

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Maja VOGRINČIČ

PORAZDELITEV SELENA V NAVADNI AJDI
(*Fagopyrum esculentum* Moench)

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2008

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Maja VOGRINČIČ

PORAZDELITEV SELENA V NAVADNI AJDI
(*Fagopyrum esculentum* Moench)

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

SELENIUM DISTRIBUTION IN COMMON BUCKWHEAT
(*Fagopyrum esculentum* Moench)

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2008



In če to stvarstvo sploh ne more v mere,
ki vanje tlači ga človeški duh?
(J. Menart)

S tem diplomskim delom zaključujem univerzitetni študij agronomije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Poskus je bil izveden na polju v Klečah, analiza pa v laboratorijih Odseka za znanosti o okolju na Institutu Jožef Stefan v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za agronomijo je za mentorico diplomskega dela imenovala izr. prof. dr. Vekoslavo Stibilj, za somentorja pa akademika prof. dr. Ivana Krefta.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Katja VADNAL
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica: izr. prof. dr. Vekoslava STIBILJ
Institut Jožef Stefan, Odsek za znanosti o okolju

Član: akademik prof. dr. Ivan KREFT
Univerza v Ljubljani, Biotehniška Fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Dominik VODNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Maja VOGRINČIČ

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK UDK 633.12:631.81.095.337:546.23:631.547.2 (043.2)
KG ajda / selen / foliarno gnojenje / razvoj
AV VOGRINČIČ, Maja
SA STIBILJ, Vekoslava (mentorica) / KREFT, Ivan (somentor)
KZ SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
LI 2008
IN PORAZDELITEV SELENA V NAVADNI AJDI (*Fagopyrum esculentum* Moench)
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP IX, 37, [1] str., 9 pregl., 14 sl., 47 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Selen je esencialen element, njegov glavni vir pa je hrana. Če ga zaužijemo premalo, se pojavijo znaki pomanjkanja, ob prevelikih količinah pa deluje toksično. Težavam, ki jih povzroči nezadostna količina tega elementa v prehrani, se lahko izognemo tudi z uživanjem rastlin, ki so obogatene s selenom. V naši raziskavi smo za poskus izbrali navadno ajdo (*Fagopyrum esculentum* Moench, cv. Darja), ki je vsestransko uporabna rastlina z zelo dobro prehransko vrednostjo. Namen našega dela je bil ugotoviti, v kolikšni meri se s foliarnim dodajanjem selena poveča njegova vsebnost v posameznih delih rastline ajde ter kako se njegova koncentracija spreminja glede na stopnjo dozorelosti. Rastline so bile posejane v Klečah 23.7.2005. V začetku cvetenja smo poskusno skupino poškropili z raztopino natrijevega selenata (10 mgSe/L). Prvo vzorčenje v obeh skupinah smo opravili 65, drugo pa 79 dni po setvi. Odvzeli smo več naključnih vzorcev, jih posušili na zraku in zmleli. Vsebnost selena v posameznih delih rastlin smo nato izmerili z metodo hidridne tehnike atomske fluorescenčne spektrometrije (HG-AFS). Ugotovili smo, da je kontrolna skupina rastlin v vseh svojih delih vsebovala zelo malo selena (od 5 do 45 ng/g suhe snovi), največ ga je bilo v steblih, listih, pediclih in nezrelem zrnju. V foliarno gnojeni skupini se je vsebnost selena glede na posamezne dele rastline povečala za 50 do 500 krat v primerjavi s kontrolno skupino. Najbolj se je koncentracija selena povečala v zrelem zrnju (s 6 na 3500 ng/g suhe snovi). V obeh skupinah rastlin smo opazili podobno porazdelitev selena po posameznih delih rastline. Vsebnost selena se glede na čas vzorčenja in s tem na različno dolžino rastne dobe ni pomembno razlikovala. Za uporabo ajde, obogatene s selenom v človeški prehrani, bi bilo potrebno kontrolirano foliarno gnojenje ter spremljanje koncentracije selena v zrnju.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 633.12:631.81:095.337:546.23:631.547.2 (043.2)
CX common buckwheat / selenium / foliar application / plant development
AU VOGRINČIČ, Maja
AA STIBILJ, Vekoslava (supervisor) / KREFT, Ivan (co-supervisor)
PP SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
PY 2008
TI SELENIUM DISTRIBUTION IN COMMON BUCKWHEAT (*Fagopyrum esculentum* Moench)
DT Graduation Thesis (university studies)
NO IX, 37, [1] p., 9 tab., 14 fig., 47 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Selenium is an essential element for humans and food is its primary source. Insufficient doses of selenium result in deficiency problems while overdoses cause toxic reactions. Deficiency problems could be avoided with consumption of selenium enriched plants. As a test plant we've chosen buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench, cv. Darja). The aim of our work was to find out how foliar addition of selenium affects the content of this element in parts of buckwheat plant and how its concentration changes due to plant's ripening. Plants were sown on field in Kleče on 23.7.2005. At flowering phase we sprayed one group of plants with sodium selenate (10 mgSe/L). First sampling of both tested and control group was carried out 65 and the second sampling 79 days after sowing. Each sample was air dried and milled. Total selenium content in parts of plants was analyzed by hydride generation atomic fluorescence spectrometry (HG-AFS). Results show that all plant parts in control group contain low selenium values (5-45 ngSe/g dry matter), the majority of it in stems, leaves, flower remains and unripe seeds. Selenium content in treated group was, regarding to various parts of plant, 50 to 500-fold higher than in control group. The highest difference in concentration between control and treated group is noticed in ripe seeds (from 6 to 3500 ngSe/g dry matter). We can see very similar selenium distribution in plant parts in both control and treated group. The difference in selenium concentration between two ripening times was not significant. For possible use of selenium enriched buckwheat in human diet we should control foliar spraying and monitor selenium content in seeds and diet.

KAZALO VSEBINE

Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Okrajšave in simboli	IX
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA IN NAMEN DIPLOMSKE NALOGE	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 AJDA	3
2.2 SELEN	4
2.2.1 Selen in njegove spojine v bioloških sistemih	4
2.2.2 Selen v tleh in njegova razpoložljivost	5
2.2.3 Selen in rastline	6
2.2.3.1 Privzem, prenos in razporeditev selena pri višjih rastlinah	7
2.2.3.2 Toksičnost Se v rastlinah in obrambni mehanizmi	9
2.2.3.3 Rastline obogatene s selenom	10
2.2.4 Pomen selena za ljudi	10
2.2.4.1 Preskrbljenost človeka s selenom	11
2.2.4.2 Znaki pomanjkanja	11
2.2.4.3 Toksičnost selena	11
2.3 METODE MERJENJA VSEBNOSTI SELENA V RASTLINSKIH VZORCIH ...	12
2.3.1 Vzorčenje in razkroj vzorcev	12
2.3.2 Metode detekcije selena	13
2.3.3 Hidridna tehnika atomske fluorescenčne spektrometrije (HG-AFS)	13
2.3.3.1 Hidridna tehnika	14
2.3.3.2 Atomska fluorescenčna spektrometrija (AFS)	14
3 MATERIALI IN METODE	16
3.1 POLJSKI POSKUS	16
3.1.1 Vremenske razmere	16
3.2 VZORCI	17
3.2.1 Priprava vzorcev	18
3.3 REAGENTI	18
3.4 APARATURE	18
3.5 METODA ZA DOLOČITEV SELENA	19
3.5.1 Razkroj vzorcev	19
3.5.2 Standardne raztopine	19
3.5.3 Merjenje koncentracije selena	19
3.5.4 Pravilnost in ponovljivost metode	21
4 REZULTATI	23
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	32

5.1 RAZPRAVA.....	32
5.2 SKLEPI.....	34
6 POVZETEK.....	35
7 LITERATURA	36
ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Obseg njiv, posejanih z ajdo v hektarjih	3
Preglednica 2: Pridelek ajde v tonah	3
Preglednica 3: Specifični selenoproteini z znano vlogo v organizmu sesalcev	5
Preglednica 4: Najpogosteje uporabljene metode za detekcijo selena v živilih	13
Preglednica 5: Optimalne razmere za merjenje	20
Preglednica 6: Koncentracija Se (ng/g suhe snovi) v posameznih delih ajde iz kontrolne skupine, vzorčene 26.9.2005	23
Preglednica 7: Koncentracija Se (ng/g suhe snovi) v posameznih delih ajde iz kontrolne skupine, vzorčene 10.10.2005	24
Preglednica 8: Koncentracija Se (ng/g suhe snovi) v posameznih delih ajde, obogatene s selenom, vzorčene 26.9.2005	26
Preglednica 9: Koncentracija Se (ng/g suhe snovi) v posameznih delih ajde, obogatene s selenom, vzorčene 10.10.2005	27

KAZALO SLIK

Slika 1: Privzem selenata s sekundarnim aktivnim kotransportom, ki ga omogoča protonska črpalka	7
Slika 2: Metabolizem Se v akumulirajočih in neakumulirajočih rastlinah	8
Slika 3: Shema AFS	14
Slika 4: Posamezni deli rastline ajde	17
Slika 5: Shema pretočnega sistema HG-AFS	20
Slika 6: Kontrolna karta merjenja koncentracije selen v certificiranem referenčnem materialu Spinach Leaves, NIST 1570a	21
Slika 7: Kontrolna karta merjenja koncentracije selen v certificiranem referenčnem materialu Wheat Flour, NIST 1567a	22
Slika 8: Kontrolna karta merjenja koncentracije selen v referenčnem materialu Corn Bran, NIST 8433	22
Slika 9: Koncentracija Se (ng/g suhe snovi) v posameznih delih ajde iz kontrolne skupine, vzorčene 26.9.2005	23
Slika 10: Koncentracija Se (ng/g suhe snovi) v posameznih delih ajde iz kontrolne skupine, vzorčene 10.10.2005	24
Slika 11: Koncentracija Se (ng/gSS) v posameznih delih ajde iz kontrolne skupine, vzorčene 26.9.2005 in 10.10.2005.	25
Slika 12: Koncentracija Se (ng/g suhe snovi) v posameznih delih ajde, obogatene s selenom, vzorčene 26.9.2005	26
Slika 13: Koncentracija Se (ng/g suhe snovi) v posameznih delih ajde, obogatene s selenom, vzorčene 10.10.2005	28
Slika 14: Koncentracija Se (ng/gSS) v posameznih delih ajde, obogatene s selenom, vzorčene 26.9.2005 in 10.10.2005.	28

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Se	selen
Met	metionin
Cys	cistein
SeMet	selenometionin
SeCys	selenocistein
SeMeSeCys	selenometilselenocistein
RDA	priporočen dnevni vnos
CRM	certificiran referenčni material
RM	referenčni material
GPx	družina glutation peroksidaz
D	družina jodotironin dejodinaz
TrxR	družina tioredoksin reduktaz
DMDS_e	dimetildiselenid
DMSe	dimetilselenid
HG-AFS	hidridna tehnika atomske fluorescenčne spektrometrije
AFS	atomska fluorescenčni spektrometer
n	število določitev
N	število vzorcev
povp	povprečje
stdev/a	standardni odmik (št. določitev > 2) / absolutna napaka (št. določitev ≤ 2)
POVP	povprečje
STDEV	standardni odmik

1 UVOD

S kemijskimi elementi se srečujemo vsakodnevno, saj so tesno povezani z našim življenjem, zdravjem in dobrim počutjem. Med te pomembne elemente spada tudi selen, ki ga v naravi najdemo v zelo nizkih koncentracijah (do 100 ng/g vzorca); pravimo, da je prisoten v sledovih. Selen je kemijski element, ki se nahaja v VI. skupini periodnega sistema med žveplom in telurjem. Leta 1818 ga je odkril J. J. Berzelius.

Je esencialen (neobhodno potreben) element v sledovih za ljudi in živali, njegov primarni vir pa je hrana. Esencialna biološka vloga se mu pripisuje od leta 1957, ko sta Schwarz in Foltz (1957) dokazala pomembnost elementa za življenje živali, leta 1973 pa so odkrili vezavo Se v selenobeljakovino, in sicer v encim glutation peroksidazo (Rotruck in sod., 1973). Prav tako je sestavni del številnih drugih funkcionalnih selenoproteinov, selenoaminokislina selenocistein pa se uvršča med esencialne aminokislino.

Tudi za selen lahko rečemo, da velja trditev, da je vsaka zdravilna učinkovina v prevelikih količinah tudi strup. Čeprav je nujen za življenje ljudi in živali, saj ima pozitivne učinke na rast ter pomembno antioksidativno, antikancerogeno in antitumorigeno vlogo, velja to le za nižje koncentracije (do 200 µg/dan). Pri previsokih koncentracijah (nad 1000 µg/dan) ima genotoksične in kancerogene učinke, nad 3200 µg/dan povzroča selenozo (Reid in sod., 2004), pri prenizkih odmerkih (pod 11 µg/dan) pa se pojavijo znaki pomanjkanja (Letavayova in sod., 2006). Iz tega sledi, da je pomembno zaužiti primerne količine tega elementa. Ker so ponavadi v hrani le-te nezadostne, se na tržišču pojavljajo prehranska dopolnila s selenom, kot alternativa tem kemijskim pripravkom pa se v zadnjem času pojavljajo tudi živila s povečano količino naravno prisotnega selena.

Čeprav esencialnost selena za rastline ni dokazana, lahko ima v določenih primerih na njihovo rast in obrambo pred stresom pozitivne učinke. Njegova vsebnost v rastlinah je različna in predvsem odvisna od vsebnosti elementa v tleh in sposobnosti rastline za privzem le-tega. Koncentracije se lahko gibljejo od zelo nizkih pa do toksičnih. Najpomembnejše pa je, da je od vsebnosti selena v rastlinah odvisna količina tega elementa v prehrani ljudi in živali. Veliko selena vsebujejo predvsem živila z veliko vsebnostjo beljakovin, predvsem drobovina, meso mišičnine in jajca, veliko ga je tudi v morskih sadežih, precej manj pa ga je v mleku in mlečnih izdelkih ter sadju, zelenjavi in žitih (Smrkolj in sod., 2005). Od leta 1989 je v Sloveniji dovoljeno dodajanje Se živalski krmi, od leta 2005 pa je s Pravilnikom o krmnih dodatkih (2005) določena tudi največja

dovoljena količina selena v krmnih mešanicah (0,5 mgSe/kg). Kljub temu, da je vsebnost selena v žitih nizka, pa so z upoštevanjem zaužitih količin žita ter mlevskih in pekarskih izdelkov v prehrani le-ti pomemben vir selena.

Med žitne izdelke uvrščamo tudi izdelke iz ajde, čeprav ajda sama ne sodi med žita. Ajda izvira iz Kitajske in je v Evropo prišla na prehodu iz 14. v 15. stoletje. Je dvokaličnica, ki spada v družino dresnovk (*Polygonaceae*). V preteklosti je bila zelo cenjena in pogosta jed predvsem revnih ljudi, ki so jo veliko pridelovali, nato pa je z umikanjem bolj rodovitnim poljščinam začela toniti v pozabo. V novejšem času postaja ponovno vse bolj priljubljena predvsem zaradi hranilne vrednosti in cenjena kot bioživilo in varna hrana (Kreft, 1995).

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA IN NAMEN DIPLOMSKE NALOGE

Pomanjkanje selena v človeški prehrani je aktualen problem, ki se ga da rešiti na več načinov. Eden izmed njih je foliarno dodajanje Se rastlinam. Z dodajanjem selena ajdi bi še dodatno oplemenitili paleto dobrih lastnosti te rastline in tako ustvarili funkcionalno živilo s povečano količino naravno prisotnega selena, s katerim bi si lahko pomagali do zadostnih količin tega pomembnega elementa v prehrani.

Namen diplomskega dela je bil ugotoviti, v kolikšni meri se s foliarnim dodajanjem Se poveča njegova vsebnost v posameznih delih ajde (stebela, listi, pedicli, zrelo zrnje, zrele luske, nezrelo zrnje in nezrele luske), ter kako se ta koncentracija spreminja glede na stopnjo dozorelosti rastline.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Predvidevali smo, da se bo koncentracija selena po foliarnem gnojenju s tem elementom povečala v vseh delih rastline. Sklepali smo, da se bo Se različno porazdelil v posamezne dele ajde, tako v kontrolni, kot v s selenom obogateni skupini rastlin, ter da ga bo največ v vegetativnih delih rastline. Predvidevali smo, da se z dozorevanjem rastline koncentracija selena v posameznih delih spreminja, in sicer da se poveča v delih, katerih masni delež se glede na celo rastlino zmanjša.

2 PREGLED OBJAV

2.1 AJDA

Ajda je dvokaličnica, ki jo uvrščamo v družino dresnovk (*Polygonaceae*), in ni žito, čeprav jo pogosto zaradi načina pridelave in uporabe uvrščamo prav med slednja. Pri nas poznamo dve vrsti ajde, in sicer navadno (*Fagopyrum esculentum* Moench) in tatarsko ajdo (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.), ki jo drugače imenujemo še zelena ali grenka ajda. Bližnji sorodniki ajde so rabarbara, kislica in številne dresni, daljna sorodnika pa amarant in špinača. Izvira iz Kitajske, natančneje iz province Yunnan, kjer je bila odkrita divje rastoča ajda, ki se od gojene razlikuje po močnem osipanju semen. Iz Yunnana se je ajda postopoma širila južno od Himalaje v Butan, Nepal, Indijo in Pakistan ter po drugi poti proti severu Kitajske in Sibiriji. Od tod se je najverjetneje prek Rusije in Ukrajine razširila v srednjo Evropo in nato naprej proti zahodni Evropi. V Sloveniji je bila prvič omenjena leta 1426, verjetno pa je k nam prišla že nekaj let prej. V Evropi pridelujejo ajdo predvsem v Rusiji, Belorusiji, Ukrajini, na Poljskem, Hrvaškem, v Sloveniji, Avstriji, na Danskem in v Franciji ter v manjši meri v nekaterih drugih državah (Kreft, 1995). V preglednici 1 so navedeni podatki o obsegu njiv, posejanih z ajdo, v preglednici 2 pa pridelek ajde v Sloveniji, sedemindvajseterici držav EU, Aziji in celotnem svetu (FAOSTAT, 2008).

Preglednica 1: Obseg njiv, posejanih z ajdo v hektarjih (FAOSTAT, 2008)

	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006
Slovenija	632	742	1 169	689	578	811	547
EU-27	101 780	107 565	93 431	95 564	122 220	145 624	159 826
Azija	1 241 785	1 178 754	950 862	933 152	1 001 834	967 010	997 406
Svet	3 466 800	3 088 700	2 051 639	2 129 836	2 510 059	2 468 396	2 743 297

Preglednica 2: Pridelek ajde v tonah (FAOSTAT, 2008)

	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006
Slovenija	683	802	1 264	560	244	1 453	497
EU-27	133 259	142 609	142 342	161 175	226 738	224 723	158 781
Azija	2 013 191	1 329 048	1 029 970	1 420 353	977 879	844 964	999 239
Svet	3 779 085	2 586 358	1 817 831	2 554 063	2 275 739	2 078 299	2 363 158

Ajda je rastlina, ki jo gojimo podobno kot žita. Sicer ne daje velikega hektarskega pridelka, vendar so potrebna sredstva za njeno pridelovanje nižja kot pri ostalih žitih, saj ne zahteva bogato pognojnih in obdelanih tal, pa tudi pred napadom bolezní in škodljivcev je vsaj do sedaj varnejša (Kreft, 1995).

V prehrani je zelo vsestransko uporabna, saj jo lahko uporabljamo kot kašo, moko ali zdrob, iz ajdove moke lahko pripravimo najrazličnejše izdelke, kot so žganci, testenine, kruh in podobno, ali pa sveže mlade dele rastline uporabljamo kot zelenjavo. Priljubljen je tudi ajdov med, ki je temne barve in ima močno aromo in oster okus, vsebuje pa veliko mineralnih snovi in snovi s protibakterijskim učinkom. Iz ajde izdelujejo tudi pivo, iz praženih ajdovih zrn in svežih delov rastlin pripravljajo čaj, na Kitajskem poznajo ajdov kis, na Japonskem ajdovo žganje, radi pa uporabljajo tudi ajdove kalčke. Pri nas pa so dobro znane tudi klobase iz ajdove kaše (Kreft in sod., 1999).

Ajdo odlikuje tudi zelo dobra hranilna vrednost. V endospermu je predvsem škrob, pomemben del le-tega je rezistenten škrob, ki pri prebavi upočasni prehod sladkorjev iz prebavil v kri, kar je ugodno predvsem za bolnike s sladkorno boleznijo. Beljakovine v ajdovih zrnih so zelo kakovostne in so po svoji aminokislinski sestavi za človeka primernejše od beljakovin pšenice, soje ali mesa. V zrnih najdemo še vlaknine in malo maščob. Ker ne vsebuje glutena, je primerna tudi za prehrano ljudi s celiakijo. Ajda je tudi bogat vir mineralov, predvsem cinka, bakra in magnezija in vitaminov B1, B2, niacina ter vitamina B6 (Bonafaccia in sod., 2003), vsebuje pa tudi druge snovi s pozitivnim učinkom na zdravje, kot so na primer rutin, kvercetin in kvercitrin (Fabjan in sod., 2003).

2.2 SELEN

2.2.1 Selen in njegove spojine v bioloških sistemih

Selen je kemijski element, ki se nahaja v VI. skupini periodnega sistema, med žveplom in telurjem in spada med metaloide, saj ima tako lastnosti kovin in nekovin. Ker sta z žveplom v isti skupini periodnega sistema, imata podobne lastnosti, vendar pa v bioloških sistemih nista zamenljiva. V naravi je prisotnih 6 naravnih izotopov selena (^{74}Se , ^{76}Se , ^{77}Se , ^{78}Se , ^{80}Se , ^{82}Se) (Brenčič in Lazarini, 1995). Selen ima v anorganskih spojinah različna oksidacijska števila: -2 (selenid), 0 (elementarni Se), +4 (SeO_3^{2-} selenit) in +6 (SeO_4^{2-} selenat), prisoten pa je tudi v večih hlapnih in nehlapnih organskih spojinah (Uden in sod., 2004; Hymer in Caruso, 2006). Še posebej pomembno mesto med temi spojinami ima enaindvajseta aminokislina selenocistein (SeCys), ki je sestavni del selenobeljakovin. V preglednici 3 so navedeni nekateri selenoproteini z znano vlogo v organizmu sesalcev.

Preglednica 3: Specifični selenoproteini z znano vlogo v organizmu sesalcev (Roy in sod., 2005)

Selenoproteini	Vloga
Družina glutathion peroksidaz (GPx)	antioksidativni encimi: odstranjujejo H ₂ O ₂ , lipidne in fosfolipidne hidroperokside
Družina jodotironin dejodinaz (D)	kontrola metabolizma hormonov žleze ščitnice
Družina tioredoksin reduktaz (TrxR)	regulacija redoks procesov v celici
Selenofosfat sintetaza	sodeluje pri biosintezi SeCys

2.2.2 Selen v tleh in njegova razpoložljivost

Od količine, porazdelitve in dostopnosti Se v tleh je odvisna količina tega elementa v rastlinah in posledično v prehranjevalni verigi. Porazdelitev selena v tleh je zelo neenakomerna in je odvisna od narave in izvora tal ter od klimatskih razmer. Tako vsebnost Se v tleh variira od manj kot 0,1 µgSe/g pa do več kot 1 mgSe/g, največkrat pa se giblje med 1,0 in 1,5 µgSe/g. Tla na magmatskih kamninah (granit...) vsebujejo malo selena, na sedimentnih kamninah (apnenec...) pa ga vsebujejo več, prav tako ga običajno veliko vsebujejo tudi tla z veliko količino organske snovi.

Obilne padavine lahko zaradi izpiranja zmanjšajo vsebnost selena v tleh, če je le-ta prisoten v topni obliki. Malo selena tudi zaradi tega dejstva vsebujejo tla v Tasmaniji, Novi Zelandiji, na Finskem, v določenih območjih Kitajske, Vzhodni Sibiriji in Koreji (Combs, 2001). Pirc in Šajn (1997) navajata vsebnosti Se v tleh v Sloveniji. Po njihovih podatkih le-ta znaša od <0,1 do 0,7 mg/kg, kar pomeni, da so tudi tla v Sloveniji revna s selenom. Nasprotno pa veliko selena vsebujejo tla določenih območij v ZDA, Kanadi, delu Azije in Avstraliji, tudi zato, ker so to območja s toplim in suhim podnebjem (Combs, 2001).

Poleg same vsebnosti selena v tleh pa je, še posebej za rastline, pomembna predvsem njegova dostopnost, ki jo pogojuje oblika, v kateri se element nahaja. Le-ta pa je odvisna od večih dejavnikov. Ti so: pH tal, zbitost tal, vsebnost organskih snovi, mikrobiološka aktivnost, fiksacijska kapaciteta tal, klimatske razmere ter prisotnost drugih elementov in spojin. Na Škotskem je zaradi kislih tal dostopnost selena slaba, zaradi tega je tudi v pšenici vsebnost selena nizka, in sicer 59 ngSe/g. V kanadski moki pa je bila njegova vsebnost bistveno večja in je znašala 511 ngSe/g (Barclay in Macpherson, 1992). Elementarni selen je dokaj stabilen in zato slabo dostopen, ob visoki vsebnosti železa pa se dostopnost Se še dodatno zmanjša zaradi vezave Se na železo. Selenid je prav tako večinoma netopen in zaradi tega slabo razpoložljiv. Selenit je glede na dostopnost

zelo pomemben, saj se zaradi mikrobiološke aktivnosti in alkalnih ter zračnih razmer spremeni v bolj topen selenat, ki je dobro dostopen rastlinam, v kislih razmerah pa se veže na delce gline ter na železove komplekse, tako da se razpoložljivost zmanjša. Tako v določenih območjih intenzivne kisle padavine, ki znižujejo pH tal in vode, zmanjšujejo razpoložljivost selena.

Na dostopnost selena vpliva tudi prisotnost žvepla, saj med njima obstaja kompetitivno razmerje zaradi fizikalno-kemijske podobnosti, še posebej, če sta prisotna v obliki sulfata in selenata. Selenat namreč tekmuje s sulfatom za vezavo na aktivna mesta permeaze, ki je odgovorna za črpanje sulfata. Selenat za vezavna mesta permeaze tekmuje tudi s kloridom, nitratom in fosfatom (Marscher, 2002). Johnsson (1991) v svoji raziskavi navaja, da dostopnost selena zmanjša tudi velika vsebnost organske snovi, saj se selen veže na organske komponente.

2.2.3 Selen in rastline

Za višje rastline ni dokazano, da bi za svojo rast nujno potrebovale selen, vendar lahko poleg esencialnih elementov v svojih tkivih kopičijo tudi druge naravno prisotne elemente, med drugimi tudi selen. Kljub temu, da esencialna vloga selena za rastline ni dokazana, bi lahko sklepali, da ima določeno biološko vlogo, saj imajo vsi organizmi, vključno z višjimi rastlinami, prisoten Se-cisteil-tRNA, ki dekodira triplet nukleotidov UGA, s katerim se selenocistein vgrajuje v proteine (Läuchli, 1993). Poleg tega novejša raziskava nakazujejo, da Se omili posledice oksidativnega stresa zaradi UV sevanja (Germ in sod., 2005) ter morda upočasnijo staranje rastlin in hitreje zmanjša transpiracijo v sušnih razmerah (Germ in sod., 2007). Hanson in sodelavci (2004) pa so s poskusom na gorjušici (*Brassica juncea*) ugotovili, da hiperakumulacija selena omogoča rastlini obrambo pred sesajočimi herbivori. Populacija zelene breskove uši (*Myzus persicae*) se je pri koncentraciji 1,5 mgSe/kg suhe mase v listih zmanjšala za 50 %, koncentracije nad 10 mgSe/kg suhe mase pa so bile letalne.

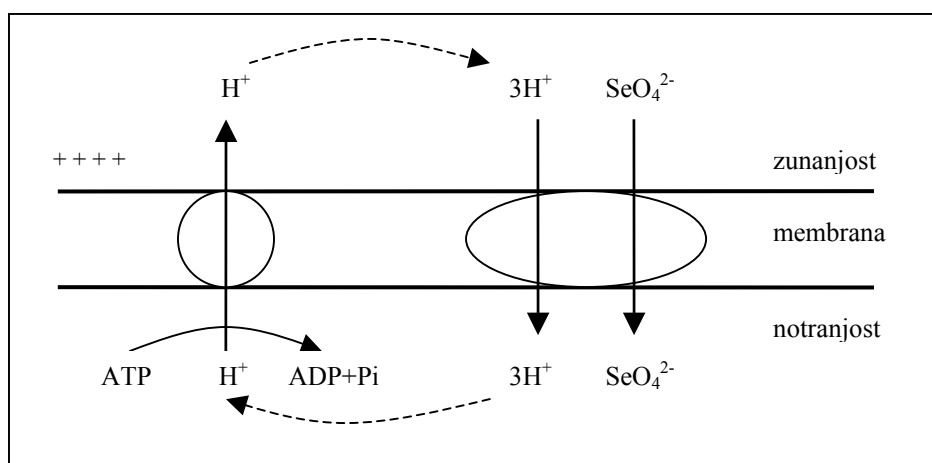
Količina akumuliranega selena je poleg vsebnosti in razpoložljivosti elementa v tleh odvisna tudi od vrste rastline. Glede na sposobnost kopičenja selena v rastlinskih tkivih tako ločimo (Ellis in Salt, 2003):

- neakumulirajoče rastline, ki vsebujejo manj kot 25 mgSe/kg suhe snovi (v tej skupini je večina rastlin)
- indikatorske rastline, ki kopičijo do 1000 mgSe/g suhe snovi (rastline iz rodu *Aster*, *Brassica juncea*)
- akumulirajoče rastline, ki kopičijo in tolerirajo do 4000 mgSe/kg suhe snovi (rastline iz rodu *Astragalus*, *Stanleya*, *Neptunia*).

Stekar in Muck (1971) sta izmerila vsebnost selena v pšenici (5-188 ngSe/g), koruzi (7-58 ngSe/g), ječmenu (11-84 ngSe/g), ovsu (37-171 ngSe/g) in v sirku (17-47 ngSe/g). Modic (1998) navaja, da znaša vsebnost selena v netretiranih vzorcih kitajskih ajd od 17 do 342 ngSe/g. Lorenz (1978) je določal vsebnost Se v mehkih in trdih pšenicah v Angliji. Mehke so vsebovale značilno manj selena (20-130 ngSe/g) kot trde (50-1090 ngSe/g). Razlika je povezana z vsebnostjo proteinov. Foster in Sumar (1995) v svojem preglednem članku navajata, da vsebnost Se v pšenici v ZDA variira od 40 do 21400 ngSe/g. Dermelj in sodelavci (1991) navajajo vsebnost Se v žitih slovenskega in nekdanjega jugoslovanskega območja, in sicer pšenica 20-100 ngSe/g, oves 30-100 ngSe/g, koruza 40-150 ngSe/g, rž 30-200 ngSe/g in ječmen 10-50 ngSe/g. Prav tako so Dermelj in sodelavci (1991) analizirali vzorce slovenske koruze, ki je vsebovala 40 ngSe/g, in ječmena, ki je vseboval 61 ngSe/g.

2.2.3.1 Privzem, prenos in razporeditev selena pri višjih rastlinah

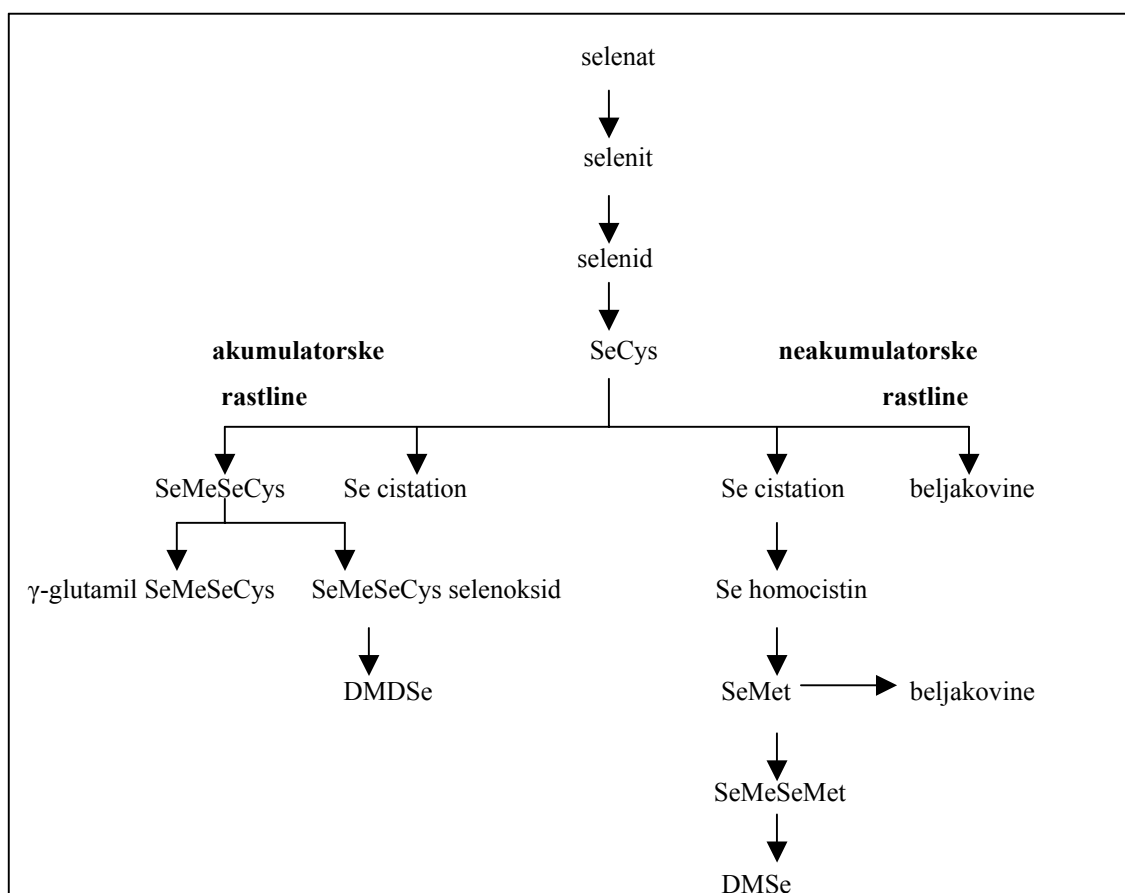
Privzem selena je odvisen predvsem od njegove oblike v tleh. Kot že prej omenjeno, poteka privzem selenata na enak način kot privzem sulfata, in sicer s sulfatnim prenašalcem preko plazemske membrane korenin, s sekundarnim aktivnim kotransportom, ki ga omogoča protonska črpalka (slika 1). Rastline lahko z aktivnim transportom privzemajo tudi SeMet, za selenit, ki ga prav tako črpajo, pa ni znano, ali so potrebni membranski prenašalci (Terry in sod., 2000). Privzem selena je odvisen tudi od temperature, tako rastline privzemajo večje količine selena pri temperaturi, ki je višja od 20 °C, kot pri temperaturi, nižji od 15 °C.



Slika 1: Privzem selenata s sekundarnim aktivnim kotransportom, ki ga omogoča protonska črpalka (prirejeno po Sors in sod., 2005)

Prenos selen od korenin v poganjke je prav tako odvisen od oblike elementa. Selenat se prenaša lažje kot selenit in SeMet, razlog za slabši prenos selenita pa je v njegovi hitri pretvorbi v organske oblike, ki ostanejo v koreninah. Razporeditev Se v različne dele rastline je odvisna tudi od vrste, razvojne faze in fiziološkega stanja le-te (Terry in sod., 2000).

Med rastno dobo rastline poteka hkrati vnos in izločanje mineralov, v odvisnosti od razvojne faze. V rastlinah poteka prerazporejanje in izločanje elementov, v obdobju senescence se povečano izločajo minerali iz listov. V obdobju kalitve se Se iz založnega tkiva razporeja v razvijajoče se korenine in poganjke, v času vegetativne rasti pa se ob nezadostni preskrbi s Se le-ta prenaša iz zrelih listov v predele nove rasti. V reproduktivni fazi se prenos Se preusmeri v semena, v listih pa se njegova količina močno zniža. Žita, ki spadajo v skupino neakumulirajočih rastlin, imajo v času zorenja približno enako količino Se v zrnih in koreninah, nekoliko nižjo pa v listih in steblih (Marscher, 2002).



Slika 2: Metabolizem Se v akumulirajočih in neakumulirajočih rastlinah (prirejeno po Terry in sod., 2000)

Zaradi podobnosti z žveplom se selen vključuje v presnovne poti tega elementa. Po privzemu Se se le-ta prenese v kloroplaste, kjer poteka nadaljnja presnova z encimi sulfatne asimilacije. Prva stopnja je redukcija selenata do selenita in nato do selenida. Le-ta se potem s pomočjo cistein sintetaze pretvori v selenocistein. Od tu naprej potekajo pretvorbe v neakumulirajočih in akumulirajočih rastlinah kot je prikazano na sliki 2 (Terry in sod., 2000).

2.2.3.2 Toksičnost Se v rastlinah in obrambni mehanizmi

Kadar so rastline med gojenjem izpostavljene previsokim koncentracijam Se, so posledice lahko vidne kot slabša rast, rdeče pike na koreninah, črne pike na listih, rumenenje in sušenje listov, zmanjšana sinteza proteinov in predčasna smrt. Glavni mehanizem, ki povzroča toksičen odziv rastlin, je genetsko nepogojena vključitev SeMet in SeCys v proteine namesto Met in Cys. Zaradi različnih lastnosti žvepla (ki je v Met in Cys) ter selena (v SeMet in SeCys), pride do sprememb v strukturi proteinov, to pa ima lahko usodne posledice za katalitično aktivnost le-teh. Mejne vrednosti toksičnosti so odvisne od starosti rastlin (mlajše rastline so občutljivejše), prisotnosti sulfatnih ionov ter od vrste rastline (Terry in sod., 2000).

Selenat in selenit sta najpogostejši toksični obliki selena za rastline, saj ju le-te absorbirajo in spreminja v organske oblike. Nekatere študije so pokazale, da je selenit bolj toksičen kot selenat, to pa pripisujejo hitrejši pretvorbi selenita v selenoaminokislino in naprej v proteine (Terry in sod., 2000).

Akumulirajoče rastline imajo več obrambnih mehanizmov, zaradi katerih lahko tolerirajo visoke koncentracije Se (Terry in sod., 2000):

- sinteza nebeljakovinskih aminokislin selenometilselenocisteina (SeMeSeCys) in selenocistationa ter dipeptida γ -glutamil-SeMeSeCys
- izključitev SeCys iz procesa vključevanja v beljakovine
- kopičenje Se v vakuolah v obliki selenata in/ali nebeljakovinskih aminokislin
- fitovolatizacija, to je odstranjevanje Se s pretvorbo v hlapne spojine, kot sta DMSe in DMDSe, prisotna je tudi pri neakumulirajočih rastlinah (te hlapne spojine odganjajo tudi rastlinojede in jih tako varujejo pred zaužitjem rastlin s previsokimi koncentracijami selena).

2.2.3.3 Rastline obogatene s selenom

V večini držav je za ljudi značilen nižji dnevni vnos selena od priporočenega. Temu se je mogoče izogniti z uporabo selenovih prehranskih dopolnil, ki narašča, v zadnjem času pa poteka tudi veliko raziskav na področju gojenja s selenom obogatenih rastlin, ki jih prištevamo v skupino funkcijskih živil. Pojem »funkcijska živila« je prvi opisal Roberfroid leta 1999, in sicer kot živila, ki so po izgledu in okusu takšna (ali zelo podobna) kot konvencionalna živila in so namenjena običajni uporabi v prehranjevanju, le da so bila spremenjena tako, da njihova fiziološka vloga presega fiziološko vlogo običajnih živil. Torej so živila, katerih pozitivni učinki na zdravje so večji od učinkov konvencionalnih živil (Spence, 2006).

Koncentracijo naravno prisotnega selena lahko povečamo z različnimi načini gojenja:

- dodajanje selena v hranilno raztopino (hidroponsko, aeroponsko gojenje, foliarno škropljenje)
- namakanje semen
- dodajanje selena v zemljo z mineralnimi gnojili
- genetske modifikacije, ki omogočajo učinkovitejšo akumulacijo Se.

Do sedaj je bilo uspešno opravljenih že veliko raziskav na rastlinah s povečano vsebnostjo naravno prisotnega selena, med drugimi na ajdi (Smrkoj in sod., 2006; Stibilj in sod., 2004), pšenici (Aro in sod., 1989; Stadlober in sod., 2001; Lyons in sod., 2005), ječmenu in rižu (Stadlober in sod., 2001), bučah (Stibilj in sod., 2004), fižolu (Smrkoj in sod., 2007), radiču (Germ in sod., 2007), brokoliju, česnu, čebuli (Irion, 1999) in drugih.

2.2.4 Pomen selena za ljudi

Selen je nujno potreben za življenje ljudi in živali. Njegova esencialna vloga je bila prvič ugotovljena leta 1957, ko so ugotovili, da dodajanje selenita preprečuje nekrozo jeter podgan, ki jim primanjkuje E vitamina (Schwarz in Foltz, 1957). Sledilo je še več odkritij bolezni, povezanih s pomanjkanjem selena pri živalih, in nato še o pomenu tega esencialnega elementa za zdravje ljudi. V zadnjem času je še posebej v ospredju zanimanje za zaščitne učinke selena v zvezi z rakom, povezani pa so s prisotnostjo selena v glutacion peroksidazah, ki ščitijo DNK in druge dele celic pred oksidativnim stresom (Letavayova in sod., 2006).

2.2.4.1 Preskrbljenost človeka s selenom

Za optimalno sintezo selenoproteinov je potrebno zaužiti zadostne količine selena. Priporočen dnevni vnos (RDA – recommended daily allowance) selena je za zdrave odrasle 55 $\mu\text{gSe/dan}$, otroci ga potrebujejo manj, nosečnice pa nekoliko več (60 $\mu\text{gSe/dan}$). Manj kot 11 $\mu\text{gSe/dan}$ na daljši rok povzroči znake pomanjkanja, 100 – 200 $\mu\text{gSe/dan}$ pa zavira razvoj raka. 400 $\mu\text{gSe/dan}$ je zgornja še varna meja, pri koncentracijah med 3200 in 5000 $\mu\text{gSe/dan}$ pa se pojavijo znaki toksičnosti (selenoze) (Reid in sod., 2004).

V večini evropskih držav je preskrbljenost s selenom nekoliko nižja od priporočene (Combs, 2001), vendar so kljub temu znaki hudega pomanjkanja redki. Povprečne vsebnosti selena v celodnevni obrokih hrane iz domov za starejše so v Sloveniji v letih 1988-1989 in 1992 znašale 40 in 30 μg (Pokorn in sod., 1998), v celodnevni obrokih hrane iz vojašnic pa 87 μg (Smrkolj in sod., 2005).

2.2.4.2 Znaki pomanjkanja

Znani sta predvsem dve bolezni, povezani s pomanjkanjem selena pri ljudeh. Prva je Keshanova bolezen ali kardiomiopatija, za katero so značilne predvsem težave s srcem, druga pa je Kashin-Beckova bolezen, ki prizadene predvsem sklepe in mišice. V večini območij, kjer sta prisotni ti bolezni, je v tleh, in s tem tudi v prehrani ljudi, zelo malo selena. Pomanjkanje selena je v močni povezavi z razvojem raka prostate, debelega črevesa, dojk, jajčnikov in pljuč. Mnoge raziskave kažejo tudi na to, da je pomanjkanje selena povezano z oslabljenim imunskim odzivom, napredovanjem nekaterih virusnih okužb (HIV v AIDS), povečano možnostjo spontanih splavov ter zmanjšano plodnostjo pri moških, senilnostjo, Alzheimerjevo boleznijo in depresijo pri starejših, motenim delovanjem hormonov ščitnice, tveganjem kardiovaskularnih obolenj, revmatoidnim artritisom, astmo in splošnim oksidativnim stresom ter nizko porodno težo otrok pri nosečnicah z nizkim statusom Se (Letavayova in sod., 2006).

2.2.4.3 Toksičnost selena

Ker je selen nujen za zdravje in ker zaužitje zadostnih količin zmanjša tveganje pojava nekaterih bolezenskih stanj, je zanimanje za njegovo uporabo vedno večje, čeprav je poznavanje Se in ostalih antioksidantov med ljudmi še vedno na dokaj nizkem nivoju (Cox in Bastiaans, 2007). Pri uporabi prehranskih dopolnil ali drugih s selenom obogatenih izdelkov je potrebna previdnost, saj je selen v previsokih odmerkih toksičen, le-ta pa ni odvisna le od količine in oblike zaužitega selena ampak tudi od starosti, fiziološkega stanja

človeka in interakcij z drugimi sestavinami hrane. Prevelike koncentracije selena povzročajo poškodbe na DNK in dodatne oksidativne poškodbe. Tipični znaki prevelikih zaužitih količin selena so zadah po česnu, morfološke spremembe nohtov in izguba las, za hudo zastrupitev pa degeneracija jeter in ledvic ter miokardialna kongestija (Letavayova in sod., 2006).

2.3 METODE MERJENJA VSEBNOSTI SELENA V RASTLINSKIH VZORCIH

Za ugotavljanje koncentracije selena v rastlinskih vzorcih in hrani je več različnih metod. Njihova skupna lastnost je, da omogočajo detekcijo nizkih koncentracij selena, saj ga rastline običajno vsebujejo malo.

2.3.1 Vzorčenje in razkroj vzorcev

Na pravilnost rezultatov ima velik vpliv pravilno vzorčenje preiskovanega materiala. Potrebno je zagotoviti reprezentativnost in homogenost vzorca, kar je velik problem predvsem pri trdnih bioloških vzorcih. Sušenje v peči do 60 °C in liofilizacija ne povzročata izgub selena, le-te pa se pojavijo pri sušenju nad 120 °C. Priprava vzorcev vključuje več faz; vzorčenje, homogenizacijo ter mletje. Ti postopki pa so lahko tudi vir kontaminacij in izgub, ki so nezaželene.

Po pripravi vzorca sledi njegov razkroj, ki je ena najbolj kritičnih faz v postopku določanja selena. Večina metod zahteva razkroj, pri katerem se razkroji organska snov, se pa pretvorimo v topno obliko v raztopini. Vzorec lahko razkrojimo v talini, z oksidantom $Mg(NO_3)_2$ in segrevanjem, popoln razkroj pa nato poteče v peči pri 520 °C, primeren je tudi sežig vzorcev v kisikovi atmosferi v Schönigerjevi buči, sežig v bombah pri zvišanem tlaku ali sežig v kisikovi plazmi.

Za ugotavljanje selena v različnih vrstah vzorcev je primeren tudi moker razkroj, pri katerem uporabljajo mineralne kisline. Njegova pomanjkljivost je to, da je primeren le za majhne zatehte vzorca, kar še dodatno otežuje zagotavljanje reprezentativnosti in homogenosti analiziranega vzorca. Vrsta kislinske mešanice je odvisna od narave analiziranega vzorca, primerni pa so predvsem reagenti z visokim oksidacijskim potencialom; dušikova kislina, mešanica dušikove in žveplove kisline ali mešanica žveplove kisline in vodikovega peroksida. Zaradi visokega deleža silicija v rastlinskih vzorcih se pri razkroju dodaja tudi fluorovodikova kislina (HF) (Pyrzynska, 1996).

2.3.2 Metode detekcije selena

Po razkroju analiziranega vzorca sledi uporaba različnih tehnik, s katerimi v raztopini izmerimo količino selena. Izbira je odvisna od koncentracije selena v vzorcu, hlapnosti elementa, prisotnosti motečih zvrsti, zahtevane natančnosti in zanesljivosti, razpoložljivosti opreme, časa in stroškov. Najpogosteje uporabljene metode so navedene v preglednici 2. Referenčna metoda je radiokemična nevtronska aktivacijska analiza (RNAA), ki pa je draga in dolgotrajna (Foster in Sumar, 1995).

Preglednica 4: Najpogosteje uporabljene metode za detekcijo selena v živilih (Foster in Sumar, 1995: 220)

Detekcijske metode	Meja zaznavnosti (ng)
Radiokemična nevtronska aktivacijska analiza (RNAA)	10-20
Atomska fluorescenčna spektroskopija (AFS) <ul style="list-style-type: none">hidridna tehnika (HG-AFS)	2-5
Atomska absorpcijska spektroskopija (AAS) <ul style="list-style-type: none">plamenska (FAAS)hidridna tehnika (HG-AAS)	500 0,02-2
Induktivno sklopljena plazma (ICP) <ul style="list-style-type: none">optična emisijska spektrometrijaatomska emisijska spektrometrija (ICP-AES)masna spektrometrija (ICP-MS)	50-100 1 0,063-1,3
Plinska kromatografija <ul style="list-style-type: none">zajetje elektronovmasna spektrometrija	0,5 pg 0,05-1
Voltometrija	0,1-5

2.3.3 Hidridna tehnika atomske fluorescenčne spektrometrije (HG-AFS)

Atomsko fluorescenčno spektrometrijo je kot novo analizno metodo prvič predstavil Wineforder leta 1964, vendar se pogosteje uporablja šele v zadnjem času, zaradi uporabe primerne separacijske tehnike, ki prej ni bila znana (hidridna tehnika). Hidridna tehnika v povezavi z AFS ima visoko občutljivost, saj hidridna tehnika vključuje ločitev analita od osnovne raztopine, to omogoči tudi boljšo mejo zaznavnosti, poveča natančnost in točnost rezultatov (Vandecasteele in Block, 1993).

2.3.3.1 Hidridna tehnika

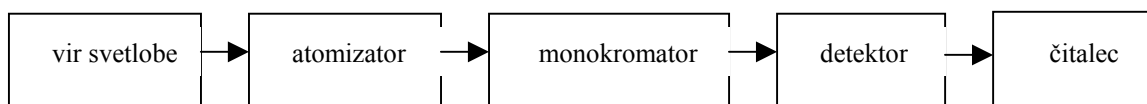
Hidridna tehnika je metoda separacije, pri kateri se selen izloči iz raztopine razkrojenega vzorca, sestavljena iz dveh procesov:

- sprostitvev hidrida iz raztopine vzorca (pretvorba analita v nakisanem vzorcu do hidrida in pretvorba v plinsko fazo)
- transport sproščenega hidrida s tokom nosilnega plina do atomizatorja (Dedina, 1995).

Le reducirana oblika selena, selenid, tvori hlapne hidride, zato je najprej potrebno selenove zvrsti pretvoriti v anorgansko obliko s HCl. Za tvorbo selenovega hidrida (H_2Se) se najpogosteje uporablja reducent natrijev tetrahidridoborat (III) ($NaBH_4$). Le-ta pri $pH \leq 1$ razpade v nekaj mikrosekundah in tako reducira Se(IV) do H_2Se . Nosilni plin, ki je inerten do hidrida, prenese H_2Se v atomizator. Ponavadi se za nosilni plin uporablja argon. Pred vstopom plina v atomizator je potrebno le-tega osušiti, za sušilni plin se uporablja dušik, zrak ali argon. Tako se zaradi ločitve analita od osnove izognemo spektralnim motnjam. Hlapne hidride tvorijo poleg selena tudi: As, Bi, Ge, Pb, Sb, Sn in Te (Dedina, 1995).

2.3.3.2 Atomska fluorescenčna spektrometrija (AFS)

AFS se uporablja za analizo okoli 25 elementov, najpogosteje pa za analizo As, Cd, Hg, Pb in Se. Pri AFS najprej poteče mehanizem atomizacije hidrida z interakcijami hidridov z vodikovimi radikali. Princip AFS je absorpcija svetlobe, ki jo prosti atomi absorbirajo iz črtastega ali kontinuiranega izvora. Pri prehodu iz vzbujenega v osnovno stanje pa fluorescirajo. Intenziteta svetlobe je proporcionalna absorbirani svetlobi in številu atomov analita. Fluorescirano svetlobo merimo z detektorjem, ki je nameščen pravokotno na smer svetlobe iz vira za vzbujanje. Detektorski sistem je običajno fotopomnoževalka. Shema AFS je na sliki 3 (Vandecasteele in Block, 1993).



Slika 3: Shema atomskega fluorescenčnega spektrometra AFS (Vandecasteele in Block, 1993). Glej tudi sliko 5.

Večina AFS meritev poteka v plamenskem atomizatorju s pretočnim vnosom vzorca. Učinkovitost atomizacije in emisija ozadja je odvisna od vrste plamena (Ar, H₂,...). Primeren izvor za vzbujanje v AFS mora biti stabilen in predstavljati dovolj intenziven izvor svetlobe, ki je značilne valovne dolžine za merjeni element. V zadnjem času najpogosteje uporabljajo žarnice z votlo katodo z dodatnim napajanjem (BHCL), za katere je značilna izredna stabilnost in intenziteta oddane svetlobe, široko območje linearnosti, večji naklon umeritvene krivulje in višje razmerje signal/šum (Vandecasteele in Block, 1993).

3 MATERIALI IN METODE

V okviru diplomske naloge smo ugotavljali celotno količino selena v različnih delih ajde (*Fagopyrum esculentum* Moench, cv. Darja) s tehniko hidridne atomske fluorescenčne spektrometrije (HG-AFS), in sicer pri kontrolni skupini rastlin ter pri skupini izpostavljeni foliarnemu dodajanju selena. Obe skupini smo gojili pri istih vremenskih razmerah ter vzorčili ob dveh različnih časih dozorelosti, in sicer septembra in oktobra.

3.1 POLJSKI POSKUS

Rastline so bile gojene na polju v Klečah, na vodovarstvenem območju na zgornji savski terasi. Posejane so bile 23.7.2005, na aluvialnih tleh na karbonatnih naplavinah. Ob začetku cvetenja, 3.9.2005, smo eno skupino posejanih rastlin poškropili z raztopino natrijevega selenata (Na_2SO_4) v koncentraciji 10 mgSe/L, drugo pa smo pustili netretirano (kontrolna skupina). Prvi del spravila obeh skupin rastlin smo opravili 65 dni (26.9.2005) po setvi, drugi del pa 79 dni (10.10.2005) po setvi. Odvzeli smo več naključnih vzorcev.

3.1.1 Vremenske razmere

Po podatkih Agencije Republike Slovenije za okolje je bilo leto 2005 po vrednostih klimatskih spremenljivk v splošnem blizu dolgoletnim povprečjem. Odkloni so bili v mejah normalne variabilnosti. Vegetacijski prag 5 °C je bil v Ljubljanski kotlini presežen 11. marca (meteorološka postaja Lj-Bežigrad), vodna bilanca tal pa je bila od zgodnjega poletja pozitivna, z največjimi presežki v osrednji Sloveniji. Avgust je bil hladnejši, manj osončen in bolj namočen kot običajno. Podobne vremenske razmere so se nadaljevale tudi septembra. Letna vsota padavin za leto 2005 je bila 1403 mm (meteorološka postaja Lj-Bežigrad), kar le za 1 % presega povprečje obdobja 1961-1990 (Agencija ..., 2005).

3.2 VZORCI

I) Kontrolna skupina:

- datum vzorčenja rastlin 26.9.2005 (z njive odvzeta dva naključna vzorca, vsak je vseboval več kot 30 rastlin)
- datum vzorčenja rastlin 10.10.2005 (z njive odvzeti trije naključni vzorci, vsak je vseboval več kot 30 rastlin).

II) Skupina izpostavljena povečanim koncentracijam selena:

- datum vzorčenja rastlin 26.9.2005 (z njive odvzet en naključen vzorec z več kot 30 rastlinami)
- datum vzorčenja rastlin 10.10.2005 (z njive odvzeti štirje naključni vzorci, vsak je vseboval več kot 30 rastlin).

Pri obeh skupinah (I, II) smo rastline po zračnem sušenju razdelili na posamezne dele, le-ti so: stebila, listi, pedicli (ostanki socvetja po odbiranju zrnja, glej sliko 4c), nezrelo zrnje (pri tej frakciji je prisotnega tudi nekaj pediclev, saj se ga v celoti ni dalo ločiti od nezrelega zrnja), nezrele luske, zrelo zrnje, zrele luske (slika 4).



Slika 4: Posamezni deli rastline ajde: **a) stebila**, **b) listi** (1cm na sliki je 2,5 cm v naravi), **c) pedicli** (1 mm na sliki je 1,5 mm v naravi), **d) zrelo zrnje** (1mm na sliki je 1,7 mm v naravi), **e) zrele luske** (1 mm na sliki je 0,5 mm v naravi)

3.2.1 Priprava vzorcev

Posamezne dele rastlin z izjemo lusk smo najprej zmleli. V ta namen smo za liste, pedicle ter zrelo in nezrelo zrnje uporabili ahatni planetarni mikro mlin (FRITSCH, Pulverisette 7), in sicer za liste hitrost 6 (5 min) in nato 7 (3 min), za pedicle hitrost 6 (5 min) in nato 7 (6 min), za zrelo zrnje 6 (10 min) in nato 7 (3 min) ter za nezrelo zrnje 6 (5 min) in nato 7 (6 min). Luske so ostale cele po mletju neoluščenega zrnja (zrelega in nezrelega), od mletega zrnja smo jih ločili s presejevanjem skozi sito. Stebla smo zmleli v kavnem mlinčku (TEFAL, Prep'line).

3.3 REAGENTI

Za celoten postopek razkroja vzorcev in pripravo raztopin smo potrebovali:

- deionizirano vodo MilliQ (Millipore),
- 65% HNO₃ (Merck, suprapur),
- 96% H₂SO₄ (Merck, suprapur),
- 30% HCl (Merck, suprapur),
- 37% HCl (Merck, p.a.),
- 30% H₂O₂ (Merck, p.a.),
- V₂O₅ (Merck, p.a.),
- 40% HF (Merck, suprapur),
- NaOH (Merck, puriss p.a.),
- NaBH₄ (Fluka, purum p.a.).

3.4 APARATURE

Uporabili smo naslednje aparature:

- peristaltično črpalko (Ismatec, MCP 380); njen pretok smo uravnavali s cevmi različnih notranjih premerov (0,78 mm, 1,02 mm, 2,06 mm) iz Tygona LFL (Ismatec),
- sušilnik plinov (Nafion dryer, Perma Pure Products),
- AFS detektor (Excalibur, PS Analytical) s selenovo žarnico z votlo katodo z dodatnim napajanjem (Super Lamp Photron), valovna dolžina 196 nm, primarni tok 20 mA, sekundarni tok 25 mA,
- drugo: analitsko tehtnico, termo blok (Termoproc), rekorder.

3.5 METODA ZA DOLOČITEV SELENA

3.5.1 Razkroj vzorcev

Vzorci smo razkrojili po postopku, ki sta ga opisali Smrkolj in Stibilj (2004). Uporabili smo 50 ml teflonske posodice, ki smo jih predhodno 24 ur namakali v raztopini detergenta (10 % Micro 90) in nato še 24 ur v raztopini $\text{HNO}_3 : \text{H}_2\text{O} = 1:1$. Sprali smo jih z deionizirano vodo MilliQ (Millipore) in jih osušili.

V tako pomite in stehtane posodice smo zatehtali 0,150 - 0,200 g vzorca. Temu smo dodali 1,5 mL konc. HNO_3 in 0,5 mL konc. H_2SO_4 ter čez noč segrevali pri temperaturi 80 °C na aluminijastem termo bloku (Termoproc) v zaprtih teflonskih posodicah. Naslednji dan smo temperaturo povišali na 130 °C in segrevali še 1 uro. Vzorce smo nato ohladili na sobno temperaturo, jim dodali 2 mL konc. H_2O_2 , ter jih segrevali v odprtih posodicah 15 min pri temperaturi 115 °C. Za tem smo dodali še 2 mL H_2O_2 in 0,1 mL 40 % HF (zrnju HF nismo dodali) ter segrevali 10 min pri 115 °C. Ohlajanju posodic na sobno temperaturo je sledilo dodajanje 0,15 mL V_2O_5 v H_2SO_4 ter segrevanje pri 115 °C do pojava modre raztopine (približno 20 min). Vzorce smo nato ponovno ohladili na sobno temperaturo ter jih reducirali z dodajanjem 2 mL konc. HCl in segrevanjem pri temperaturi 100 °C 10 min. Raztopine smo razredčili na 20 - 50 g MilliQ, odvisno od predvidene koncentracije Se v vzorcu, ter s HG-AFS določili vsebnost Se.

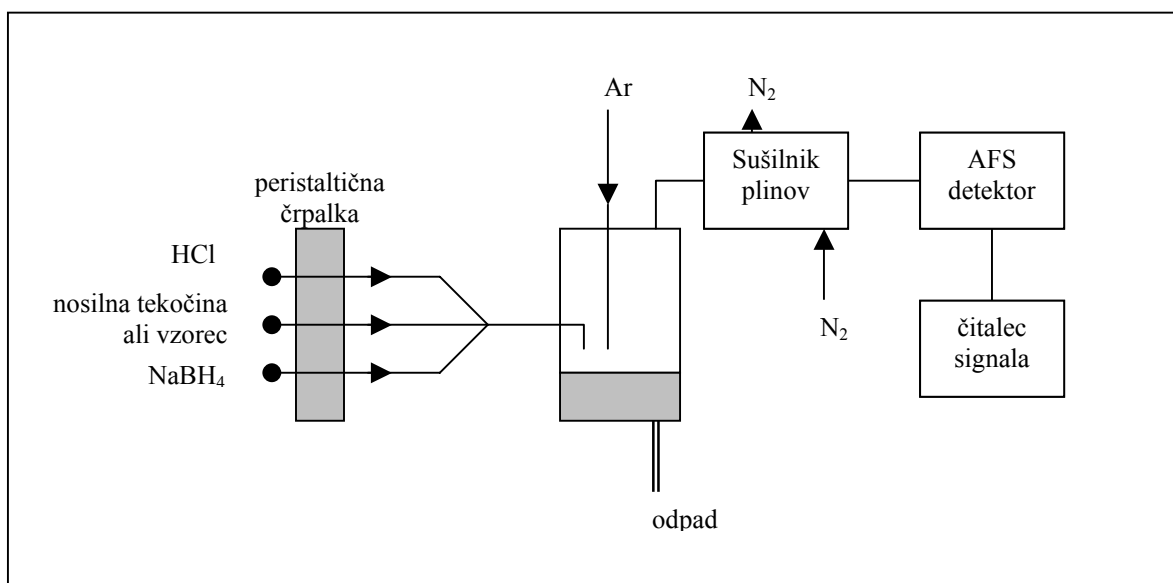
3.5.2 Standardne raztopine

Za pripravo standardov selenovih spojin smo uporabili Na_2SeO_4 (Sigma, SigmaUltra), ki smo ga raztopili v deionizirani vodi (MilliQ) in pripravili raztopino s koncentracijo 10 $\mu\text{gSe/g}$. Delovne selenove raztopine s koncentracijo 100 ngSe/g smo pripravljali tedensko, raztopine z nižjimi koncentracijami Se pa dnevno v enakem kislinem mediju, kot so bili razkrojeni vzorci.

3.5.3 Merjenje koncentracije selen

Shema pretočnega sistema HG-AFS prikazuje slika 5. Nosilna tekočina (HCl) v križnem spoju pretočnega sistema reagira s HCl za tvorbo hidrida in z reducentom (NaBH_4 in NaOH). Pretoke na peristaltični črpalki (Ismatec, MCP 380) smo uravnavali s cevkami (Tygon LFL) različnih notranjih premerov (0,76 mm; 1,02 mm; 2,06 mm). Povezavo med injektorjem in separatorjem so sestavljale cevi z notranjim premerom 0,51 mm in spojev PEEK (polieterketon). V plinsko tekočinskem separatorju (A-tip, PS Analytical) je prišlo

do ločitve teh dveh faz. Argon je odnesel nastala plina H_2Se in H_2 skozi sušilec plinov (Perma Pure Products), kjer je kot sušilni plin uporabljen dušik, v atomski fluorescenčni spektrometer (Excalibur, PS Analytical). H_2Se v difuzijskem plamenu atomizira, nastali Se atomi pa absorbirajo svetlobo s selenove žarnice z votlo katodo in nato fluorescirajo. Rekorder zabeleži dobljene signale, ki jim nato izmerimo višino in jo primerjamo z višinami signalov standardnih raztopin Se (IV). Optimalne razmere za merjenje so navedene v preglednici 5.



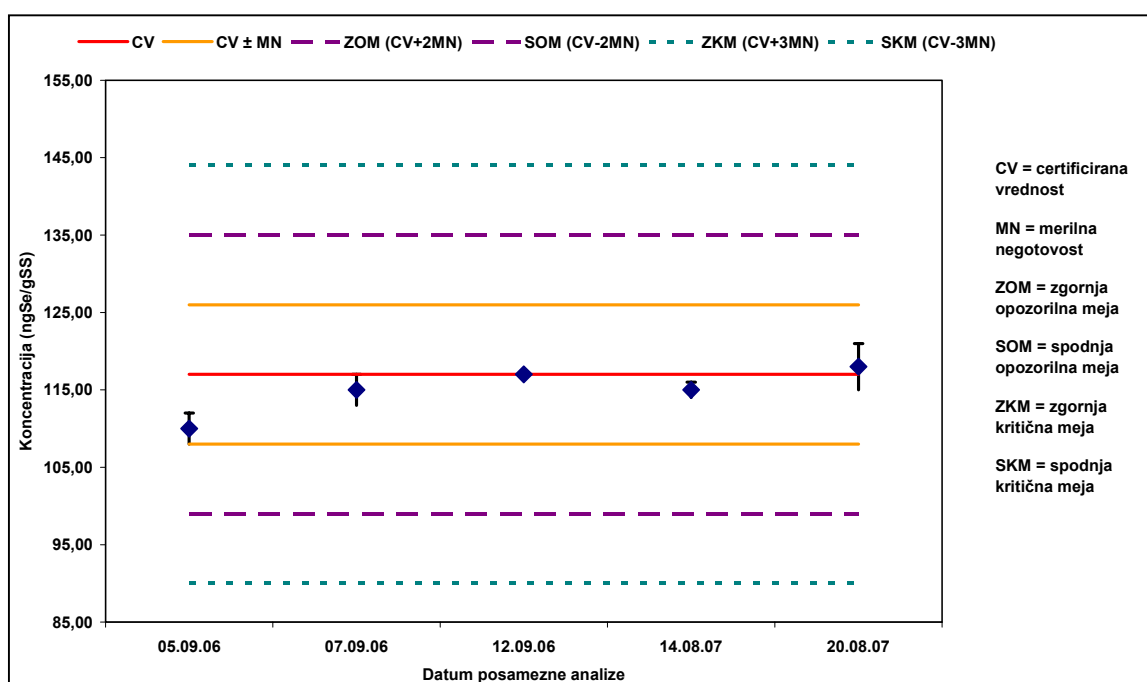
Slika 5: Shema pretočnega sistema HG-AFS

Preglednica 5: Optimalne razmere za merjenje

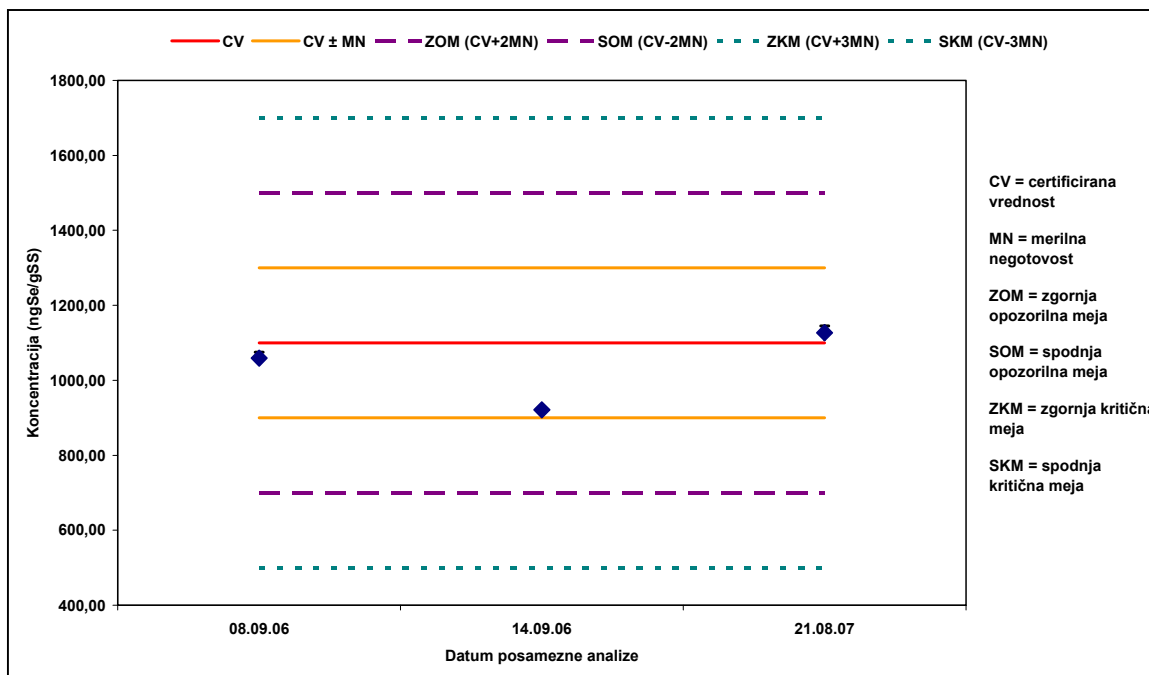
PARAMETER	OBMOČJE
Nosilna tekočina	2 mol/L HCl
Pretok nosilne tekočine	1 mL/min
Reducent	1,2 % $NaBH_4$ v 0,1 % M NaOH
Pretok reducenta	3 mL/min
HCl za tvorbo hidrida	2 mol/L
Pretok HCl za tvorbo hidrida	8 mL/min
Nosilni plin	argon (Ar)
Pretok nosilnega plina	260 mL/min
Sušilni plin	dušik (N_2)
Pretok sušilnega plina	3 mL/min
Votla katoda	$\lambda = 196$ nm, primarni tok 20 mA, sekundarni tok 25 nm

3.5.4 Pravilnost in ponovljivost metode

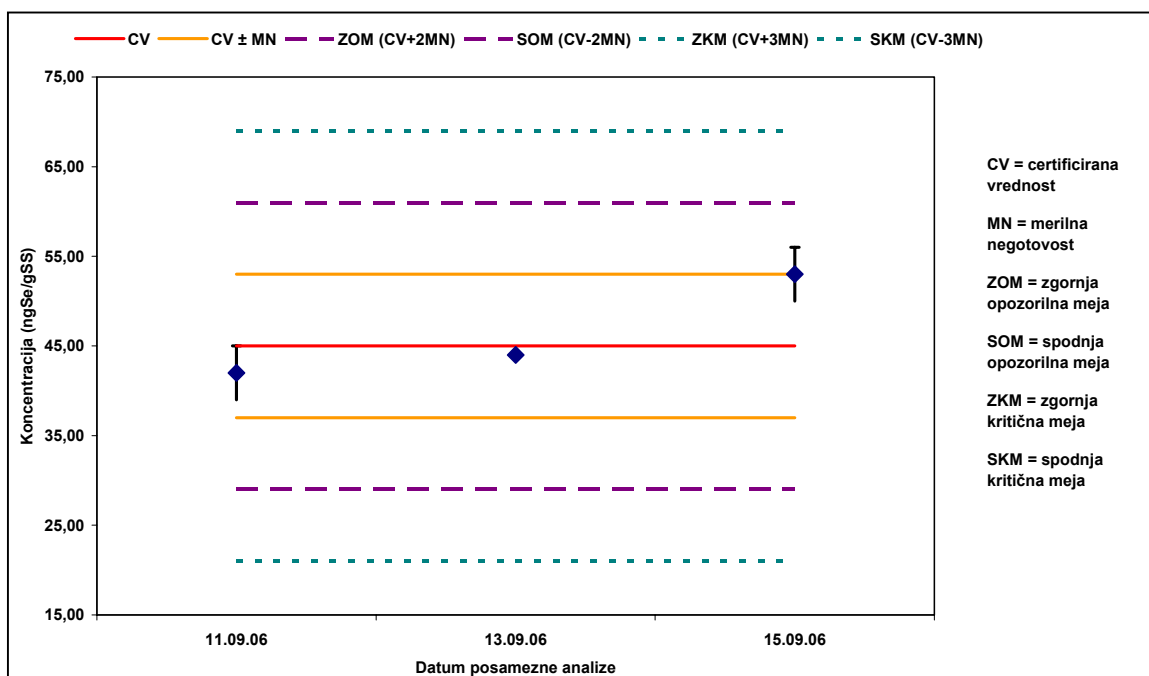
Pravilnost in zanesljivost metode za merjenje koncentracij Se v rastlinah smo preverili z merjenjem koncentracije Se v certificiranem referenčnem materialu, ki je bil po svojih značilnostih podoben posameznim vzorcem ajde, in smo ga vključili v analizo vsake serije vzorcev v dveh paralelkah. Razkroj tega materiala je potekal enako kot razkroj vzorcev ajde in tudi vsi nadaljnji postopki so bili enaki. Uporabili smo certificirana referenčna vzorca: CRM Spinach Leaves (NIST 1570a) in CRM Wheat Flour (NIST 1567a) ter referenčni vzorec: RM Corn Bran (NIST 8433). Dobljeni rezultati, ki smo jih podali kot povprečje \pm absolutna napaka, se ujemajo s certificiranimi vrednostmi. Rezultati so prikazani na slikah 6, 7 in 8.



Slika 6: Kontrolna karta merjenja koncentracije selena v certificiranem referenčnem materialu špinačni listi (Spinach Leaves, NIST 1570a: 117 ± 9 ngSe/gSS). Rezultati so podani kot povprečje \pm absolutna napaka.



Slika 7: Kontrolna karta merjenja koncentracije selena v certificiranem referenčnem materialu pšenična moka (Wheat Flour, NIST 1567a: 1100 ± 200 ngSe/gSS). Rezultati so podani kot povprečje \pm absolutna napaka.



Slika 8: Kontrolna karta merjenja koncentracije selena v referenčnem materialu koruzni otrobi (Corn Bran, NIST 8433: 45 ± 8 ngSe/gSS). Rezultati so podani kot povprečje \pm absolutna napaka.

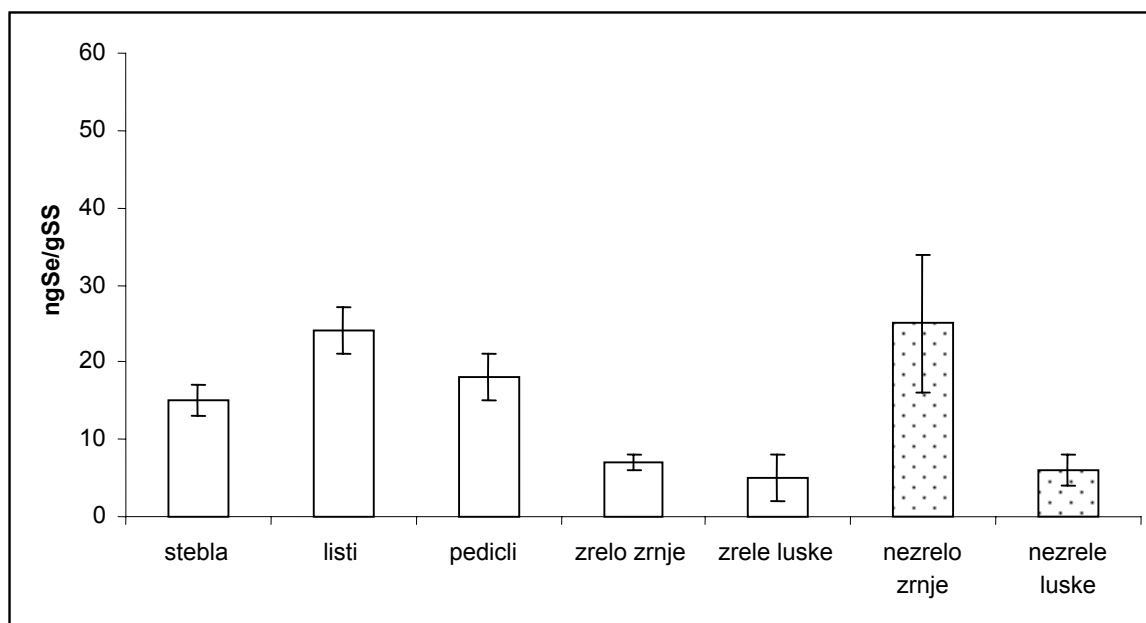
4 REZULTATI

V preglednici 6 in na sliki 8 so prikazani rezultati meritev koncentracij Se v posameznih delih ajde, ki ji nismo dodajali selena, in smo jo vzorčili 65 dni po setvi. Z njive sta bila odvezta dva naključna vzorca, ki smo ju analizirali v najmanj dveh paralelkah. Vidimo, da je bilo največ selena v zelenih delih, steblih in listih, pediclih ter v nezrelem zrnju.

Preglednica 6: Koncentracija Se (ng/g suhe snovi) v posameznih delih ajde iz kontrolne skupine, vzorčene 26.9.2005

	N*	n*	POVPREČJE (ngSe/gSS)	± STDEV
Stebila	2	4	15	2
Listi	2	4	24	3
Pedicli	2	4	18	3
Zrelo zrnje	2	4	7	1
Zrele luske	2	6	5	3
Nezrelo zrnje	2	4	25	9
Nezrele luske	2	8	6	2

* N – število vzorcev, n – število meritev; vsak vzorec je bil analiziran najmanj v dveh paralelkah



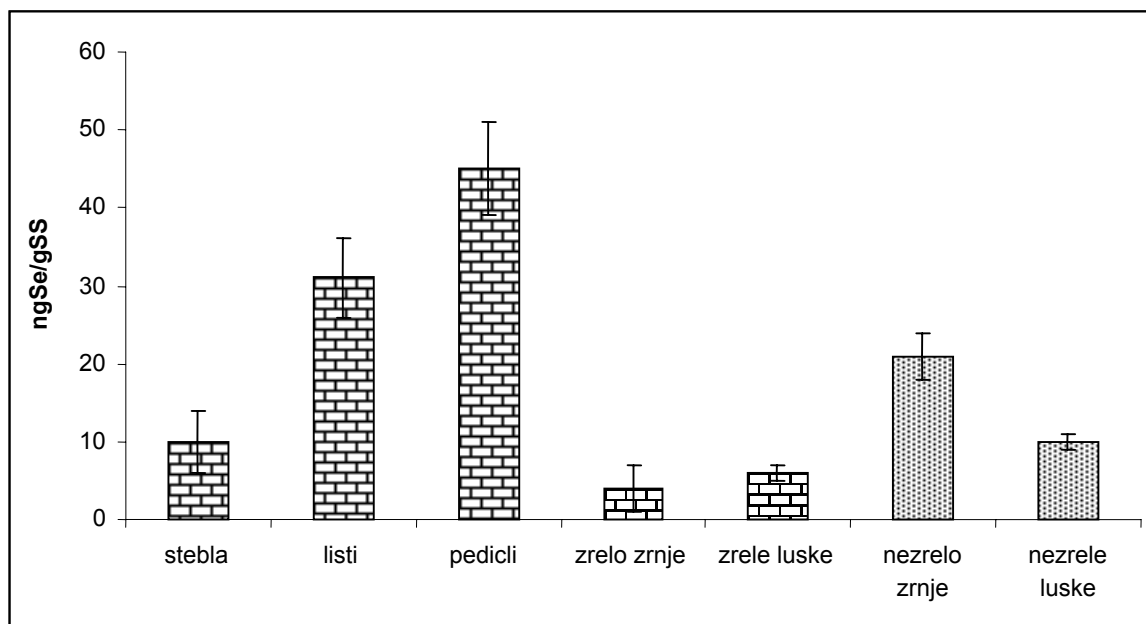
Slika 9: Koncentracija Se (ng/g suhe snovi) v posameznih delih ajde iz kontrolne skupine, vzorčene 26.9.2005.

Rezultati meritev koncentracije selena v posameznih delih kontrolne skupine ajde, vzorčene 79 dni po setvi, so prikazani v preglednici 7 in na sliki 9. Z njive so bili odvzeti trije naključni vzorci, pri katerih smo naredili večje število meritev vsebnosti Se. Največ selena je bilo tudi tukaj v listih in pediclih ter nezrelem zrnju.

Preglednica 7: Koncentracija Se (ng/g suhe snovi) v posameznih delih ajde iz kontrolne skupine, vzorčene 10.10.2005

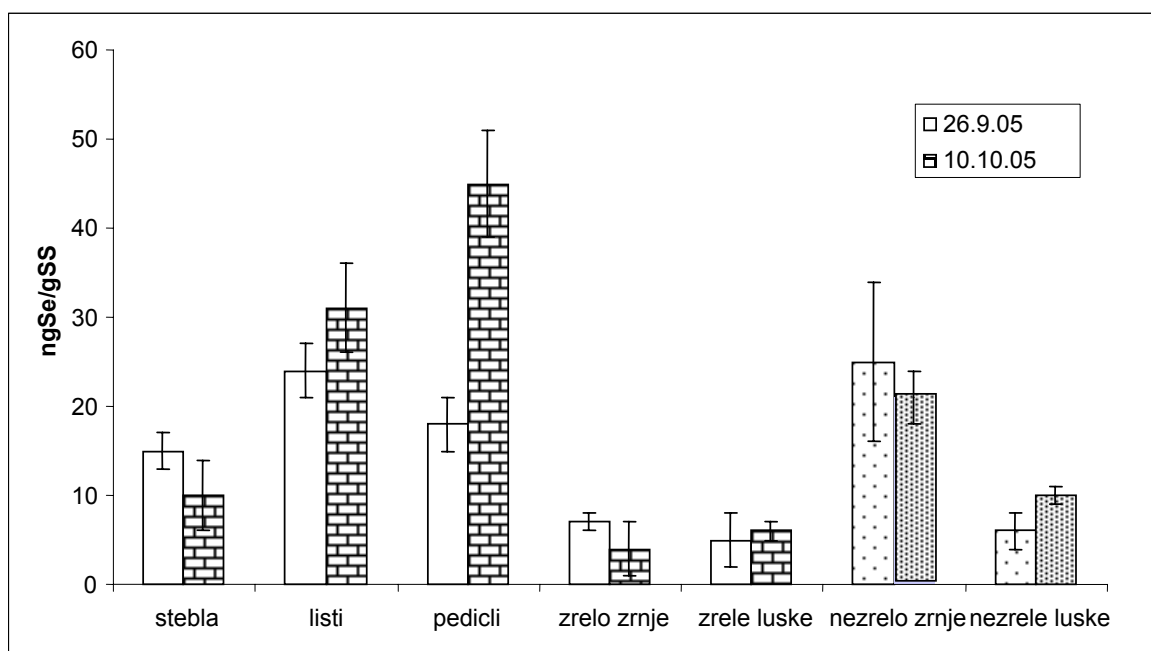
	N*	n*	POVPREČJE (ngSe/gSS)	± STDEV
Stebila	3	8	10	4
Listi	3	8	31	5
Pedikli	3	6	45	6
Zrelo zrnje	3	6	4	3
Zrele luske	3	8	6	1
Nezrelo zrnje	3	6	21	3
Nezrele luske	3	8	10	1

* N – število vzorcev, n – število meritev; vsak vzorec je bil analiziran najmanj v dveh paralelkah



Slika 10: Koncentracija Se (ng/g suhe snovi) v posameznih delih ajde iz kontrolne skupine, vzorčene 10.10.2005.

Na sliki 10 je prikazana primerjava vsebnosti Se med septembrsko in oktobrsko skupino rastlin, ki so črpale le v zemlji naravno prisoten Se. Najmanj selena je v zrelem zrnju in zrelih ter nezrelih luskah, njegova koncentracija pa narašča od stebel do listov in pediclov. Razlog za takšno porazdelitev je lahko v tem, da ko rastlina črpa selen iz zemlje, se le-ta razporeja najprej v dele, ki se razvijejo najprej in se z nadaljnjim razvojem nalaga tudi v kasneje razvite rastlinske dele. Med skupino rastlin, ki smo jih pobrali septembra, in tisto, ki smo jih pobrali oktobra, v koncentraciji selena v posameznih delih ni bilo večjih razlik. Nekoliko višja je le koncentracija selena v pediclih vzorčenih oktobra. Razlaga za to razliko bi lahko bila zmanjšana masa pediclov v primerjavi z razvitim zrnjem in s tem porazdelitev podobne količine Se kot prej v manjši količini rastlinskega materiala, kar pomeni večjo koncentracijo.



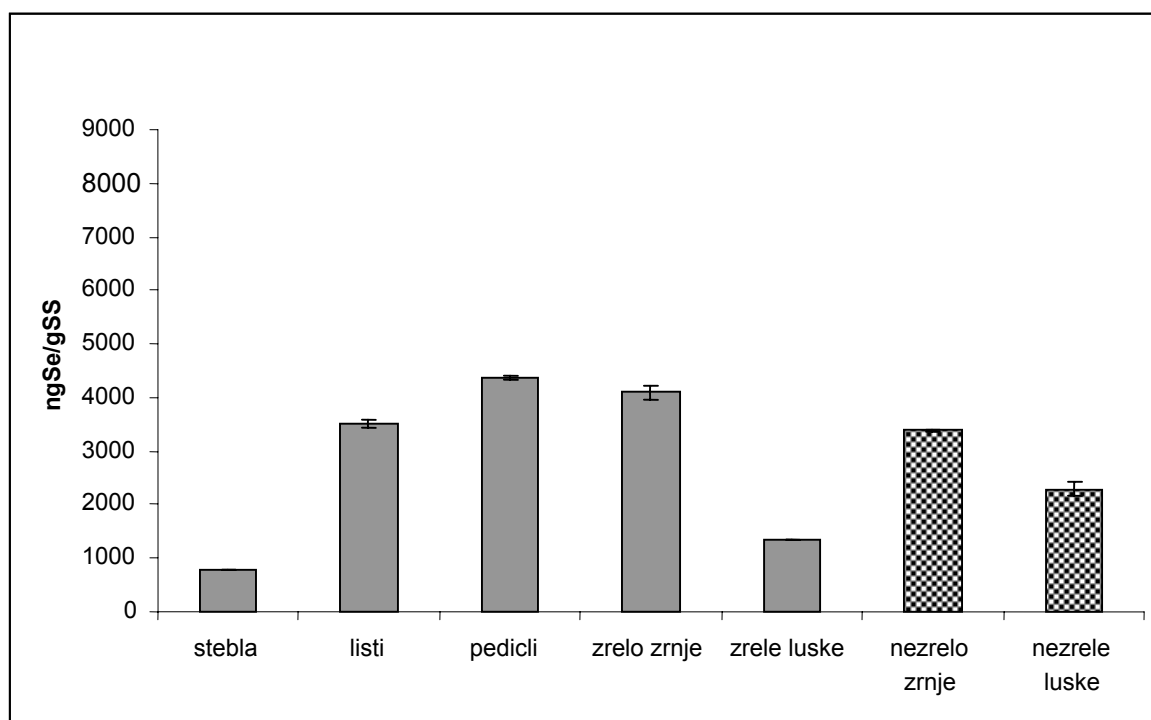
Slika 11: Koncentracija Se (ng/gSS) v posameznih delih ajde iz kontrolne skupine, vzorčene 26.9.2005 in 10.10.2005.

Pri rastlinah, ki smo jim ob začetku cvetenja foliarno dodajali natrijev selenat (10 mgSe/L), smo najprej opazili veliko povečanje koncentracije le-tega v primerjavi s kontrolno skupino. Zanimivo pa je, da je porazdelitev Se po posameznih delih primerljiva s porazdelitvijo v kontrolni skupini. Največ selena je bilo v listih in pediclih ter nezrelih zrnih. Rezultati meritev koncentracije Se po foliarnem dodajanju so v preglednici 8 in na sliki 11 (za rastline vzorčene 26.9.05) in preglednici 9 in sliki 12 (za rastline vzorčene 10.10.05).

Preglednica 8: Koncentracija Se (ng/g suhe snovi) v posameznih delih ajde, obogatene s selenom, vzorčene 26.9.2005

	N*	n*	POVPREČJE (ngSe/gSS)	± ABSOLUTNA NAPAKA
Stebila	1	2	796	3
Listi	1	2	3520	80
Pedicli	1	2	4357	34
Zrelo zrnje	1	4	4067	12
Zrele luske	1	2	1340	13
Nezrelo zrnje	1	2	3380	23
Nezrele luske	1	2	2295	135

* N – število vzorcev, n – število meritev; vsak vzorec je bil analiziran najmanj v dveh paralelkah



Slika 12: Koncentracija Se (ng/g suhe snovi) v posameznih delih ajde, obogatene s selenom,

vzorčene 26.9.2005.

Preglednica 9: Koncentracija Se (ng/g suhe snovi) v posameznih delih ajde, obogatene s selenom,
 vzorčene 10.10.2005

	Vzorci	Vrednosti meritev (ngSe/gSS)	Povp*	Stdev/a*	N*	n*	POVP*	STDEV*
Stebila	A	845, 793, 802, 781	805	28	4	10	993	477
	B	433, 419	426	10				
	C	1150, 1174	1162	17				
	D	1796, 1739	1768	40				
Listi	A	1691, 1811, 1658, 1588	1687	93	4	14	2078	665
	B	1426, 1411, 1418, 1402	1414	10				
	C	2574, 2542, 2651, 2688	2614	67				
	D	3255, 2973	3114	199				
Pedikli	A	5149, 5243	5196	66	4	8	5634	2529
	B	3132, 3147	3140	11				
	C	4710, 4664	4687	33				
	D	9403, 9627	9515	158				
Zrelo zrnje	A	3205, 3137, 2956, 2947	3061	130	4	12	3544	1053
	B	1999, 2011	2005	8				
	C	3504, 3508	3506	3				
	D	4840, 4779, 4842, 4802	4816	31				
Zrele luske	A	1467, 1510	1489	30	4	8	1717	456
	B	1135, 1153	1144	13				
	C	2141, 2150	2146	6				
	D	2243, 1936	2090	217				
Nezrelo zrnje	A	4109, 4059	4084	35	4	8	4773	3014
	B	2261, 2240	2251	15				
	C	3245, 3217	3231	20				
	D	9527, 9524	9526	2				
Nezrele luske	A	2268, 2278	2273	7	4	8	2584	1092
	B	1267, 1324	1296	40				
	C	2659, 2621	2640	27				
	D	3962, 4293	4128	234				

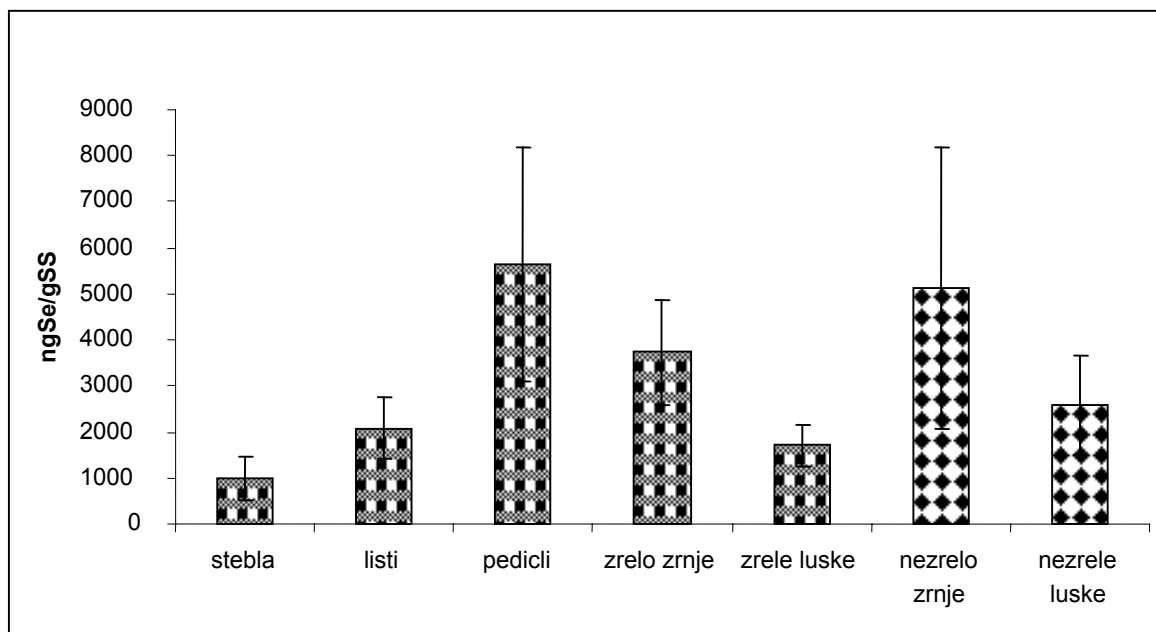
* N – število vzorcev, n – število meritev; vsak vzorec je bil analiziran najmanj v dveh paralelkah

povp – povprečje

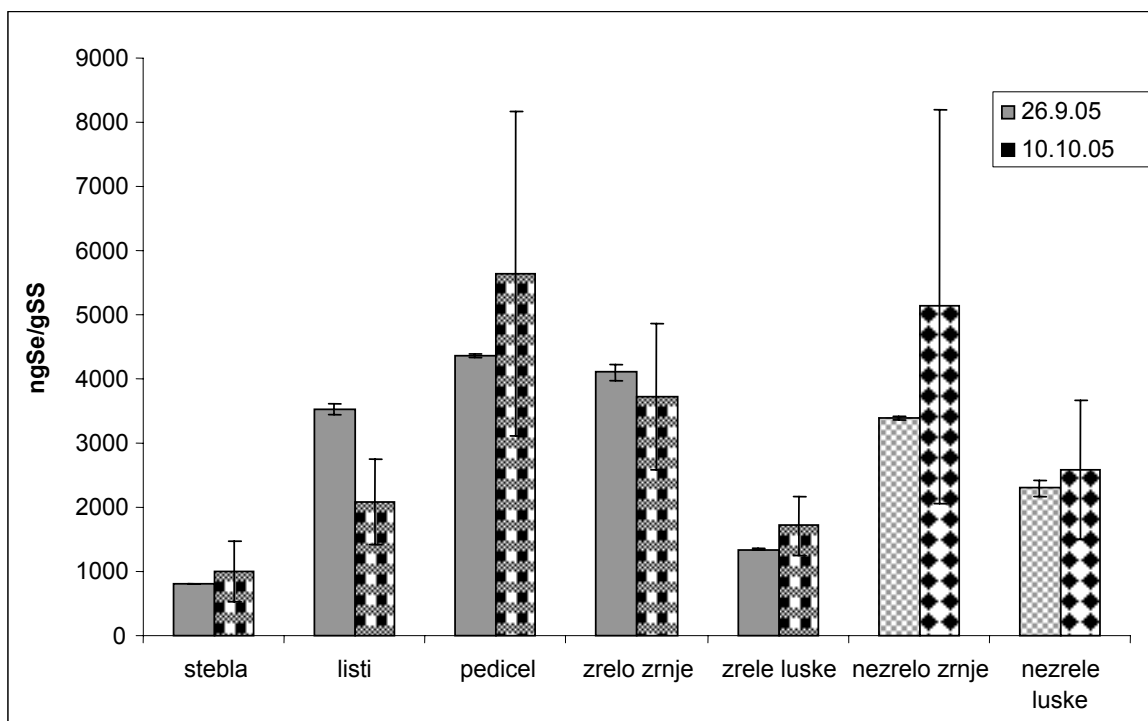
stdev/a – standardni odmik (št. določitev > 2) / absolutna napaka (št. določitev ≤ 2)

POVP – povprečje

STDEV – standardni odmik



Slika 13: Koncentracija Se (ng/g suhe snovi) v posameznih delih ajde, obogatene s selenom, vzorčene 10.10.2005.



Slika 14: Koncentracija Se (ng/gSS) v posameznih delih ajde, obogatene s selenom, vzorčene

26.9.2005 in 10.10.2005.

Opazna razlika v porazdelitvi je bila le pri vsebnosti Se v zrelem zrnju. V kontrolni skupini je bila le-ta veliko nižja od pediclev in listov, pri skupini rastlin, ki smo jim dodali selen, pa je bila koncentracija primerljiva s koncentracijo v listih in pediclih (slika 13). V steblih in listih se je koncentracija Se po tretiranju, glede na kontrolno skupino, povečala za 50 krat, v zrelem zrnju pa kar za 500 krat. Opazimo tudi, da se koncentracija Se v skupini rastlin, ki smo jih pobrali oktobra, poveča pri steblih, pediclih, luskah in nezrelem zrnju.

Na slikah 10 in 13 vidimo, da je odstopanje rezultatov od povprečja mnogo večje pri rastlinah, obogatenih s selenom, kot pri kontrolni skupini. Na sliki 13 pa je dobro opazna večja variabilnost v skupini rastlin, ki smo jih pobrali oktobra, v primerjav s septembra pobrano skupino rastlin. Vzroke za večjo variabilnost najdemo v različnem številu odvzetih vzorcev s poskusnega polja. Pri septembra pobranih rastlinah je bil namreč odvzet le en naključni vzorec, medtem ko smo pri oktobra pobranih rastlinah odvzeli štiri naključne vzorce, variabilnost lahko zato pripišemo neenakomernemu nanosu selena, različni rasti rastlin ter neenakostim v tleh. Iz preglednice 9 je razvidno, da so bile določitve posameznega vzorca dobro ponovljive, povprečja med posameznimi naključnimi vzorci pa so odstopala tudi za 30 – 50 %, najbolj je odstopal vzorec D.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

S foliarnim dodajanjem selena v obliki natrijevega selenata v koncentraciji 10 mgSe/L v času cvetenja, se je koncentracija Se v ajdi povečala, in sicer v največji meri v zrnju. S 6 ngSe/g v zrnju kontrolne skupine se je koncentracija v rastlinah, ki smo jim dodali selen, poveča na 3500 ngSe/g, to je za 500 – krat. V ostalih delih rastline se je koncentracija povečala za 50 – krat. Večji privzem selena v zrnje, kot v ostale dele rastline, bi lahko pripisali fiziološki vlogi, ki jo ima plod v rastlini, in sicer se v plodu kopičijo snovi (če so prisotne v zadostnih količinah), ki so potrebne za razvoj nove rastline, prav tako pa tudi snovi, ki jih je v rastlini preveč in jih rastlina na tak način izloča iz svojih tkiv. Vsebnost selena v ajdi se glede na čas vzorčenja rastlin ni pomembno razlikovala.

Tudi Stibilj in sod. (2004) so ajdi foliarno dodajali natrijev selenat v koncentraciji 1 mgSe/L v času cvetenja rastlin. Navajajo, da je bila razlika med vsebnostjo selena v kontrolni in izpostavljeni skupini največja v zrnju ajde, in sicer 47 ngSe/g vzorca v kontrolni skupini ter 394 ngSe/g v izpostavljeni skupini (8,5 – kratno povečanje). Smrkolj in sod. (2006) so izmerili vsebnost selena v ajdi, foliarno tretirani z raztopino natrijevega selenata v koncentraciji 15 mgSe/L v času cvetenja; le-ta je znašala 2700-4650 ngSe/g, v kontrolni skupini pa manj kot 200 ngSe/g, v listju netretirane ajde je bilo 57 ngSe/g, v listih tretirane ajde pa 4650 ngSe/g. V našem poskusu smo v listju kontrolne skupine izmerili 28 ngSe/g, v poskusni skupini pa 2800 ngSe/g.

Če primerjamo koncentracije selena v posameznih delih rastlin, pobranih oktobra in septembra, opazimo, da je koncentracija Se v oktobra pobranih pediclih, nezrelem zrnju, steblih in luskah večja v primerjavi s tistimi, pobranimi septembra. Koncentracija v listih in zrelem zrnju pa manjša. To lahko pojasnimo s spremenjenim deležem posameznih delov rastline glede na celo rastlino. Z dozorevanjem se povečuje masa zrnja, zato masa stebel, pediclev, lusk in nezrelega zrnja predstavlja manjši delež celotne rastline. Če pa se masa zmanjša, se koncentracija pri isti količini selena poveča. Podobno zaradi naraščajoče mase zrnja opazimo zmanjšanje koncentracije Se v oktobrskem zrelem zrnju za 15 % glede na septembrsko zrnje.

Rezultati kažejo, da se koncentracija Se povečuje od stebel preko listov in do pediclev, kjer je najvišja. To bi lahko pojasnili s smerjo prenosa elementa proti zrnju, kjer pa je njegova koncentracija nižja, saj se selen vključuje predvsem v beljakovine, v zrelem zrnju pa prevladuje škrob.

Razlike med povprečji vzorcev foliarno gnojnih rastlin nakazujejo, da nanos selena ni bil enakomeren. Na te razlike bi sicer lahko vplivale tudi neenakosti v tleh, a bi se potem razlikovala tudi povprečja v kontrolni skupini rastlin. Ker v le-tej večjih odstopanj nismo opazili, lahko sklepamo, da je imelo večji vpliv na variabilnost foliarno gnojenje. Ker pa smo v kontrolni skupini imeli manj vzorcev in smo lahko vpliv neenakosti v tleh spregledali, bi lahko to sklepanje potrdili le z večjim številom vzorcev v kontrolni in tretirani skupini rastlin.

Koncentracija selena v kontrolni skupini so bile nizke, in sicer od 5 do 45 ngSe/g suhe snovi glede na posamezne dele rastline. Iz tega lahko sklepamo, da tla niso vsebovala veliko selena, ali pa da so s svojimi lastnostmi (pH, zbitost, vrsta tal) omejila privzem Se v rastlino. Da bi ugotovili, kaj od naštetega je imelo večji vpliv, bi morali izmeriti koncentracijo Se v tleh, na katerih smo gojili rastline, prav tako pa bi morali izmeriti pH, določiti vrsto tal in njihovo zbitost ter upoštevati vplive teh dejavnikov na dostopnost selena rastlini.

Če bi samo z zrnjem ajde iz našega poskusa želeli zadostiti dnevni potrebi po selenu (55 µgSe/dan), bi morali zaužiti približno 15 g zrnja ajde s koncentracijo 3500 ngSe/g (foliarno dodajanje natrijevega selenata, 10 mgSe/L, v času cvetenja). Za uporabo v prehranske namene bi bilo potrebno kontrolirano foliarno gnojenje, poznavanje lastnosti tal ter spremljanje koncentracije Se v zrnju ajde in v prehrani, da se ne bi prekomerno povečal dnevni vnos selena.

Tudi listi ajde bi lahko postali uporabno funkcijsko živilo, vendar potrošniki pri nas še niso navajeni na njihovo uporabo v prehrani. V nekaterih delih sveta uporabljajo ajdove liste za čaj ali pa mlade kot zelenjavo.

5.2 SKLEPI

Z rezultati eksperimenta smo potrdili hipotezo, da bo foliarno dodajanje selena povečalo koncentracijo tega elementa v rastlini, prav tako smo ugotovili, da 14 dnevna razlika med vzorčenji ni imela pomembnega vpliva na količino selena v posameznih delih rastline. Opazili smo tudi trend porazdelitve selena po posameznih delih rastline, ki se med kontrolno in tretirano skupino rastlin ni bistveno razlikoval, iz česar lahko sklepamo na naravno značilnost porazdelitve tega elementa v rastlini ajde, in da koncentracija Se, ki smo jo uporabili pri foliarnem gnojenju, ni povzročila fizioloških motenj.

Izsledki raziskave so uporabni predvsem pri morebitni pridelavi s selenom obogatene ajde. Foliarno dodajanje selena je smiselno, saj je postopek enostaven, cenovno dostopen in ob pravilnem ravnanju ne predstavlja obremenitve za okolje, posebno pozornost pa je potrebno nameniti zagotavljanju enakomernega nanosa. Gojenje ajde ne zahteva visokih denarnih vlaganj, rastlina pa je široko uporabna v prehrani. Prav tako je ajda vedno bolj priljubljena pri potrošnikih kot zdravo in polnovredno živilo. S foliarno aplikacijo selena bi iz običajne ajde dobili cenovno ugoden izdelek z dodano vrednostjo in z njim na enostaven način zadostili dnevnim potrebam po Se.

Ker je dostopnost selena človeškemu organizmu odvisna od oblike, v kateri se element nahaja, in ne le od celotne vsebnosti, je potrebno ugotoviti, v kakšni obliki se nahaja selen v obravnavanih vzorcih. V nadaljnjih raziskavah, ki niso predmet diplomskega dela, smo ugotovili, da se ~70 % selena nahaja v obliki selenometionina (SeMet). To je tudi najbolj pogosto zastopana spojina v rastlinah, obogatenih s selenom.

6 POVZETEK

Selen je v majhnih količinah nujno potreben za pravilno delovanje človeškega organizma. Ker ga na določenih območjih primanjkuje, ga je potrebno v hrani dodajati. Foliarna aplikacija selena na rastline bi bila ustrezen postopek, s katerim bi lahko na enostaven in naraven način s hrano izboljšali preskrbljenost ljudi s tem pomembnim elementom. Pri tem je potrebno zagotoviti enakomeren nanos Se in spremljati koncentracijo le-tega v rastlini.

Ajda je tradicionalna rastlina, ki z večjo ozaveščenostjo potrošnikov o zdravi prehrani postaja vedno bolj priljubljena. Ima zelo dobro hranilno vrednost in vsebuje veliko pomembnih mineralov. Z dodajanjem selena ajdi bi še razširili nabor dobrih lastnosti te rastline in vplivali na boljše zdravje uporabnikov.

V poskusu smo imeli štiri skupine rastlin, in sicer kontrolno skupino, vzorčeno 26.9.2005 in 10.10.2005, ter s selenom obogateno skupino, vzorčeno 26.9.2005 in 10.10.2005. Selen smo dodajali s foliarnim gnojenjem v obliki natrijevega selenata, v koncentraciji 10 mgSe/L, v času cvetenja ajde. Želeli smo ugotoviti, kako se selen porazdeli po posameznih delih rastline ajde, kako se s foliarno aplikacijo selena poveča njegova vsebnost v posameznih delih rastline, in ali dolžina rastne dobe vpliva na porazdelitev Se po posameznih delih ajde.

Rezultati so pokazali, da se selen značilno porazdeli po posameznih delih ajde, in sicer je naravno prisotnega Se največ v listih, pediclih ter nezrelem zrnju. Zelo podoben trend porazdelitve opazimo tudi pri rastlinah, obogatenih s selenom, le pri zrelem zrnju opazimo razliko, in sicer je vsebnost Se v zrelem zrnju, obogatenem s selenom, primerljiva s količino elementa v pediclih, v kontrolni skupini pa je le-ta mnogo nižja. Ugotovili smo, da se z dodajanjem selena poveča njegova vsebnost v vseh delih rastline, še najbolj pa v zrnju. Dolžina dveh različno dolgih rastnih dob ima zelo majhen vpliv na porazdelitev Se v posameznih delih rastline. V delih rastline, katerih masni delež se z razvojem povečuje (zrnje, listi), se koncentracija selena zmanjša, in obratno. V delih, katerih masni delež se z razvojem zmanjšuje (pedicli, nezrelo zrnje, luske, stebła), koncentracija Se narašča.

7 LITERATURA

- Agencija Republike Slovenije za okolje. 2005. Meteorološki letopis 2005.
[http://www.arso.gov.si/vreme/podnebje/...](http://www.arso.gov.si/vreme/podnebje/) (24. 8. 2007)
- Aro A., Alfthan G., Varo P. 1989. Se supplementation of fertilisers has increased the Se intake and serum-Se concentrations of Finnish people. V: Selenium in biology and medicine. Wendel A. (ed.). Berlin, Springer Verlag: 263-269.
- Barclay M.N.I., Macpherson A. 1992. Selenium content of wheat for bread making in Scotland and the relationship between glutathione peroxidase levels in whole blood and bread consumption. *British Journal of Nutrition*, 68: 261-270
- Bonafaccia G., Gambelli L., Fabjan N., Kreft I. 2003. Trace elements in flour and bran from common and tartary buckwheat. *Food Chemistry*, 83: 1-5
- Brenčič J., Lazarini F. 1995. Splošna in anorganska kemija. Ljubljana, DZS: 220 str.
- Combs Jr. G.F. 2001. Selenium in global food System. *British Journal of Nutrition*, 85: 517-547
- Cox D.N., Bastiaans K. 2007. Understanding Australian consumers' perceptions of selenium and motivations to consume selenium enriched foods. *Food Quality and Preference*, 18: 66-76
- Dedina J. 1995. Hydride generation atomic absorption spectrometry. Chichester, New York, Brisbane, John Wiley & Sons: 526 str.
- Dermelj M., Stibilj V., Stekar J., Byrne A.R. 1991. Simultaneous determination of iodine and selenium in biological samples by radiochemical neutron activation analysis. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 341: 258-261
- Ellis D.R., Salt D.E. 2003. Plants, selenium and human health. *Current Opinion in Plant Biology*, 6: 273-279
- Fabjan N., Rode J., Košir I.J., Wang Z., Zhang Z., Kreft I. 2003. Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) as a source of dietary rutin and quercitrin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 6452-6455
- FAOSTAT. 2008. Pridelovalne površine v ha in količina pridelka v tonah.
<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567> (20.3.2008)
- Foster L.H., Sumar S. 1995. Selenium in the environment, food and health. *Nutrition & Food Science*, 5: 17-23

- Germ M., Kreft I., Osvald J. 2005. Influence of UV-B exclusion and selenium treatment on photochemical efficiency of photosystem II, yield and respiratory potential in pumpkins (*Cucurbita pepo*). *Plant Physiology and Biochemistry*, 43: 445-448
- Germ M., Kreft I., Stibilj V., Urbanc-Berčič O. 2007. Combined effects of selenium and drought on photosynthesis and mitochondrial respiration in potato. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45: 162-167
- Hanson B., Lindblom S.D., Loeffler M.L., Pilon-Smits A.H. 2004. Selenium protects plants from phloem-feeding aphids due to both deterrence and toxicity. *New Phytologist*, 162: 655-662
- Hymer C.B., Caruso J.A. 2006. Selenium speciation analysis using inductively coupled plasma-mass spectrometry – review. *Journal of Chromatography A*, 1114: 1-20
- Irion C.W. 1999. Growing alliums and brassicas in selenium enriched soils increases their anticarcinogenic potentials. *Medical Hypotheses*, 53: 232-235
- Johnsson L. 1991. Selenium uptake by plants as a function of soil type, organic matter content and pH. *Plant and Soil*, 133: 57-64
- Kreft I. 1995. Ajda. Ljubljana, ČZD Kmečki glas: 112 str.
- Kreft I., Zewen C., Jacques S. 1999. Buchweizen als Lebensmittel. V: *Das Buchweizen Buch*. Kreft I., Hagels H., Jacques-Mutsch S., Kronberger W., Kurth P., Mair V., Reis C., Scheucher S., Wintsch-Lustenberger R., Zewen C. (ur.). Azfeld, Islek ohne Grenzen Ewin: 123-124
- Läuchli A. 1993. Selenium in plants: uptake, functions and environmental toxicity. *Botanica Acta*, 106: 455-468
- Letavayova L., Vlčkova V., Brozmanova J. 2006. Selenium: From cancer prevention to DNA damage. Review. *Toxicology*, 227: 1-14
- Lorenz K. 1978. Selenium in wheats and commercial wheat flours. *Cereal Chemistry*, 55 (3): 287-294
- Lyons G.H., Genc Y., Stangoulis J.C.R., Palmer L.T., Graham R.D. 2005. Selenium distribution in wheat grain and the effect of postharvest processing on wheat selenium content. *Biological Trace Element Research*, 103: 155-168
- Marscher H. 2002. Mineral nutrition of higher plants. 6th edition. Amsterdam, Boston, London, Academic Press: 887 str.
- Modic M. 1998. Ugotavljanje vsebnosti in porazdelitev selena v vzorcih ajde (*Fagopyrum esculentum* Moench). Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 164 str.

- Pirc S., Šajn R. 1997. Vloga geokemije v ugotavljanju kemične obremenitve okolja. V: Projekt evropskega leta varstva narave 1995. Kemizacija okolja in življenja. Do katere meje? Ljubljana, Slovensko ekološko društvo: 165-185
- Pokorn D., Stibilj V., Gregorič B., Dermelj M., Štupar J. 1998. Elemental composition (Ca, Mg, Mn, Cu, Cr, Zn, Se and I) of daily diet samples from some old people's homes in Slovenia. *Journal of Food Composition and Analysis*, 11: 47-53
- Pravilnik o krmnih dodatkih. Ur. l. RS št. 47/05
- Pyrzynska K. 1996. Speciation analysis of some organic selenium compounds. *Analyst*, 121: 77-83
- Reid M.E., Stratton M.S., Lillico A.J., Fakih M., Natarajan R., Clark L.C., Marshall J.R. 2004. A report of high-dose selenium supplementation: response and toxicities. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 18: 69-74
- Rotruck J.T., Pope A.L., Ganther H.E., Hafeman D.G., Swanson A.B., Hoekstra W.G. 1973. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science*, 179: 588-590
- Roy G., Sarma B.K., Phadnis P., Mugesh G. 2005. Selenium-containing enzymes in mammals: Chemical perspectives. *Journal of Chemical Science*, 117 (4): 287-303
- Schwartz K., Foltz C.M. 1957. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *Journal of the American Chemical Society*, 79: 3292-3293
- Smrkolj P., Osvald M., Osvald J., Stibilj V. 2007. Selenium uptake and species distribution in selenium-enriched bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds obtained by two different cultivations. *European Food Research Technology A*, 2 (225): 233-237
- Smrkolj P., Pograjc L., Hlastan-Ribič C., Stibilj V. 2005. Selenium content in selected Slovenian foodstuffs and estimated daily intakes of selenium. *Food Chemistry*, 90: 691-697
- Smrkolj P., Stibilj V. 2004. Determination of selenium in vegetables by hydride generation atomic fluorescence spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 512: 11-17
- Smrkolj P., Stibilj V., Kreft I., Germ M. 2006. Selenium species in buckwheat cultivated with foliar addition of Se(VI) and various levels of UV-B radiation. *Food Chemistry*, 96: 675-681
- Sors T.G., Ellis D.R., Salt D.E. 2005. Selenium uptake, translocation, assimilation and metabolic fate in plants. *Photosynthesis Research*, 86: 373-389
- Spence J.T. 2006. Challenges related to the composition of functional foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19: S4-S6

- Stadlober M, Sager M., Irgolic J.K. 2001. Effects of selenat supplemented fertilisation on the selenium level of cereals – identification and quantification of selenium compounds by HPLC-ICP-MS. *Food Chemistry*, 73: 357-366
- Stekar J., Muck O. 1971. Količina selena v žitnem zrnju. Zbornik Biotehniške fakultete, Univerza v Ljubljani, Kmetijstvo, 18: 13-17
- Stibilj V., Kreft I., Smrkolj P., Osvald J. 2004. Enhanced selenium content in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench.) and pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) seeds by foliar fertilisation. *European Food Research Technology*, 219: 142-144
- Terry N., Zayed A.M., de Souza M.P., Tarun A.S. 2000. Selenium in higher plants. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51: 401-432
- Uden P.C., Boakye H.T., Kahakachchi C., Tyson J.F. 2004. Selective detection and identification of Se containing compounds – review and recent developments. *Journal of Chromatography A*, 1050: 85-93
- Vandecasteele C., Block C.B. 1993. *Modern Methods for Trace Element Determination*. Chichester, New York, John Wiley & Sons: 526 str.

ZAHVALA

Za strokovno usmerjanje in pomoč, številne nasvete ter razumevanje se iskreno zahvaljujem mentorici, izr. prof. dr. Vekoslavi Stibilj. Najlepše se zahvaljujem somentorju, akademiku prof. dr. Ivanu Kreftu, za predlagano tematiko, oskrbo poskusa ter strokovne nasvete in mnenja pri nastajanju te naloge.

Za nesebično pomoč pri delu in vzpodbude se zahvaljujem Petri Cuderman, hvala tudi vsem ostalim sodelavcem z Odseka za znanosti o okolju za prijetno delovno vzdušje.

Za vsestransko pomoč tekom študija in za nasvete se zahvaljujem staršem, Matjažu pa za oporo in razumevanje.