 29(5), 713–718.
- Kieliszek, M., Błażejak, S. 2016. Current knowledge on the importance of selenium in food for living organisms: A review. *Molecules*, 21, 609.
- Kieliszek, M., Błażejak, S., Bzducha-Wróbel, A. 2015. Influence of selenium content in the culture medium on protein profile of yeast cells *Candida utilis* ATCC 9950. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1–6.
- Kieliszek, M., Błażejak, S., Bzducha-Wróbel, A., Kurcz, A. 2016. Effects of selenium on morphological changes in *Candida utilis* ATCC 9950 yeast cells. *Biological Trace Element Research*, 169(2), 387–393.
- Kieliszek, M., Błażejak, S., Gientka, I., Bzducha-Wróbel, A. 2015. Accumulation and metabolism of selenium by yeast cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(13), 5373–5382.
- Kieliszek, M., Błażejak, S., Jędrzejczak, R. 2012. Wiązanie selenu przez drożdże paszowe *Candida utilis* ATCC 9950. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 45, 628–633.
- Kim, H.S.& Juvik, J.A. 2011. Effect of selenium fertilization and methyl jasmonate treatment on glucosinolate accumulation in broccoli florets. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 136, 239–246.
- Kokotou, M.G., Revelou, P.K., Pappas, C.S. Constantinou-Kokotou, V. 2017. High resolution mass spectrometry studies of sulforaphane and indole-3-carbinol in broccoli samples. *Food Chemistry*, 237, 566–573.
- Korasick, D. A., Enders, T. A., Strader, L. C. 2013. Auxin biosynthesis and storage forms. *Journal of Experimental Botany*, 64(9), 2541–2555.
- Kryczyk, J.& Zagrodzki, P. 2013. Selen w chorobie Gravesa-Basedowa. *Postepy Hig Med Dosw.*, 67, 491–498.

- Kumar, A. R & Riyazuddin, P. 2005. Mechanism of volatile hydride formation and their atomization in hydride generation atomic absorption spectrometry. *Analytical Sciences*, 21(12), 1401–1410.
- Lyi, S.M., Heller, L.I., Rutzke, M., Welch, R. M., Kochian, L.V., Li, L. 2005. Molecular and biochemical characterization of the selenocysteine Se-methyltransferase gene and Se-methylselenocysteine synthesis in broccoli. *Plant Physiology*, 138, 409–420.
- Mahn, A. 2017. Modelling of the effect of selenium fertilization on the content of bioactive compounds in broccoli heads. *Food Chemistry*, 233, 492–499.
- Maseko, T., Callahan, D.L., Dunshea, F.R., Doronila, A., Kolev, S., Ng, K. 2013. Chemical characterization and speciation of organic selenium in cultivated selenium-enriched *Agaricus bisporus*. *Food Chemistry*, 141(4), 3681–3687.
- Matich, A.J., McKenzie, M.J., Lill, R.E., Brummell, D.A., McGhie, T.K., Chen, R.K.Y., Rowan, D.D. 2012. Selenoglucosinolates and their metabolites produced in *Brassica spp.* fertilised with sodium selenate. *Phytochemistry*, 75, 140–152.
- Matich, A.J., McKenzie, M.J., Lill, R.E., McGhie, T.K., Chen, R.K.Y., Rowan, D.D. 2015. Distribution of selenoglucosinolates and their metabolites in Brassica treated with sodium selenate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(7), 1896–1905.
- McCarthy, H. T. & Ellis P. C. 1991. Comparison of microwave digestion with conventional wet ashing and dry ashing digestion for analysis of lead, cadmium, chromium, copper, and zinc in shellfish by flame atomic absorption spectroscopy. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 74(3), 566–569.
- McKenzie, M.J., Chen, R.K.Y., Leung, S., Joshi, S., Rippon, P.E., Joyce, N.I., McManus, M.T. 2017. Selenium treatment differentially affects sulfur metabolism in high and low glucosinolate producing cultivars of broccoli (*Brassica oleracea* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 121, 176–186.
- McSheehy, S., Yang, L., Mester, Z. 2006. Selenomethionine extraction from selenized yeast: An LC-MS Study of the acid hydrolysis of a synthetic selenopeptide. *Microchimica Acta*, 155, 373–377.
- Mehdi, Y., Hornick, J.L., Istasse, L., Dufrasne, I. 2013. Selenium in the environment, metabolism and involvement in body functions. *Molecules*, 18, 3292–3311.
- Navarro-Alarcon, M. & Cabrera-Vique, C. 2008. Selenium in food and the human body: A review. *Science of The Total Environment*, 400(1-3), 115–141.
- Niwińska, B., Andrzejewski, M. 2013. Selen w żywieniu bydła. *Roczniki Nauk. Zoot.*, 40, 97–107.
- Ogawa-Wong, A.N., Berry, M.J., Seale, L.A. 2016. Selenium and metabolic disorders: An emphasis on type 2 diabetes risk. *Nutrients*, 8(2), 80.

- Oldfield, J.E. 2002. A brief history of selenium research: From alkali disease to prostate cancer (from poison to prevention). *Journal of Animal Science*, Online supplement, 11(1), 1–4.
- Pedrero, Z., Madrid, Y. 2009. Novel approaches for selenium speciation in foodstuffs and biological specimens: A review. *Analytica Chimica Acta*, 634, 135–152.
- Pérez-Corona, M.T., Sánchez-Martínez, M., Valderrama, M., Rodríguez, M.E., Cámaras, C., Madrid, Y. 2011. Selenium biotransformation by *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* during white wine manufacture: Laboratory-scale experiments. *Food Chemistry*, 124, 1050–1055.
- Ramos, S.J., Faquin, V., Guilherme, L.R.G., Castro, E.M., Ávila, F.W., Carvalho, G.S., Bastos, C.E.A., Oliveira, C. 2010. Selenium biofortification and antioxidant activity in lettuce plants fed with selenate and selenite. *Plant, Soil and Environment*, 56, 584–588.
- Ramos, S. J., Rutzke, M. A., Hayes, R. J., Faquin, V., Guilherme, L. R. G., & Li, L. 2010a. Selenium accumulation in lettuce germplasm. *Planta*, 233(4), 649–660.
- Ramos, S. J., Yuan, Y., Faquin, V., Guilherme, L. R. G., Li, L. 2011b. Evaluation of genotypic variation of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) in response to selenium treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(8), 3657–3665.
- Rayman, M.P. 2000. The importance of selenium to human health. *The Lancet*, 356(9225), 233–241.
- Rayman, M.P. 2004. The use of high-selenium yeast to raise selenium status: How does it measure up?. *British Journal of Nutrition*, 92(4), 557–573.
- Reamer, D.C. & Veillon, C.A. 1983. Double isotope dilution method for using stable selenium isotopes in metabolic tracer studies: analysis by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). *The Journal of Nutrition*, 113(4), 786–792.
- Reza, G.A., Emam – Djomeh, Z., Tahmashbi, M. 2009. Effect of various drying methods on texture and color of tomato halves. *Transfer Phenomena Laboratory, Technology and engineering*, 49, 237–246.
- Robbins, R.J., Keck, A-S., Banuelos, G., Finley, J.W. 2005. Cultivation conditions and selenium fertilization alter the phenolic profile, glucosinolate, and sulforaphane content of broccoli. *Journal of Medical Food*, 8(2), 204–214.
- Ros, G.H., van Rotterdam, A.M.D, Bussink, D.W., Bindraban, P.S. 2016. Selenium fertilization strategies for bio-fortification of food: An agro-ecosystem approach. *Plant and Soil*, 404, 99–112.
- Ruseva, B., Himcheva, I., Nankova, D. 2013. Importance of selenoproteins for the function of the thyroid gland. *Medicine*, 3, 60–64.
- Schiavon, M., Berto, C., Malagoli, M., Trentin, A., Sambo, P., Dall' Acqua, S., Pilon-Smits, E.A.H. 2016. Selenium biofortification in radish enhances

- nutritional quality via accumulation of methyl-selenocysteine and promotion of transcripts and metabolites related to glucosinolates, phenolics, and amino acids. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1371.
- Scott, M.L. 1973. The selenium dilemma. *The Journal of Nutrition*, 103(6), 803–810.
 - Sharma, S., Bansal, A., Dhillon, S. K., Dhillon, K. S. 2009. Comparative effects of selenate and selenite on growth and biochemical composition of rapeseed (*Brassica napus L.*). *Plant and Soil*, 329(1-2), 339–348.
 - Šindelářová, K., Száková, J., Tremlová, J., Mestek, O., Praus, L., Kaňa, A., Najmanová, J., Tlustoš, P. 2015. The response of broccoli (*Brassica oleracea* convar. *italica*) varieties on foliar application of selenium: uptake, translocation, and speciation. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 32(12), 2027–2038.
 - Skoog Douglas A., Holler James F., Crouch Stanley R. 1990. Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης, 5^η έκδοση. Μετάφραση: Καραγιάννης Μ., Ευσταθίου Κ., Χανιωτάκης Ν. Εκδόσεις Κωσταράκης 2002.
 - Șlencu, B.G., Ciobanu, C., Cuciureanu, R. 2012. Selenium content in foodstuffs and its nutritional requirement for humans. *Clujul Medical*, 85, 139–145.
 - Sønderby, I.E., Geu-Flores, F., Halkier, B.A. 2010. Biosynthesis of glucosinolates – gene discovery and beyond. *Trends in Plant Science*, 15(5), 283–290.
 - Stabnikova, O., Ivanov, V., Larionova, I., Stabnikov, V., Bryszewska, M.A., Lewis, J. 2008. Ukrainian dietary bakery product with selenium-enriched yeast. *LWT - Food Science and Technology*, 41, 890–895.
 - Steinbrenner, H., Al-Quraishi, S., Dkhil, M.A., Wunderlich, F., Sies, H. 2015. Dietary selenium in adjuvant therapy of viral and bacterial infections. *Advances in Nutrition*, 6, 73–82.
 - Stolińska, H. & Wolańska, D. 2012. Składniki pokarmowe istotne w niedoczynności tarczycy. *Żywienie Człowieka i Metabolizm*, 39, 221–231.
 - Szucik, K., Gondek, M., Belkot, Z., Kursa, K. 2014. Zawartość selenu w mięśniach i narządach wewnętrznych koni rzeźnych w zależności od ich wieku i płci. *Żywność Nauka, Technologia, Jakość*, 5, 63–71.
 - Terry, N., Zayed, A.M., De Souza, M.P., Tarun, A.S. 2000. Selenium in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51, 401–432.
 - Tian, M., Hui, M., Thannhauser, T.W., Pan, S., Li, L. 2017. Selenium-induced toxicity is counteracted by sulfur in broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*). *Frontiers in Plant Science*, 8, 1425.
 - Tian, M., Yang, Y., Ávila, F.W., Fish, T., Yuan, H., Hui, M., Pan, S., Thanhauer, T., Li, L. 2018. Effects of selenium supplementation on glucosinolate biosynthesis in broccoli. *Journal of Agricultural and Chemistry*, 66(30), 8036–8044.

- Tinggi, U. 2003. Essentiality and toxicity of selenium and its status in Australia: A review. *Toxicology Letters*, 137(1-2), 103–110.
- Traka, M. & Mithen, R. 2008. Glucosinolates, isothiocyanates and human health. *Phytochemistry Reviews*, 8(1), 269–282.
- Vallejo, F., Tomás-Barberán F.A., Benavente-García, A.G., García-Viguera, C. 2003. Total and individual glucosinolate contents in inflorescences of eight broccoli cultivars grown under various climatic and fertilisation conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(4), 307–313.
- Van Bakel, M.M., Printzen, G., Wermuth, B., Wiesmann, U.N. 2000. Antioxidant and thyroid hormone status in selenium-deficient phenylketonuric and hyperphenylalaninemic patients. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 72, 976–981.
- Wąsowicz, W., Gromadzińska, J., Rydzynski, K., Tomczak, J. 2003. Selenium status of low-selenium area residents: Polish experience. *Toxicology Letters*, 137, 95–101.
- Wesołowski, M. 2006. Selen-pierwiastek życia. *Panacea*, 3, 12–16.
- Whanger, P.D. 2002. Selenocompounds in plants and animals and their biological significance. *Journal of the American College of Nutrition*, 21(3), 223–232.
- Wiesner-Reinhold, M., Schreiner, M., Baldermann, S., Schwarz, D., Hanschen, F.S., Kipp, A.P., Rowan, D.D., Bentley-Hewitt, K.L., McKenzie, M. J. 2017. Mechanisms of selenium enrichment and measurement in brassicaceous vegetables, and their application to human health. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1365.
- World Health Organization. 2004. Vitamin and Mineral Requirements in Human Nutrition. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation. World Health Organization: Bangkok, Thailand, Geneva, Switzerland.
- Zagrodzki, P., Laszczyk, P. 2006. Selenium and cardiovascular disease: Selected issues. *Postepy Hig Med Dosw.*, 60, 624–631.
- Κουκουλάκης Π. Χ., Παπαδόπουλος Α. Η. 2003. Η ερμηνεία της φυλλοδιαγνωστικής. Εκδόσεις Αθ. Σταμούλης, Αθήνα, σελ. 515.
- Ολύμπιος, Χ. 2009. Τα λαχανικά της οικογένειας των σταυρανθών. Χαρακτηριστικά, απαιτήσεις, καλλιεργητική τεχνική. Γεωργία-Κτηνοτροφία, 10, 14–28.
- Σάββας Δ., Παπάζης Γ. 2009. Θρέψη και λίπανση σταυρανθών λαχανικών. Γεωργία και Κτηνοτροφία, 10, 30–36.
- Σαρλής, Π.Γ. 1999. Συστηματική Βοτανική-Εφαρμογές Κορμοφύτων, Εκδόσεις Αθ. Σταμούλης, Αθήνα.
- Στράτης, Ι., Θεμελής, Δ., Ζαχαριάδης Γ., Ανθεμίδης Α., Οικονόμου Α. 2004. Ενόργανη Χημική Ανάλυση ΙΙ. Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη.
- Χα, Α. και Πετρόπουλος Σ. 2014. Γενική λαχανοκομία και υπαίθρια καλλιέργεια λαχανικών. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας, Βόλος.

