

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Sean ČEBRON

**KARAKTERIZACIJA KOLERABICE S STABILNIMI IZOTOPI
OGLJIKA IN DUŠIKA**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**CHARACTERIZATION OF KOHLRABI WITH STABLE CARBON
AND NITROGEN ISOTOPES**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2013

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je bilo na Katedri za tehnologije, prehrano in vino na Oddelku za živilstvo Biotehniške Fakultete Univerze v Ljubljani in na Odseku za znanost o okolju na Inštitutu Jožef Štefan v Ljubljani.

Za mentorja diplomskega dela je imenovan prof. dr. Rajko Vidrih, za somentorico doc. dr. Nina Kacjan Maršić in za recenzentko prof. dr. Tatjana Košmerl.

Mentor: prof. dr. Rajko Vidrih

Somentorica: doc. dr. Nina Kacjan Maršić

Recenzentka: prof. dr. Tatjana Košmerl

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

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

Sean Čebron

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn

DK UDK 635.125:631.8:641.1:543.067(043)=163.6

KG kolerabica/ *Brassica oleracea* L. var. *gongylodes* L./listi/gomolj/ekološka pridelava/konvencionalna pridelava/gnojila/rastlinska hranila/stabilni izotopi ogljika/stabilni izotopi dušika/nitritni dušik/nitratni dušik/amonijev dušik/antioksidativni potencial/fenoli

AV ČEBRON, Sean

SA VIDRIH, Rajko (mentor)/KACJAN MARŠIĆ, Nina (somentorica)/KOŠMERL, Tatjana (recenzentka)

KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

LI 2013

IN KARAKTERIZACIJA KOLERABICE S STABILNIMI IZOTOPI OGLJIKA IN DUŠIKA

TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)

OP XI, 62 str., 18 preg., 17 sl., 82 vir.

IJ sl

JI sl/en

AI Uveljavljene metode za kemijsko in fizikalno analizo hrane nam ne omogočajo ugotavljanja avtentičnosti ekološko pridelanega sadja in zelenjave. Primarni namen diplomskega dela je bil karakterizacija ekološko in konvencionalno pridelanih rastlin kolerabice (*Brassica oleracea* L. var. *gongylodes* L.) s stabilnimi izotopi ogljika in dušika z metodo IRMS ter ugotavljanje primernosti te metode za ločevanje ekološko pridelanih od konvencionalno pridelanih rastlin. Rastline smo vzgojili sami v zemlji, ki pred tem ni bila gnojena vsaj 5 let, za gnojenje smo uporabili različna komercialno dostopna organska in mineralna gnojila. Poleg izotopske sestave ogljika ($\delta^{13}\text{C}$) in dušika ($\delta^{15}\text{N}$) smo določali še druge parametre: število listov, ki so jih razvile rastline, maso rastlin, maso gomolja, velikost gomolja, antioksidativni potencial, vsebnost fenolov, vsoto nitritnega in nitratnega dušika v listih in v gomolju ter vsebnost amonijevega dušika v listih in gomolju. V povprečju smo v listih in gomoljih kolerabice, pridelane z organskimi gnojili, zabeležili večje in statistično značilno različne povprečne vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ (6,9 – 7,8 ‰), kot pri tistih, ki so bile gnojene z mineralnimi gnojili (2,1 – 4,1 ‰).

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC UDC 635.125:631.8:641.1:543.067(043)=163.6

CX kohlrabi/ *Brassica oleracea* L. var. *gongylodes* L./leaves/bulb/organic farming/conventional farming/fertilisers/plant nutrition/stable carbon isotopes/stable nitrogen isotopes/nitrate nitrogen/nitrite nitrogen/ammonium nitrogen/antioxidant potential/phenols

AU ČEBRON, Sean

AA VIDRIH, Rajko (supervisor)/KACJAN MARŠIĆ, Nina (co-advisor)/KOŠMERL, Tatjana (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology

PY 2013

TI CHARACTERIZATION OF KOHLRABI WITH STABLE CARBON AND NITROGEN ISOTOPES

DT Graduation thesis (University studies)

NO XI, 62 p., 18 tab., 17 fig., 82 ref.

LA si

AL sl/en

AB Established methods for chemical and physical analysis of food do not enable verification of authenticity for organically grown fruit and vegetables. Primary goal of this thesis was to characterize organically and conventionally grown kohlrabi (*Brassica oleracea* L. var. *gongylodes* L.) with IRMS method for stable isotope ratio analysis and assessment of suitability of this method for distinguishing organically and conventionally grown plants. The plants were grown in soil that had not been fertilised for at least 5 years prior to this experiment and various commercially available organic and mineral fertilisers were used. Isotopic composition of carbon ($\delta^{13}\text{C}$) and nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) was analysed and certain other parameters were determined: number of leaves that plants developed, plant mass, bulb mass, bulb size, antioxidant potential, content of total phenols, nitrite and nitrate nitrogen in leaves and bulbs and content of ammonium nitrate in leaves and bulbs. Average values for $\delta^{15}\text{N}$ in organically grown plants were higher (6,9 – 7,8 ‰) and statistically significantly different from those found in conventionally grown plants (2,1 – 4,1 ‰).

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 EKOLOŠKO KMETIJSTVO	3
2.2 PREDNOSTI IN POMANJKLJIVOSTI EKOLOŠKEGA IN KONVENCIONALNEGA KMETIJSTVA	3
2.2.1 Konvencionalno kmetijstvo	3
2.2.2 Ekološko kmetijstvo	4
2.3 BOTANIČNA OPREDELITEV KOLERABICE	4
2.4 ZAHTEVE RASTLINE.....	4
2.4.1 Temperatura	4
2.4.2 Vлага	5
2.4.3 Tla	5
2.4.4 Gnojenje	5
2.4.5 Kolobar	6
2.4.6 Habitus rastline.....	6
2.4.7 Gnojenje rastlin	6
2.4.8 Spravilo.....	6
2.4.9 Prehranska vrednost	7
2.5 POMEN ESENCIJALNIH MAKRO- IN MIKROELEMENTOV	8
2.5.1 Funkcija makro- in mikroelementov	8
2.5.2 Vloga dušika v rastlinah	9
2.5.2.1 Kroženje dušika v naravi.....	10
2.5.2.2 Akumulacija dušika v rastlini.....	11
2.5.2.3 Vpliv nitratov na človeško zdravje.....	11
2.5.3 Vloga ogljika v rastlinah	12
2.5.3.1 Nastanek energije v rastlini	12
2.5.3.1.1 Calvinov cikel ali C3	12

2.5.3.1.2	C4 ali Hatch-Slackov cikel	13
2.5.3.1.3	CAM CIKEL.....	14
2.5.3.1.4	Pomen Calvinovega cikla	15
2.6	ANTIOKSIDANTI	16
2.6.1	Pomen antioksidantov v sadju in zelenjavi	17
2.6.2	Fenoli	18
2.6.2.1	Flavonoidi.....	18
2.6.2.2	Hidroksicimetne kisline.....	19
2.7	STABILNI IZOTOPI, PORAZDELITEV V NARAVI IN MOŽNOST FRAKCIJACIJE	19
2.7.1	Vplivi na porazdelitev stabilnih izotopov	22
2.7.1.1	Izotopska frakcionacija ogljika med fotosintezo.....	22
2.7.1.2	Izotopska frakcionacija dušika	23
2.7.2	Analize stabilnih izotopov z metodo IRMS	23
3	MATERIALI IN METODE DELA	25
3.1	VZOREC	25
3.1.1	Opis gnojil	25
3.1.1.1	Plantella Organik (v nadaljevanju Organik).....	25
3.1.1.2	Fertildung Stallatico umificato pellettato (v nadaljevanju Stallatico)....	25
3.1.1.3	ENTEC perfect (v nadaljevanju ENTEC).....	25
3.1.1.4	Kristalon modri (v nadaljevanju WSF) (Yara, Norveška)	26
3.1.1.5	Kombinacija gnojenja z organskim in mineralnim gnojilom (v nadaljevanju Org + M)	26
3.1.2	Postavitev preskusa	26
3.2	PREDPRIPRAVA VZORCEV ZA ANALIZE	28
3.3	ANALIZA VSEBNOSTI NITRITNEGA IN NITRATNEGA DUŠIKA TER AMONIJEVEGA DUŠIKA	29
3.4	DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNEGA POTENCIALA	30
3.5	DOLOČANJE VSEBNOSTI SKUPNIH FENOLOV PO SINGLETONU IN ROSSIJU	31
3.6	DOLOČANJE $\delta^{15}\text{N}$ VREDNOSTI Z MASNO SPEKTROMETRIJO	33
3.7	DOLOČANJE $\delta^{13}\text{C}$ VREDNOSTI Z MASNO SPEKTROMETRIJO	34
3.8	DOLOČANJE $\delta^{13}\text{C}$ IN $\delta^{15}\text{N}$ VREDNOSTI V GNOJILIH Z MASNO SPEKTROMETRIJO.....	35
3.9	STATISTIČNA ANALIZA	35
4	REZULTATI.....	36

4.1 PRIMERJAVA POVPREČNIH VREDNOSTI REZULTATOV ANALIZ IN UGOTAVLJANJE RAZLIK MED RASTLINAMI	36
4.1.1 Rezultati meritev števila listov, mase rastline, mase gomolja, višine gomolja in širine gomolja.....	36
4.1.2 Antioksidativni potencial in skupni fenoli.....	38
4.1.3 Nitritni, nitratni in amonijev dušik v gomolju in listih.....	40
4.1.4 Vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{15}\text{N}$ v gomoljih in listih.....	42
4.2 KORELACIJE MED RAZLIČNIMI PARAMETRI.....	45
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	49
5.1 RAZPRAVA	49
5.1.1 Vpliv gnojenja na $\delta^{13}\text{C}$	49
5.1.2 Vpliv gnojenja na $\delta^{15}\text{N}$	49
5.1.3 Vpliv gnojenja na maso rastlin, število listov in velikost gomoljev.....	50
5.1.4 Antioksidativni potencial	50
5.1.5 Skupni fenoli	51
5.1.6 Nitritni in nitratni dušik	52
5.1.7 Amonijev dušik	53
5.2 SKLEPI	54
6 POVZETEK	55
7 VIRI	56
ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Osnovne razlike med ekološkim in konvencionalnim kmetijstvom (Bavec in sod., 2001: 22)	3
Preglednica 2: Prednosti in pomanjkljivosti konvencionalnega kmetijstva (Bavec in sod., 2001: 22).....	3
Preglednica 3: Prednosti in pomanjkljivosti ekološkega kmetijstva (Bavec in sod., 2001: 23).....	4
Preglednica 4: Vsebnost makrohranil v kolerabici (Černe in Vrhovnik, 1992: 15)	7
Preglednica 5: Vsebnost nekaterih za prehrano pomembnih vitaminov v kolerabici (Černe in Vrhovnik, 1992: 19)	7
Preglednica 6: Vsebnost nekaterih za prehrano pomembnih mineralov v kolerabici (Černe in Vrhovnik, 1992: 17)	8
Preglednica 7: Stabilni izotopi ogljika in dušika ter njihove povprečne številčnosti (Ghidini in sod., 2006)	20
Preglednica 8: Sestava reagentnih mešanic za umeritveno krivuljo.....	32
Preglednica 9: Povprečne vrednosti in standardni odkloni pri rastlinah kolerabice gnojene z različnimi gnojili za število listov, maso rastline, maso gomolja, višino gomolja in širino gomolja.	36
Preglednica 10: Povprečne vrednosti in standardni odkloni pri rastlinah kolerabice gnojene z različnimi gnojili za antioksidativni potencial in skupne fenole.	38
Preglednica 11: Povprečne vrednosti in standardni odkloni v rastlinah kolerabice gnojene z različnimi gnojili za nitritni in nitratni dušik ter za amonijev dušik v gomolju in v listih..	40
Preglednica 12: Povprečne vrednosti in standardni odkloni v rastlinah kolerabice, gnojene z različnimi gnojili vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{15}\text{N}$ v gomoljih in listih.....	42
Preglednica 13: $\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{15}\text{N}$ vrednosti v uporabljenih gnojilih, izražene v %.	45
Preglednica 14: Pearsonovi korelacijski koeficienti in p-vrednosti za parametre: število listov, masa rastline, masa gomolja, višina gomolja in širina gomolja.	45
Preglednica 15: Pearsonovi korelacijski koeficienti in p vrednosti za parametre: število listov, masa, antioksidativni potencial, skupni fenoli, nitritni+nitratni dušik v gomolju, nitritni+nitratni dušik v listih, amonijev dušik v listih in amonijev dušik v gomolju.	46

Preglednica 16: Pearsonovi korelacijski koeficienti in p vrednosti med parametri število listov, masa, višina gomolja, širina gomolja, $\delta^{13}\text{C}$ v gomolju, $\delta^{13}\text{C}$ v listih, $\delta^{15}\text{N}$ v gomolju in parametri $\delta^{13}\text{C}$ v gomolju, $\delta^{13}\text{C}$ v listih, $\delta^{15}\text{N}$ v gomolju, $\delta^{15}\text{N}$ v listih.....	47
Preglednica 17: Pearsonovi korelacijski koeficienti in p vrednosti med parametri: antioksidativni potencial, skupni fenoli, nitritni+nitratni dušik v gomolju, nitritni+nitratni dušik v listih, amonijev dušik v listih, amonijev dušik v gomolju in parametri $\delta^{13}\text{C}$ v gomolju, $\delta^{13}\text{C}$ v listih, $\delta^{15}\text{N}$ v gomolju, $\delta^{15}\text{N}$ v listih.....	47
Preglednica 18: Pearsonovi korelacijski koeficienti in p vrednosti med položajem v rastlinjaku in vsemi ostalimi parametri.	48

KAZALO SLIK

Slika 1: Calvinov cikel (Vodnik, 2012: 64)	13
Slika 2: Hatch-Slackov cikel (Vodnik, 2012: 67).....	14
Slika 3: CAM cikel (Vodnik, 2012: 69)	15
Slika 4: Princip delovanja IRMS (Kelly, 2003: 163).....	24
Slika 5: Rastline kolerabice v steklenjaku na dan 16.5.2011.....	27
Slika 6: Tanke rezine gomolja kolerabice v terilnici, prelite s tekočim dušikom.....	28
Slika 7: Povprečja in standardni odkloni števila listov kolerabice, gnojene z različnimi gnojili.....	36
Slika 8: Povprečne vrednosti in standardni odkloni mase rastlin in mase gomoljev kolerabice, gnojene z različnimi gnojili, izražene v gramih.....	37
Slika 9: Povprečna višina in širina gomoljev kolerabice, gnojene z različnimi gnojili, izražena v milimetrih, ter standardni odkloni.....	38
Slika 10: Povprečne vrednosti in standardni odkloni antioksidativnega potenciala gomoljev kolerabice, gnojene z različnimi gnojili, izražene v mmol DPPH/100 g	39
Slika 11: Povprečne vrednosti in standardni odkloni koncentracije skupnih fenolov v gomoljih kolerabice, gnojene z različnimi gnojili, izražene v mg ekvivalentov galne kisline na 100 g	39
Slika 12: Povprečne vrednosti in standardni odkloni vsote koncentracij nitratnega in nitritnega dušika v listih in gomoljih kolerabice, gnojene z različnimi gnojili, izražene v mg/kg.....	41
Slika 13: Povprečne vrednosti in standardni odkloni koncentracije amonijevega dušika v listih in gomoljih kolerabice, gnojene z različnimi gnojili, izražene v mg/kg.	42
Slika 14: Povprečne vrednosti in standardni odkloni $\delta^{13}\text{C}$ proti standardu VPDB v gomoljih kolerabice, gnojene z različnimi gnojili, izražene v promilih.	43
Slika 15: Povprečne vrednosti in standardni odkloni $\delta^{13}\text{C}$ proti standardu VPDB v listih kolerabice, gnojene z različnimi gnojili, izražene v promilih.	43
Slika 16: Povprečne vrednosti in standardni odkloni $\delta^{15}\text{N}$ proti standardu AIR v gomoljih kolerabice, gnojene z različnimi gnojili, izražene v promilih.	44
Slika 17: Povprečne vrednosti in standardni odkloni $\delta^{15}\text{N}$ proti standardu AIR v listih kolerabice, gnojene z različnimi gnojili, izražene v promilih.	44

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

δ ¹⁵N	Relativna razlika v vsebnosti stabilnega izotopa dušika ¹⁵ N med vzorcem in standardom, izražena v ‰.
δ ¹³C	Relativna razlika v vsebnosti stabilnega izotopa ogljika ¹³ C med vzorcem in standardom, izražena v ‰.
AOP	Antioksidativni potencial
C₃ rastline	Rastline, ki ogljikove spojine sintetizirajo preko Calvinovega cikla.
C₄ rastline	Rastline, ki ogljikove spojine sintetizirajo preko Hatch-Slackovega cikla in imajo posebno CO ₂ črpalko, ki poviša njegovo koncentracijo v bližini encima rubisco.
ENTEC	Mineralno gnojilo z dodatkom stabilizatorja amonijske oblike dušika, ki zavira delovanje nitrifikacijskih bakterij. Polno ime: ENTEC perfect
IRMS	Isotope Ratio Mass Spectrometry – posebna vrsta masne spektrometrije, ki omogoča merjenje relativnih številčnosti izotopov v vzorcu.
Organik	Organsko, termično obdelano gnojilo. Polno ime: Plantella Organik.
Org+M	Kombinirano gnojenje z organskim gnojilom Organik in mineralnim gnojilom WSF.
Stallatico	Organsko gnojilo iz sušenega hlevskega gnoja perutnine in goveda, ki je bil podvržen zorenju 9 mesecev. Polno ime: Fertildung Stallatico umificato pellettato.
WSF	Popolnoma vodotopno mineralno gnojilo. polno ime: Kristalon modri.

1 UVOD

Zaradi neprestanega povečevanja števila prebivalcev na zemlji je človeštvo skozi svojo zgodovino vedno bilo prisiljeno iskati učinkovitejše načine pridelave živil, ki so zagotovili, da je pridelalo dovolj in iz desetletja v desetletje večjo količino hrane. Z uporabo novih tehnik, fitosanitarnih pripravkov, gnojil in ne nazadnje tudi gensko spremenjenih rastlin, se je kmetijstvo intenziviralo in posvetilo čim bolj učinkovitim načinom pridelave hrane. Ta način pridelave imenujemo konvencionalno kmetijstvo, s čimer opisujemo tip gojenja, ki se je razvil v dvajsetem stoletju in tudi danes predstavlja večinski delež kmetijstva na svetu.

Kot kontrast konvencionalnemu kmetijstvu, ki želi doseči čim večji pridelek in se pretirano ne ozira na učinke na okolje, se je razvilo ekološko kmetijstvo. Pri ekološki pridelavi sadja in zelenjave je prepovedana uporaba mineralnih gnojil in sintetičnih sredstev za varstvo rastlin, kar zmanjša količino pridelka in poviša pridelovalne stroške, vendar je tak način pridelovanja v primerjavi s konvencionalnim okolju prijaznejši, ekološko pridelana živila pa naj bi imela bolj pozitiven vpliv na naše zdravje. Ekološko kmetijstvo se je v Evropi začelo razvijati v 20. letih 20. stoletja, zaradi naraščajočega povpraševanja po ekoloških živilih in potrebe po standardizaciji in nadzoru pa se je v 60. in 70. letih dokončno izoblikovalo. V Sloveniji se izvaja od 90. let prejšnjega stoletja. Imamo zvezo združenj ekoloških kmetov Slovenije, kmetije v Registru ekoloških kmetij pa imajo certifikat, ki zagotavlja pristnost njihovih pridelkov (Bavec in sod., 2001).

Med letoma 1999 in 2010 se je skupna površina Zemlje, namenjena organski pridelavi hrane, povečala iz 11 milijonov hektarjev na 37 milijonov hektarjev in je leta 2010 obsegala 0,9 % vseh površin, namenjenih kmetijstvu, tržišče z organsko hrano pa je bilo vredno 44,5 milijard EUR (Willer, 2012). V Sloveniji se z ekološkim kmetijstvom iz leta v leto ukvarja večje število kmetijskih gospodarstev, med leti 2000 in 2011 je njihovo število namreč zraslo iz 115 na 1999 (SURS, 2012).

Potrošniki morajo za kilogram ekološko pridelanega proizvoda plačati več kot za kilogram primerljivega, konvencionalno pridelanega, vendar, kako lahko vedo, da je bil resnično pridelan na ekološki način? In, če je bil pridelan po načelih ekološkega kmetijstva, ali je za potrošnika dejansko koristnejši?

Kot so zapisali Bateman in sod. (2007), je avtentičnost ekološko pridelane solate, paradižnika in korenja mogoče ugotoviti z analizo deleža stabilnega izotopa ^{15}N v njihovem tkivu, saj različni tipi gnojil, ki se uporablajo v konvencionalnem in ekološkem kmetijstvu, privedejo do različne izotopske sestave rastlin. Rezultati njihove študije so sicer pokazali, da iz analize enega samega vzorca rastline še ne moremo z gotovostjo trditi, ali gre za organsko ali konvencionalno pridelano rastlino, vendar pa so statistično obdelani rezultati

dober pokazatelj pri ugotavljanju zamenjave organsko pridelanih rastlin z rastlinami iz konvencionalne pridelave.

Dolgoročna primerjalna raziskava, ki so jo izvedli Herencia in sod. (2011), je pokazala, da zelenjava, pridelana po načelih ekološkega kmetijstva, vsebuje manj nitratov in več molekul z majhno vsebnostjo dušika (polifenoli, celuloza, škrob). Asami in sod. (2003) so primerjali ekološko in konvencionalno pridelane liofilizirane jagode, robidnice in koruzo ter prišli do ugotovitve, da ekološko pridelane rastline vsebujejo več antioksidantov in fenolov.

Kolerabica ni med najbolj popularnimi zelenjadnicami v Sloveniji, zato je njena pridelava omejena predvsem na manjše vrtove in pridelovalce, ki z njo trg oskrbujejo skozi celo leto. Nekateri izmed preverljivih parametrov njene kakovosti so antioksidativni potencial, vsebnost fenolov, vsebnost nitratnega dušika, ipd.

1.1 NAMEN DELA

Glavni namen diplomskega dela je bilo ugotavljanje primernosti uporabe izotopske sestave ogljika in dušika v gomolju in listih kolerabice kot markerjev za ločevanje med rastlinami pridelanimi konvencionalno (z mineralnimi gnojili) in rastlinami pridelanimi ekološko (z organskimi gnojili). Poleg tega smo določali tudi vsebnost nitritnega in nitratnega dušika, amonijevega dušika in skupnih fenolov ter antioksidativni potencial. Te vrednosti so pomembni pokazatelji kakovosti, ki so nam pomagali ugotoviti, ali je organsko pridelana kolerabica kvalitetnejša od konvencionalno pridelane.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Pred začetkom raziskave smo postavili naslednje hipoteze:

- delež izotopa ^{15}N je večji v kolerabici, gnojeni z organskimi gnojili
- delež izotopa ^{13}C je večji v kolerabici, gnojeni z mineralnimi gnojili
- kolerabica, gnojena z organskimi gnojili, ima večji antioksidativni potencial in večjo koncentracijo skupnih fenolov
- vsebnost nitratnega, nitritnega in amonijevega dušika je večja v kolerabici, gnojeni z mineralnimi gnojili

2 PREGLED OBJAV

2.1 EKOLOŠKO KMETIJSTVO

Pri ekološkem pridelovanju rastlin je prepovedana uporaba lahko topnih mineralnih gnojil in sintetičnih sredstev za varstvo rastlin. Za ohranjanje ali povečanje rodovitnosti tal se tako poslužujemo gnojenja z organskimi gnojili, veliko vlogo pa ima tudi kolobar. Za zaščito rastlin pred boleznimi, škodljivci in plevelom se poslužujemo pravilne obdelave tal, izbiramo odpornejše sorte, uporabljamo biotična (predatorji) in biotehniška sredstva (vabe, lepljive plošče, ipd.). Uporabljamo lahko tudi dovoljena sredstva za varstvo rastlin, kot so baker, žveplo, piretrin, parafinska in mineralna olja, krompirjev dekstrin, lecitin itd. (Bavec in sod., 2001).

Preglednica 1: Osnovne razlike med ekološkim in konvencionalnim kmetijstvom (Bavec in sod., 2001: 22)

	Ekološko	Konvencionalno
Izboljšanje rodovitnosti tal	s pravilnimi postopki obdelave, organskim gnojenjem, kolobarjem...	z uporabo mineralnih gnojil
Prehrana rastlin	hranila se iz organskega gnojila sproščajo postopoma	rastline lahko hranila iz mineralnih gnojil uporabijo v nespremenjeni obliki
Varstvo rastlin	odprava vzrokov, preprečevanje nastanka bolezni in škodljivcev, rasti plevelov	odprava znamenj z uporabo sintetičnih fitofarmacevtskih sredstev

2.2 PREDNOSTI IN POMANJKLJIVOSTI EKOLOŠKEGA IN KONVENCIONALNEGA KMETIJSTVA

2.2.1 Konvencionalno kmetijstvo

Preglednica 2: Prednosti in pomanjkljivosti konvencionalnega kmetijstva (Bavec in sod., 2001: 22).

Prednosti	Pomanjkljivosti
<ul style="list-style-type: none"> • veliki pridelki • pridelki prikupnega videza • velika delovna storilnost • prihranek časa • lažje delo 	<ul style="list-style-type: none"> • sprememba krajine • osiromašenje narave • ekološka nestabilnost • onesnaževanje okolja (pesticidi, herbicidi, nitrati) • razsipna poraba surovin • odvisnost od drugih • obtoževanje kmetov zaradi odnosa do okolja • izguba kmetovalne svobode (združevanje multinacionalnih podjetij za varstvo rastlin in semenarstvo) • zniževanje odkupnih cen kmetijskih pridelkov v svetovnem merilu

2.2.2 Ekološko kmetijstvo

Preglednica 3: Prednosti in pomanjkljivosti ekološkega kmetijstva (Bavec in sod., 2001: 23).

Prednosti	Pomanjkljivosti
<ul style="list-style-type: none"> • pridelki z najvišjo notranjo kakovostjo • varstvo okolja • pridelavo na kmetiji nadzirajo kontrolne službe • zadovoljitev povpraševanja na trgu • osebna osveščenost kmata • poštenost do sebe in porabnika • boljša kakovost - višje cene • tržna priložnost za določeno število kmetij • ni onesnaževanja okolja s pesticidi • ob primerni oskrbi z organskimi gnojili ni onesnaževanja z nitrati • zmanjšana odvisnost od industrije gnojil in pesticidov • večje podpore na hektar 	<ul style="list-style-type: none"> • manjši pridelki • večji pridelovalni stroški • ni še dovolj kupcev • neozaveščenost kmetov in kupcev • posmeh sosedov • velik pritisk plevelov, bolezni in škodljivcev v prvih letih po preusmeritvi • na ekološki kmetiji je potrebna sprememba v načinu razmišljanja • nujne investicije v stroje za mehanično zatiranje plevelov • treba je spremeniti način prodaje in že na kmetiji doseči čim večjo dodano vrednost • potrebna so nova/druga znanja o pridelavi • preusmeritveno obdobje traja dve leti ali dlje, da so pridelki priznani kot ekološki - v tem času obstaja problem prodaje

2.3 BOTANIČNA OPREDELITEV KOLERABICE

Kolerabico, *Brassica oleracea* L. var. *gongylodes* L., uvrščamo med kapusnice, ki spadajo v družino križnic. Družina križnic je zelo raznolika, saj je sestavljena iz več kot 3000 vrst, ki jih uvrščamo v 350 rodov. Pomembna je predvsem v Evropi, zlasti v Nemčiji, Avstriji, Švici, Franciji in Belgiji. Pridelujejo jo tako za svežo porabo kot za predelavo, pri nas pa je pridelovanje kolerabice omejeno predvsem na manjše vrtove in pridelovalce, ki trg s svežo kolerabico oskrbujejo vse leto (Černe, 1998).

Njeno ime izvira iz nemških besed kohl (zelje) in rabi (repa), saj izgleda kot mešanec med temo dvema sortama. Listi kolerabice spominjajo na zelje, odebeleno steblo pa na repo (Lešić in sod., 2004).

2.4 ZAHTEVE RASTLINE

2.4.1 Temperatura

Tako kot vse kapusnice tudi kolerabica zahteva zmerno toplo podnebje, vendar je v primerjavi z ostalimi občutljivejša na nizke temperature po setvi. Optimalno kali pri temperaturi tal 30 °C, spodnja meja je 10 °C, zgornja pa 35 °C. Velik vpliv na razvoj rastline

imajo temperature po vzniku, saj pri prenizkih temperaturah že tri tedne stari sejanci jarovizirajo. Namesto da bi se steblo odebelilo, rastline pričnejo z odganjanjem cvetnih stebel (Černe, 1998). Optimalna temperatura za gojenje sadik je med 12 in 16 °C, ne sme pa pasti pod 8 °C (Pavlek, 1988).

Rastline je pomembno vzgajati v toplejšem okolju, saj v nasprotnem primeru po presaditvi na prosto rade pokajo (Černe, 1998).

Optimalna temperatura za rast kolerabice je med 14 °C in 16 °C in naj ne bi padla pod 4 °C ter se ne dvignila nad 20 °C. Tako kot ostale kapusnice, kolerabica potrebuje zmerno toplo podnebje z dovolj zračne in talne vlage. Od njih se razlikuje le po tem, da je občutljivejša na nizke temperature po setvi.

2.4.2 Vlaga

Da dobimo kvaliteten in sočen gomolj, kolerabica ves čas rasti zahteva enakomerno oskrbo z vodo. Nezaželen pojav je pokanje gomoljev, do katerega pride zaradi velikega pomanjanja vode. Gomolji lahko popokajo tudi, če po suši pade veliko dežja. Kolerabica se optimalno razvija pri 65 % poljski kapaciteti tal za vodo, zadostna oskrba z vodo pa prepreči tudi olesenitev gomoljev. V letih z manj padavinami jo je potrebno namakati s 40 do 80 mm vode, v sušnih letih pa z 80 do 120 mm vode (Černe, 1998).

2.4.3 Tla

Kolerabica ni preveč zahtevna glede kakovosti tal. Pri zgodnjem pridelovanju jo sadimo v lahko zemljo, za poznejšo (poletno in jesensko) pridelavo pa so primernejša težja tla, ki imajo humus in večjo sposobnost zadrževanja vode.

pH tal naj bi se gibal med 7,5 in 6. Pri pH pod 6 se pri kapusnicah pojavlja golšavost, zato je bolj kislo zemljo potrebno apniti (Černe, 1998).

2.4.4 Gnojenje

Černe (1998) pravi, da zaradi kratke rastne dobe kolerabice gnojenje z organskimi gnojili nima bistvenega vpliva na povečanje pridelka. Priporoča, da jo presajamo na poljino, ki smo jo prejšnje leto pognojili s hlevskim gnojem.

Za uspešno rast potrebuje predvsem dušik in kalij. Pri pomanjkanju dušika pride do rumenenja listov. Listi so najprej svetlo zeleni, nato porumenijo in pozneje odpadejo. Pri premočnem gnojenju z dušikom so gomolji nagnjeni k pokanju. Pomanjkanje kalija lahko tudi povzroča rumenenje listov - ti postanejo klorotični, robovi porumenijo, pozneje pa listi odmrejo in odpadejo (Osvald in Kogoj-Osvald, 1998).

2.4.5 Kolobar

Kot druge kapusnice, kolerabico na istem zemljišču pridelujemo vsaka tri do štiri leta. Ustrezni prejšnji posevki so vse rastline, ki zemljo zapustijo v primerni strukturi, ne smejo pa biti križnice (Černe, 1998).

2.4.6 Habitus rastline

Je dvoletna rastlina, ki pri normalni rasti cvetno steblo razvije v drugem letu po jarovizaciji.

Ob kalitvi razvije hipokotil, klična lista in glavno korenino s stranskimi koreninicami. V tkivu nad kličnimi listi se steblo odebeli, omeseni (Černe 1998). V tehnološki zrelosti rastlina doseže višino 40 do 50 cm, v fiziološki zrelosti pa lahko v višino meri tudi 1 m (Pavlek, 1988). Po jarovizaciji se razvije golo cvetno steblo, na njem so vijakasto razmeščeni sedeči listi. Cvetovi so rumene barve, s čašnimi in venčnimi listi razporejenimi v obliki križa. Združeni so v cvetne grozde in so dvospolni.

Plod, ki se razvije po oploditvi, imenujemo lusk. V dolžino meri 8 do 12 cm in je približno 5 mm širok. Seme je temno rjave barve, okrogle oblike in ima premer od 1 do 2 mm (Černe, 1998).

2.4.7 Gnojenje rastlin

Rastline za rast potrebujejo različne dejavnike, kot so svetloba, CO₂, voda in mineralna hranila. Povečanje vnosa katerega koli izmed teh faktorjev iz območja pomanjkanja poveča hitrost rasti in donos, ta odziv pa se z višanjem vnosa rastnih faktorjev zmanjšuje. Razmerje med vnosom rastnih faktorjev in donosom opisuje Mitscherlichov zakon (Mitscherlich, 1953), ki pravi, da so krivulje donosnega odziva za neko mineralno hranilo asimptotične; če povečamo vnos enega mineralnega hranila, postanejo ostali rastni faktorji ali genetski potencial rastline limitirajoči.

S tem zakonom si lahko razlagamo pomembnost gnojenja pri vzgoji rastlin. Mineralna hranila so pomemben rastni dejavnik, zelo pomembno vlogo pa igrajo razmerja med minerali prisotnimi tako v zemlji kot v gnojilu, saj morajo ustrezati genetsko določenim zahtevam rastline, ki jo vzgajamo.

2.4.8 Spravilo

V rastlinjakih kolerabico pobiramo, ko ima gomolj premer 3 cm. Na prostem mora gomolj doseči premer najmanj 5 cm, pri poletnem pobiranju do 7 cm. V kolikor je kolerabica namenjena za predelavo, jo lahko pobiramo pri premeru gomolja 10 do 15 cm.

Zgodnje, manjše pridelke se po navadi prodaja z listi, pozne pa brez. Optimalni pogoji za skladiščenje kolerabice so pri temperaturi med 0 in 1 °C in relativni vlagi zraka 97 %. Z listi jo lahko skladiščimo do tri tedne, brez njih pa več mesecev (Černe, 1998).

2.4.9 Prehranska vrednost

Energijska vrednost se giblje med 100 in 159 kJ na 100 g očiščene kolerabice. V preglednicah 4, 5 in 6 so našteti nekateri prehransko pomembni parametri kolerabice.

Preglednica 4: Vsebnost makrohranil v kolerabici (Černe in Vrhovnik, 1992: 15)

Hranilo	Vsebnost (g/100 g očiščene kolerabice)
Voda	85,5 - 92,7
Surove beljakovine	1,03 - 2,5
Surove maščobe	0,10 - 0,15
Ogljikovi hidrati	3,57 - 7,50
Vlaknine	0,98 - 1,4
Minerali	0,89 - 1,0

Preglednica 5: Vsebnost nekaterih za prehrano pomembnih vitaminov v kolerabici (Černe in Vrhovnik, 1992: 19)

Vitamin	Vsebnost (mg/100 g očiščene kolerabice)
Askorbinska kislina	28 - 66
Karoten	0,006 - 0,45
Vitamin B ₁	0,022 - 0,075
Vitamin B ₂	0,039 - 0,050
Vitamin B ₃	0,3 - 2,62
Vitamin B ₅	0,1
Vitamin B ₆	0,097 - 0,14
Folna kislina	0,0083 - 0,012
Vitamin K	0,08 - 3

Preglednica 6: Vsebnost nekaterih za prehrano pomembnih mineralov v kolerabici (Černe in Vrhovnik, 1992: 17)

Mineral	Vsebnost (mg/100g očiščene kolerabice)
Kalij	240 - 500
Kalcij	41 - 195
Fosfor	44,2 - 66
Magnezij	43 - 48
Natrij	3 - 32
Klor	57
Železo	0,5 - 2,6
Mangan	0,11
Baker	0,14
Jod	0,0014

2.5 POMEN ESENCIALNIH MAKRO- IN MIKROELEMENTOV

Po definiciji so esencialni mineralni elementi nujno potrebni in imajo specifično funkcijo v metabolizmu rastlin. Izraz "esencialni mineralni element" sta predlagala Arnon in Stout (1939), tak element pa naj bi ustrezal naslednjim kriterijem:

- rastlina brez njega ni sposobna zaključiti svojega življenjskega cikla,
- njegova funkcija ne sme biti zamenljiva z nekim drugim mineralnim elementom,
- biti mora neposredno vključen v metabolizem rastline.

Poznamo 17 takih elementov, ki so nujno potrebni za rast in razvoj rastlin. To so ogljik (C), vodik (H), kisik (O), dušik (N), fosfor (P), kalij (K), kalcij (Ca), magnezij (Mg), žveplo (S), cink (Zn), baker (Cu), mangan (Mn), železo (Fe), bor (B), molibden (Mo), klor (Cl), in nikelj (Ni). Od teh lahko rastline C, H in O sprejemajo iz zraka in tal, ostale elemente pa izključno iz tal. Približno 95 % mase rastline predstavljajo C, H in O, 5 % mase pa predstavlja ostalih 14 elementov. C, H, O, N, P, K Ca, Mg in S so potrebni v velikih količinah, zaradi jih imenujemo makroelementi (Fageria in Moreira, 2011).

Ostale elemente, Zn, Cu, Mn, Fe, B, Mo, Cl in Ni, imenujemo mikroelementi, saj jih rastline potrebujejo v zelo majhnih količinah (Fageria in sod., 2002).

2.5.1 Funkcija makro- in mikroelementov

Glavna funkcija mineralnih hranil, kot so dušik, žveplo in fosfor, je ta, da služijo kot gradniki proteinov in nukleinskih kislin. Ostala mineralna hranila, kot so magnezij in vsi esencialni

mikroelementi z izjemo klora, lahko služijo kot sestavni deli organskih struktur, zlasti encimov.

Kalij in klor sta edini mineralni hranili, ki ne nastopata kot gradniki organskih molekul v rastlinah, temveč služijo predvsem kot osmoregulatorji, pomagajo pri vzdrževanju elektrokemičnega ravnovesja v celicah in njihovih predelih ter regulirajo encimsko aktivnost (Marschner, 1995).

2.5.2 Vloga dušika v rastlinah

Dušik je najpomembnejši element v prehrani rastlin, saj je 70 % ionov, ki jih rastlina sprejme, dušikovih. Dušikove spojine igrajo pomembno vlogo pri nastanku heterocikličnih spojin ter ostalih sekundarnih produktov (Marschner, 1995).

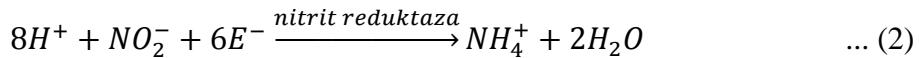
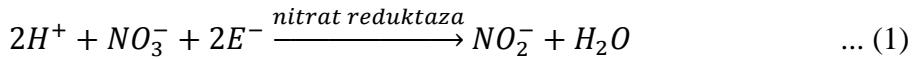
Zhao in sod. (2005) so raziskovali učinke pomanjkanja dušika na rast rastlin sirkra in ugotovili, da so rastline s pomanjkanjem dušika imele signifikantno manjšo površino listov in manjšo vsebnost klorofila v listih, kar je zmanjšalo proizvodnjo biomase.

Znano je tudi, da pomanjkanje dušika veča razmerje med suhima masama korenin in poganjkov pri enoletnih rastlinah in tudi pri trajnicah (Levin in sod., 1989; Olsthoorn in Tiktak, 1991), kar negativno vpliva na privzemanje hranil in vode v poznejših fazah rasti.

Rastline večji del dušika absorbirajo v obliki nitrata, nekaj pa tudi v obliki amonija. Nitrat je takoj po absorpciji skozi korenine mobilen in se lahko shranjuje v vakuolah korenin, poganjkov in shranjevalnih organov (Smirnoff in Stewart, 1985 cit. po Orea in sod., 2005).

Večina amonija mora biti že v koreninah vključena v organske spojine, saj ga za razliko od nitrata rastlina ne more shranjevati v vakuolah. Amonij in predvsem njegov ravnotežni partner amonijak sta namreč toksična že pri relativno majhnih koncentracijah. Sinteza aminokislin, amidov in podobnih molekul, je glavni način za detoksifikacijo amonija, ki je bil absorbiran preko korenin, ali amonijaka, ki je nastal v rastlini z redukcijo nitrata ali fiksacijo molekularnega dušika (Marschner, 1995).

Nitrat ne more biti neposredno vključen v organske molekule, najprej je potrebna redukcija do amonija, ki poteka s pomočjo dveh encimov, nitrat reduktaze in nitrit reduktaze:

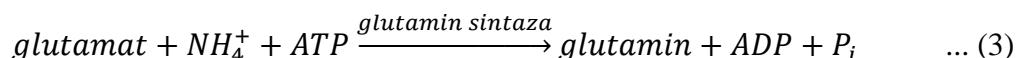


Nitrat reduktaza je dimer, sestavljen iz dveh enakih podenot. Za ekspresijo gena, ki ju kodira, so potrebni svetloba in nitrati. Do ekspresije tega gena prihaja tako v koreninah kot v poganjkih, vendar do asimilacije nitratov v pogojih z malo dušika prihaja predvsem v

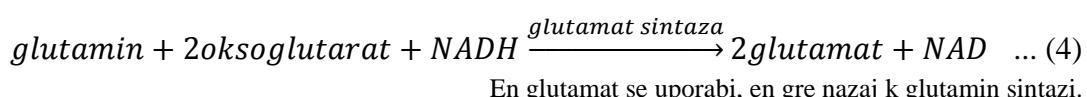
koreninah. V rastlinah, ki rastejo pri visokih temperaturah vendar ob majhni intenziteti svetlobe, lahko zaradi nizke ekspresije gena, ki kodira nitrat reduktazo, pride do akumulacije nitrata v vakuolah (Lack in Evans, 2001).

Ker je amonij za rastline toksičen, se po nastanku hitro vključi v aminokisline po glutamin sintaza-glutamat sintaza poti (Lack in Evans, 2001):

Korak 1:



Korak 2:



2.5.2.1 Kroženje dušika v naravi

Glavni rezervoar dušika v naravi je Zemljina atmosfera, v kateri se nahaja kot inerten plin, ki ga višje oblike rastlin in živali ne morejo uporabiti v svojih presnovnih procesih. Rastlinam postane dostopen šele po procesu fiksacije dušika, ko ga različni prostoživeči in simbiotski fiksatorji (alge, bakterije) pretvorijo v NH_3 (Suhadolc in sod., 2006).

Prav tako dušik iz odmrlih organskih tkiv ni neposredno dostopen rastlinam in mora biti pred absorpcijo pretvorjen v mineralno, anorgansko obliko. Nastanek anorganskega dušika iz organskih molekul imenujemo mineralizacija, po razgraditvi organskih snovi pa se v tla sprošča predvsem NH_3 , ki se lahko v rastline absorbira neposredno, večina pa se ga pred tem z nitrifikacijo pretvori v nitratno obliko. Nitrifikacija je pravzaprav oksidacija amonijske oblike dušika v dveh stopnjah (Suhadolc in sod., 2006):

- Bakterije rodov *Nitrosomonas*, *Nitrosolobus* in *Nitrosospira* amonijski ion oksidirajo do nitrita (NO_2^-).
- Bakterije rodu *Nitrobacter* nitrit oksidirajo do nitrata (NO_3^-).

NO_3^- se lahko iz tal izgublja s procesom denitrifikacije, ko ga nekatere heterotrofne bakterije iz rodov *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Pseudomonas* in *Alcaligenes* uporabijo kot vir kisika pri anaerobnem dihanju. Končni produkt denitrifikacije je N_2 , vmesni produkti pa so NO_2^- , NO in N_2O (Suhadolc in sod., 2006).

2.5.2.2 Akumulacija dušika v rastlini

Na akumulacijo dušika v rastlini vplivajo predvsem način gnojenja in okoljski ter fiziološki dejavniki, od katerih imata gnojenje z dušikom in intenziteta svetlobe največji vpliv na vsebnost nitratov v zelenjavi (Anjana in sod., 2009).

Akumulacija dušika v rastlini je pogojena tudi s hitrostjo rasti in se poveča, ko se rast upočasni. Takrat se namreč zmanjša potreba po sintezi proteinov, zaradi česar dušik ostaja v rastlini v obliki neproteinskega dušika (Brown in sod., 1993).

Gnojila z dušikom so široko uporabljena in predvsem mineralna, ki vsebujejo velik del nitratov, povzročajo akumulacijo teh v rastlini, v kolikor je hitrost njihovega sprejema večja od hitrosti njihove redukcije v amonij. Znano je, da preobilno gnojenje z nitrati poveča njihovo akumulacijo v rastlinah, vendar ne poveča pridelka (Anjana in sod., 2009).

Dnevne spremembe intenzitete sončne svetlobe so tudi bile prepoznane kot pomemben faktor, ki vpliva na dnevno nihanje koncentracije nitrata v rastlinah. Steingrüber (1986) je ugotovila, da je vsebnost nitrata v špinaci največja proti koncu noči. Špinaca, ki je v noči pred pobiranjem bila izpostavljena svetlobi, je vsebovala manj nitrata, kar je bila predvsem posledica zmanjšane absorpcije nitrata skozi korenine in ne posledica povečane redukcije nitrata v rastlini.

Nitrati so relativno neškodljivi za človeško zdravje, vendar imajo njihovi metaboliti (nitriti) nanj negativne učinke, kot sta methemoglobinemija in karcinogeneza. Največji priporočen dnevni odmerek nitratov je 3,65 mg na kg telesne mase, na njihov vnos pa moramo še posebno paziti pri prehrani dojenčkov in nosečnic (Santamaria, 2006).

2.5.2.3 Vpliv nitratov na človeško zdravje

Uživanje nitratov naj bi poviševalo pojav nekaterih vrst raka, nezaželenih izidov nosečnosti, sladkorne bolezni in motenj v delovanju ščitnice. V človekovem prebavnem traktu se nitrat namreč reducira do nitrita, ta pa po reakciji z amini tvori karcinogene in teratogene nitrozamine (Ward in Brender, 2011; Scharpf, 1991). Poleg tega nitrit predstavlja nevarnost tudi zaradi vezave na hemoglobin. S tem nastane methemoglobin, na katerega se kisik ne more vezati, kar privede do hipoksemije. Methemoglobinemiji zaradi uživanja nitratov so podvrženi predvsem dojenčki mlajši od treh mesecev (Chan, 2011).

Bryan in Grinsven (2013) sta zapisala, da čeprav nitrat v živilih že leta označujejo kot nevarnost za zdravje, za to pravzaprav nimamo trdnih dokazov. Methemoglobinemija je redek pojav, dokazi pa kažejo tudi na korelacijo z enteritisom in ne samo z vnosom nitratov. Tudi epidemiološki dokazi za povezavo med vnosom nitratov in rakavimi obolenji prebavnega trakta so nezadostni.

Znano je, da reducenti, kot je askorbinska kislina, preprečujejo nastanek nitrozaminov. Leifert in Golden (2000) navajata študijo, v kateri je bilo ugotovljeno, da obstaja negativna korelacija med uživanjem surove zelenjave in incidenco želodčnega raka. Santamaria in sod. (1999) omenjajo, da različne sestavine zelenjave, kot so fenoli in askorbinska kislina, zavirajo negativne vplive nitratov in da je ta učinek potrebno upoštevati.

2.5.3 Vloga ogljika v rastlinah

2.5.3.1 Nastanek energije v rastlini

Višje rastline so pomemben vir hrane in s tem energije tako za živalsko kot mikrobnou populacijo na zemlji. Ogljikov dioksid asimilirajo v organske spojine, ki so pozneje lahko oksidirane s strani njih samih ali s strani živali, ki se z njimi prehranjujejo. Do njihove oksidacije pride v respiratornih poteh, nudijo nam energijo, reducirno moč in intermediate za biosintezo in rast.

Te organske spojine nastanejo z uporabo sončne svetlobe s fotosintezo v avtotrofnih organizmih, ki za proizvodnjo svojih dihalnih substratov potrebujejo samo svetlobo, ogljikov dioksid, vodo in mineralne ione (Bryce in Hill, 1993).

V rastlinah obstaja samo en primarni mehanizem za karboksilacijo, rezultat katerega je sinteza ogljikovih spojin. To je Calvinov cikel, ki je skupen vsem rastlinam, vendar se te razlikujejo v fazi prevzema CO_2 iz zraka, saj imajo C₄ in CAM (Crassulacean acid metabolism) rastline nekatere pomožne mehanizme za fiksacijo ogljika.

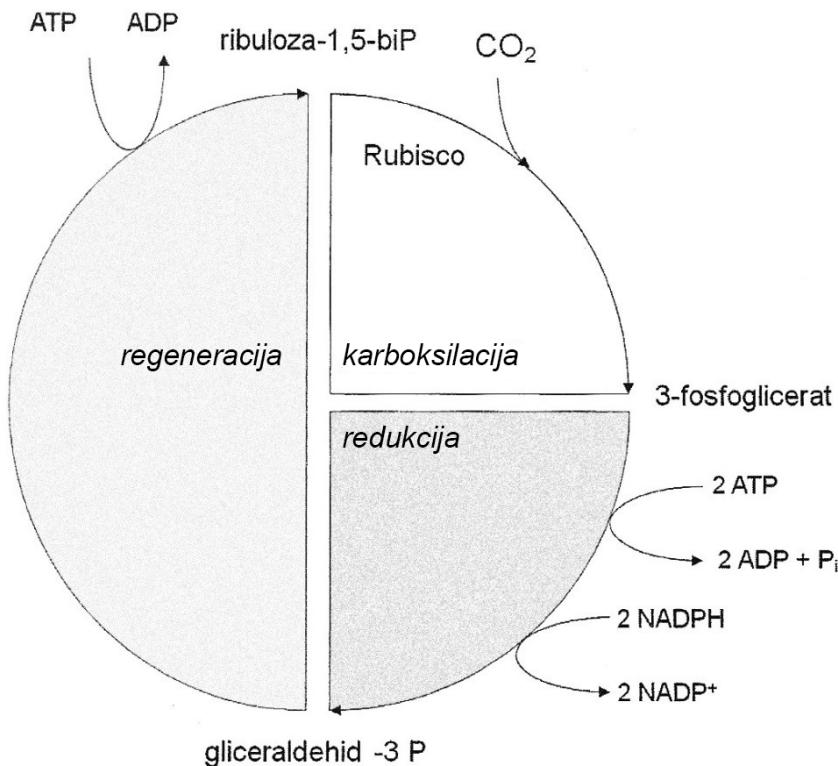
2.5.3.1.1 Calvinov cikel ali C₃

Praktično ves organski ogljik v biosferi je v neki fazi šel skozi Calvinov cikel, ki poteka v kloroplastih rastlin in je sestavljen iz 13 reakcij, ki jih katalizira 11 različnih encimov. Ta ima štiri pomembne lastnosti (Leegood, 1993a):

- Karboksilacija ribuloza-1,5-bifosfata in nastanek 3-fosfoglicerata, ki jo katalizira ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaza-oksigenaza (rubisco).
- Redukcija 3-fosfoglicerata do gliceraldehid-3-fosfata, za kar se porabita ATP in NaDPH.
- Regeneracija primarnega akceptorja, ribuloza-1,5-bisfosfata, v kateri se 5 molekul s 3 ogljikovimi atomi preuredi v 3 molekule s 5 ogljikovimi atomi, za kar je potrebna molekula ATP.
- Calvinov cikel je avtokatalitična reakcija.

Za fiksacijo ene molekule CO_2 v ponovitvi Calvinovega cikla se porabijo 3 molekule ATP in 2 molekuli NaDPH. Na vsake tri ponovitve Calvinovega cikla se generira ena molekula gliceraldehid-3-fosfata, ki se lahko porabi za sintezo ogljikovih hidratov, kot so saharoza,

škrob, celuloza, ipd., ali ponovno vstopi Calvinov cikel v obliki primarnega akceptorja, ribuloza-1,5-bisfosfata (Leegood, 1993a)



Slika 1: Calvinov cikel (Vodnik, 2012: 64)

2.5.3.1.2 C4 ali Hatch-Slackov cikel

C4 rastline imajo posebno CO₂ črpalko, ki generira povišano koncentracijo CO₂ v bližini encima rubisco. CO₂ črpalka deluje s pomočjo cikla karboksilacije in dekarboksilacije, ki vključuje nastanek kislin s 4 C atomi (Leegood, 1993b).

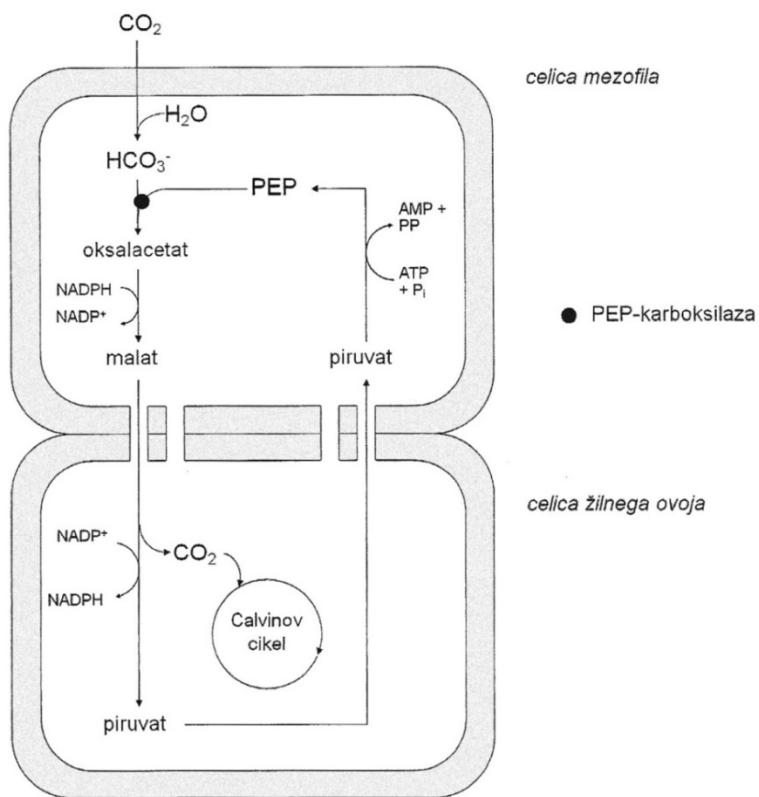
C4 cikel poteka predvsem v listih tropskih trav, kot sta sladkorni trs in koruza, značilen je tudi za družino amaretovk, mlečkovk in tolščavk. Pojavlja se v 17 družinah, vendar ni značilen za vse njihove robove in vrste, iz česar sklepamo, da se je Hatch-Slackov cikel razvil pred 10 do 15 milijoni let v različnih razvojnih linijah, če so razmere bile ustreznne za njegov razvoj (Dermastia, 2007; Taiz in Zeiger, 2006).

V C4 rastlinah CO₂ pronica v list skozi reže in se veže v mezofilnih celicah, v katerih ni rubisca. Poveže se s fosfoenolpiruvično kislino (PEP) v oksalocetno kislino. Oksalocetna kislina se nato pretvorji v malat ali aspartat, ki se skozi plazmodezme premakneta v celice ovoja. V ovojnih celicah se malat dekarboksilira, pri čemer nastaneta piruvat in CO₂.

Sproščeni CO_2 se potem vključi v Calvinov cikel, piruvat pa se vrne v mezofilne celice in se uporabi za regeneracijo PEP (Dermastia, 2007; Hall in Rao, 1999).

Trave, ki uporabljajo fotosintetsko pot C4, so dominantne v travnatih in savanskih pokrajinah toplih regij in predstavljajo več kot polovico vrst v tej ekološko in ekonomsko pomembni družini rastlin (Osborne in Freckleton, 2009).

Tako je zato, ker imajo rastline, ki so razvile C4 fotosintezo, veliko evolucijsko prednost, ki je izrednega pomena predvsem v suhem in vročem okolju. Zaradi sposobnosti koncentriranja CO_2 v okolini fotosintetskega encima rubisca, imajo lahko te rastline bolj zaprte listne reže, kar je izjemnega pomena v suhih tleh in vročem podnebju (Košir in sod., 2001; Uno in sod., 2001).



Slika 2: Hatch-Slackov cikel (Vodnik, 2012: 67)

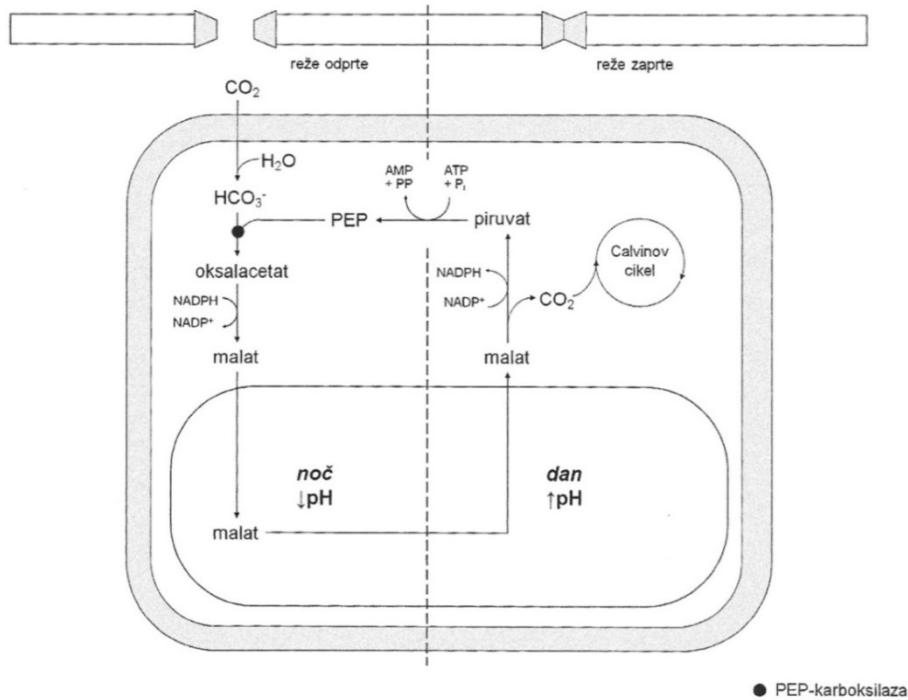
2.5.3.1.3 CAM CIKEL

CAM cikel je prilagoditev, ki rastlinam omogoča preživetje v okoljih, kjer je voda na voljo periodično, s prekinitvami. Preučevali so ga na družini Cassulaceae, ki vključuje predvsem sukulente, prisoten pa je tudi v družinah Cactaceae (kaktusi), Crassulaceae, Euphorbiaceae, Aizoaceae, Liliaceae, Agavaceae in Orchidaceae. Znano je, da je 50 % CAM rastlin epifitov,

široka taksonomska in ekološka distribucija pa kaže na to, da se je, tako kot C4 fotosinteza, CAM v posameznih vrstah razvil neodvisno z evolucijo (Leegood, 1993b).

Rastline s CAM imajo to sposobnost, da ponoči fiksirajo velike količine CO_2 v organske molekule, kot je malat. Med dnevom se te zaloge organskih molekul postopoma dekarboksilirajo in so interni vir CO_2 za potek Calvinovega cikla. CAM cikel tako rastlinam omogoči preživetje v zelo suhih okoljih, saj lahko ponoči, ko je zrak hladnejši in izparevanje vode majhno, odprejo listne reže, si naredijo zaloge CO_2 in tako izgubijo bistveno manj vode, kot bi jo, če bi imele listne reže odprte podnevi.

Odpiranje in zapiranje listnih rež je regulirano s pH, saj se ta s porabo malata zviša, kar inducira odprtje listnih rež in vstop CO_2 (Hall in Rao, 1999).



Slika 3: CAM cikel (Vodnik, 2012: 69)

2.5.3.1.4 Pomen Calvinovega cikla

Gliceraldehid-3-fosfat, produkt Calvinovega cikla, se lahko uporabi v različnih nadaljnjih reakcijah, ki tvorijo različne molekule:

- škrob: trioza fosfat se pogosto skladišči v obliki škroba. Začasno se lahko shranjuje v kloroplastih, večina pa se ga skladišči v koreninah in deblu. Škrob se lahko po potrebi razgradi in tako rastlina dobi sladkorje, ko jih potrebuje;

- saharozo in druge sladkorje. Trioza fosfat se lahko po nastanku transportira v citosol, kjer iz njega nastanejo sladkorji, predvsem saharosa. Saharoza se najpogosteje transportira v druge dele rastline, kot so sadeži, novi listi in korenine, kjer je lahko takojšen vir energije, se shranjuje v vakuolah ali pa se pretvorí v škrob;
- aminokisline: manjša količina trioze fosfata se porabi za sintezo aminokislin v kloroplastu;
- sekundarne metabolite.

2.6 ANTIOKSIDANTI

Antioksidanti so spojine, ki preprečujejo oksidacijo snovi. Oksidacija je verižna reakcija, ki jo povzročajo oksidanti in radikali, vendar pa moramo vedeti, da vsi radikali niso oksidanti in vsi oksidanti niso radikali (Pryor, 1994).

Kako preprečujejo oksidacijo, je odvisno od vrste antioksidanta - lahko so encimski ali neencimski, topni v vodi ali topni v maščobah (Briviba in Sies, 1994).

Antioksidacijski sistem varuje živilo na eni strani in organizem na drugi strani pred učinki prostih radikalov. Antioksidante lahko razdelimo v tri skupine (Gutteridge in Halliwell, 1994):

- **Primarni antioksidanti** nastajajo v organizmu ali jih tvorijo mikroorganizmi, to so predvsem encimi, superoksid dismutaza, glutation peroksidaza, ceruloplazmin. Njihova vloga je preprečevanje tvorbe prostih radikalov. Te snovi lahko reaktivne radikale spremenijo v bolj stabilne produkte in s tem prekinejo verižno reakcijo oksidacije.

Sem uvrščamo:

- a) fenole: galati, hidrokinoni
 - b) derivate fenolov: butil-hidroksi-anisol, butil-hidroksi-toluol, guajak gume, t-butilhidrokinon, tokoferoli
 - c) različne primarne antioksidante: etoksikvin, anoxomer, trolox-C (Madhavi in sod., 1996).
- **Sekundarni antioksidanti** so snovi, ki zavirajo avtooksidacijo ne da bi se neposredno vključevali v verižno reakcijo. Njihova značilnost je, da reagirajo s kovinskimi ioni, ki so katalizatorji oksidacije, odvzemajo kisik iz medija, razgrajujojo hidroperokside do komponent, ki niso radikali, absorbirajo UV svetlobo in nenazadnje deaktivirajo aktivni kisik. Razdelimo jih na:
 - a) Odjemalci kisika reagirajo neposredno s kisikom in ga odstranijo iz reakcije. Pri tem oksidirajo (Madhavi in sod., 1996). Najpogostejši so: askorbinska kislina, askorbil palmitat, encimi (ksantin

oksidaza, superoksid dismutaza, katalaza), flavonoidi, izolerianska kislina, karotenoidi, polifenoli, sulfiti.

- b) Odjemalci radikalov preprečujejo tvorbo hidroperoksidov in preprečujejo prostim radikalom reagiranje pri verižnih reakcijah (Madhavi in sod., 1996). Najpogostejsi so: flavonoidi, polifenoli, karotenoidi, tokoferoli.
 - c) Sinergisti niso antioksidanti, vendar imajo učinek v reakcijah, ki preprečujejo oksidacijo. Glavni princip delovanja je ta, da elektronski par v strukturi sinergista pospešuje tvorbo kelatov, s čimer se tvorijo stabilni kompleksi s kovinskimi ioni, kot sta železo in baker (Madhavi in sod., 1996).
- **Terciarni antioksidanti** so snovi, ki popravljajo poškodbe, ki jih povzročajo prosti radikali v strukturi celice (encimi, ki "popravljajo" poškodbe DNA; metionin sulfoksid reduktaza).

2.6.1 Pomen antioksidantov v sadju in zelenjadi

Sadje in zelenjava sta bogat vir naravnih antioksidantov. V rastlinah najdemo veliko različnih, ki se s svojimi različnimi načini delovanja dopolnjujejo. Najpomembnejši rastlinski antioksidanti so vitamin C, vitamin E, karotenoidi, flavonoidi, katehini in terpeni. V te skupine uvrščamo nekaj tisoč aktivnih snovi, ki z različnimi mehanizmi delovanja prispevajo k skupnemu antioksidativnemu potencialu živila. Velika vsebnost antioksidantov v rastlinah je osnovni pogoj za dobro skladiščno stabilnost in primerno kakovost surovine za nadaljnjo predelavo. Vsebnost antioksidantov predstavlja osnovni parameter kakovosti in vpliva na (Hribar in Simčič, 2000):

- skladiščno sposobnost in stabilnost izdelka,
- ohranjanje prehranske vrednosti,
- ohranjanje senzorične kakovosti,
- primeren videz in obstojnost barve živila,
- kakovost vhodne surovine - povečan potencial za predelavo živil,
- ohranjanje učinkovin, ki pozitivno vplivajo na zdravje ljudi.

Ljudje med običajno presnovo tvorimo znatne količine prostih radikalov, izpostavljenost vsakdanjim dejavnikom, kot so stres, nekatere kemikalije, alkohol, sevanje, kajenje, težke kovine, izpušni plini ter prekajena in zapečena hrana, pa njihovo tvorbo bistveno poveča. Naše telo proste radikale izniči z antioksidanti, ki so lahko endogeni ali eksogeni. Težko jih je razvrstiti v dve skupini, ker moramo s hrano dobiti tudi nekatere elemente, ki so endogeni antioksidanti, npr. selen. Ljudje smo vsejedi, vendar smo zaradi naše evolucijske poti odvisni od antioksidativnih snovi rastlinskega izvora. Najbolj znan primer te odvisnosti je odvisnost od eksogene askorbinske kisline. Znano je, da eksogeni antioksidanti, ki jih zaužijemo s hrano, ščitijo pred boleznimi srca in ozilja, nastankom raka in drugimi boleznimi, povezanimi z oksidativnim stresom v organizmu (Kreft in sod., 2000).

2.6.2 Fenoli

Fenoli so spojine, v katerih je -OH skupina pripeta neposredno na aromatski obroč. Najenostavnejši primer molekule iz te skupine pa je kar fenol (C_6H_5OH). Kisikov atom je sp^3 hibridiziran, ogljikov atom, ki je del aromatskega obroča, pa je sp^2 hibridiziran (Oxtoby in sod., 2008).

Fenolne spojine so zelo razširjene v rastlinskem kraljestvu, saj jih poznamo več kot 8000. Glede na njihovo strukturo jih delimo na enostavne fenole, fenolne kisline, derivate hidroksicimetne kisline in flavonoide. V rastlinah rodu *Brassica* so najpogosteji flavonoidi (predvsem flavonoli) in hidroksicimetne kisline (Cartea in sod., 2011). Pozitivni učinki rastlin rodu *Brassica* na izboljšanje zdravja so v veliki meri bili pripisani njihovi kompleksni mešanici fitokemikalij z antioksidativnimi lastnostmi. Med temi so ravno fenoli ena izmed najpomembnejših skupin (Jahangir in sod., 2009).

Fenolne spojine so kemično reaktivne snovi. So kisle in, če ni steričnih ovir, rade tvorijo tako intra- kot intermolekularne H-vezi. Tako se povežejo s peptidnimi vezmi v beljakovinah in kadar je to encim, ga tudi inaktivirajo. Naslednja pomembna lastnost fenolnih spojin, posebno tistih, ki imajo na B obroču dve -OH skupini v položaju orto, je tudi sposobnost vezave kovinskih ionov v kelatne spojine. Fenolne spojine tudi zelo rade oksidirajo. V rastlinah so posebni encimi fenolaze, ki katalizirajo oksidacijo monofenolov v difenole in naprej v *o*-kinone. Slednji se nato polimerizirajo vobarvane produkte flobacene. Običajno je taka polimerizacija nezaželena, ker se lahko pojavit neprimerna barva in vonj ter zmanjšanje hranične vrednosti živil (Abram in Simčič, 1997).

V rastlinah fenoli prispevajo k odpornosti rastlin proti mehanskim stresom, ki so posledica prisotnosti insektov ali mehanskih poškodb, infekcij z glivami, bakterijami in virusi. Obrambni mehanizem verjetno vključuje sodelovanje fenolnih spojin pri lignifikaciji celične stene okrog poškodovanega dela ali pri zaščiti rastline z germinacijo spor ali pri obojem (Abram in Simčič, 1997). Omeniti je potrebno tudi, da imajo fenolne spojine v prehrani veliko vlogo tudi, ker sadju in zelenjavi dajejo okus in barvo.

2.6.2.1 Flavonoidi

So polifenolne spojine sestavljene iz petnjstih ogljikovih atomov z dvema aromatskima obročema, ki sta povezana z mostom iz treh ogljikovih atomov. So najštevilčnejši izmed vseh fenolov in jih najdemo v celiem rastlinskem kraljestvu. Glavni flavonoli v rastlinah rodu *Brassica* so kvercetin, kamferol in izoramnetin (Cartea in sod., 2011).

Flavonoidi so antioksidanti, ki lahko preprečijo peroksidacijo lipidov na več načinov (Briviba in Sies, 1994):

- z lovljenjem radikalov,
- z vezavo kovinskih ionov,
- z lovljenjem lipidnih peroksilnih radikalov,
- z inhibicijo encimskih sistemov, ki katalizirajo nastanek prostih radikalov.

2.6.2.2 Hidroksicimetne kisline

V rastlinah je obilje hidroksicimetnih kislin, ki imajo pomembno vlogo tako v strukturnih kot v kemičnih obrambnih strategijah. Najdemo jih v prostih oblikah in v polimerih celičnih sten. V rastlinah rodu *Brassica* so najštevilčnejše p-kumarna, sinapinska in ferulna kislina, pogosto so povezane s sladkorjem ali kakšno drugo hidroksicimetno kislino (Cartea in sod., 2011).

2.7 STABILNI IZOTOPI, PORAZDELITEV V NARAVI IN MOŽNOST FRAKCIJONACIJE

Izotopi so oblike kemijskega elementa, ki imajo enako vrstno število (število protonov) in enake kemijske lastnosti, vendar različno atomsko maso kot rezultat različnega števila nevtronov v jedru (Lawrence, 2005).

Stabilni izotopi so tisti, ki s časom ne razpadajo v radioaktivnih procesih, večino elementov pa zastopa več kot en stabilen izotop. Vodik poznamo v obliki dveh stabilnih izotopov, ^1H in ^2H (devterij), ogljik obstaja kot dva različna izotopa, ^{12}C in ^{13}C , dušik v naravi najdemo v stabilnih oblikah ^{14}N in ^{15}N , kisik zastopajo trije stabilni izotopi, ^{16}O , ^{17}O in ^{18}O itd (Ghidini in sod., 2006). Naravni kemijski elementi so po navadi zmesi več izotopov (Kuščer in Moljk, 1960), atomske mase, ki so navedene v periodnem sistemu, so povprečne vrednosti mas izotopov v naravi. V večini primerov v naravi prevladuje tisti stabilni izotop elementa, ki ima manjšo atomsko maso. Za razliko od stabilnih izotopov imajo radioaktivni izotopi omejene življenske dobe in s časom razpadajo ter tvorijo drug element. Časi, potrebeni za ta razpad so za različne radioaktivne izotope zelo različni in se gibljejo med delci sekunde in tisočletji. Kot primer lahko omenimo radioaktivni izotop ogljika ^{14}C , ki se pogosto uporablja za oceno starosti bioloških materialov in ima razpolovno dobo 5730 let (Ghidini in sod., 2006).

Preglednica 7: Stabilni izotopi ogljika in dušika ter njihove povprečne številčnosti (Ghidini in sod., 2006)

Stabilni izotopi ogljika	^{12}C	^{13}C
	98,89 %	1,11 %
Stabilni izotopi dušika	^{14}N	^{15}N
	99,64 %	0,36 %

Izotopsko sestavo živil podajamo kot vrednost δ , ki predstavlja relativno razliko med analiziranim vzorcem (vz) in izbranim standardom (st). Navadno jo izražamo v promilih.

$$\alpha_{vz-st} = \frac{R_{vz}}{R_{st}} \quad \dots (5)$$

Vrednosti R v enačbi predstavljajo razmerje med količino težjega (^{13}C , ^{15}N) in lažjega izotopa v vzorcu in standardu. Navadno je težjega izotopa bistveno manj, tako da gre za relativno majhne vrednosti.

Standarde, s katerimi primerjamo analizirane vzorce in na podlagi katerih izračunamo δ vrednosti našega vzorca, sta določila Mednarodna agencija za atomsko energijo na Dunaju in Nacionalni inštitut za standarde in tehnologijo iz ZDA.

Ko raziskujemo stabilne izotope ogljika, vzorec primerjamo proti standardu VPDB (Vienna Pee Dee Belamnite). Ta standard predstavlja morski fosil Belemnitelle Americana iz Južne Karoline v ZDA, ki ima večje razmerje med ^{13}C in ^{12}C od večine ostalih naravnih substanc. $R(st)=0,011237$ (Craig, 1957). Pri raziskavah stabilnih izotopov dušika se uporablja standard AIR, ki predstavlja razmerje med stabilnima izotopoma dušika v zemljini atmosferi. $R(st)=0,0036765$ (Coplein, 1996).

Če je v raziskovanem vzorcu več težjega izotopa kot v standardu, bo izračunana δ vrednost pozitivna, v nasprotnem primeru pa dobimo negativno δ vrednost.

Količina in razmerja stabilnih izotopov na zemlji so konstantna, vendar, ker imajo izotopi nekega elementa nekoliko različne fizikalne in kemijske lastnosti, v različnih procesih prihaja do njihove frakcionacije (Gat, 1980). V primernih pogojih lahko razlike med dvema izotopoma pridejo do izraza, razlog za to pa so lahko razlike v masah različnih izotopov (masno pogojeni frakcionacijski efekt) ali razlike v jedrnih interakcijah različnih izotopov, ki niso posledica razlike mas, temveč različne strukture jader (masno nepogojeni frakcionacijski efekt). Masno pogojeni frakcionacijski efekt je bolj izražen pri izotopih elementov z manjšim atomskim številom, ki so lažji, saj so relativne razlike v masah izotopov pri teh elementih večje (Kendall in Caldwell, 1998).

Izotopska frakcijacija je lahko posledica dveh pojavov - kinetičnega efekta ali termodinamskega efekta.

Kinetični efekt pride do izraza pri kemijskih reakcijah, kjer prihaja do cepitve vezi, saj so relativne energije vezi z različnimi izotopi različne. Po pravilu so vezi, ki jih tvori težji izotop nekega elementa, močnejše od tistih, ki jih tvori lažji izotop, kar pomeni, da bo v kinetiki kemijske reakcije lažji izotop favoriziran in bo pri enosmernih reakcijah na koncu v produktih zastopan v večji koncentraciji kot v reaktantih, reaktanti pa bodo obogateni s težjim izotopom. S tem razlagamo tudi frakcijacijo izotopov ^{12}C in ^{13}C , ki nastopi, ko se atmosferski CO_2 s pomočjo fotosinteze vključuje v organske molekule, ki je posledica frakcijacije med difuzijo v rastlino in frakcijacije pri fotosintetski fiksaciji ogljika. Vredno je poudariti, da to velja zgolj za enosmerne reakcije, produkti ravnotežnih reakcij so lahko lažji ali težji od reaktantov (Kendall in Caldwell; 1998, Farquhar in sod., 1989; Košir in sod., 2001).

Termodinamski efekt zajema redistribucijo izotopov elementa med različnimi vrstami spojin in predstavlja ravnotežje med kinetičnima efektoma ravnotežja. Do veljave pride, kadar imamo opravka s snovnim prenosom med dvema fazama in vpliva predvsem na fizikalne lastnosti, kot so parni tlak, tališče, vrelisčje, ipd. Snovni prenos, pri katerih se pokaže, so lahko izparevanje, difuzija, kristalizacija ipd. Ravnotesje deležev različnih izotopov, ki se vzpostavi kot posledica termodinamskega efekta, je odvisno predvsem od temperature, vendar nanj vplivajo tudi kemijska sestava, kristalna struktura in pritisk (Kendall in Caldwell, 1998; Farquhar in sod., 1989; Košir in sod., 2001).

Za izražanje razporeditve izotopskih frakcij med različnimi fazami uporabljam faktor izotopske frakcijacije, ki ga označujemo z α :

$$\alpha(AxB) = \frac{R(A)}{R(B)} \quad \dots (6)$$

R v enačbi je razmerje med težjim in lažjim izotopom v fazah A in B.

Vrednost α je po navadi zelo blizu 1,00 in od te vrednosti odstopa le za nekaj odstotkov. Velika izjema je le vodikov izotop H_2 , saj lahko pri ravnotesjih, kjer nastopa, vrednost α pri sobni temperaturi doseže tudi 4 (Friedman in O'Neil, 1977). Vrednost α lahko izračunamo tudi neposredno iz vrednosti δ , ki smo ju izmerili v dveh fazah:

$$\alpha(A - B) = \frac{1000 + \delta(A)}{1000 + \delta(B)} \quad \dots (7)$$

$\delta(A)$ in $\delta(B)$ sta izotopski sestavi faz A in B, ki predstavljata relativno razliko v izotopski sestavi med analiziranim vzorcem in standardom.

2.7.1 Vplivi na porazdelitev stabilnih izotopov

2.7.1.1 Izotopska frakcijacija ogljika med fotosintezo

Ko med procesi fotosinteze ogljik prehaja iz atmosferskega CO₂ v organski ogljik, prihaja do frakcijacije, ki jo lahko opišemo z naslednjim modelom (Fogel in Cifuentes, 1993):

$$\delta = A + \frac{C_n}{C_a} \frac{C_a}{B-A} \quad \dots (8)$$

δ predstavlja izotopsko frakcijacijo, A (−4,4 ‰) je izotopski efekt med difuzijo CO₂ v rastlino, B (−27 ‰) je izotopski efekt zaradi encimatske fiksacije ogljika, C_n/C_a pa je razmerje med notranjim in atmosferskim tlakom CO₂. Iz tega modela je razvidno, da je obseg frakcijacije zelo odvisen od razmerja med tlakom CO₂ v listih in tlakom CO₂ v atmosferi.

Ko je ogljikovega dioksida v izobilju in je to razmerje blizu vrednosti 1, frakcijacijo ogljika povzroča predvsem izotopski efekt, do katerega prihaja pri encimatski fiksaciji ogljika. Primarni encim, odgovoren za fiksacijo ogljika, je rubuloza 1,5-bifosfat karboksilaza oksigenaza, ki katalizira reakcijo med ribulolozo 1,5-bifosfatom in CO₂ v Calvinovem ciklu. Ta diskriminira težji izotop ¹³C, kar privede do frakcijacije v prid ¹²C. Vrednost encimatske izotopske frakcijacije je −27 ‰, kar pomeni, da lahko, ko je CO₂ v izobilju, dobimo zelo majhne δ¹³C vrednosti, tudi do −36 ‰ (Fogel in Cifuentes, 1993; Kendall in Caldwell, 1998).

Ko je količina CO₂ omejena in je razmerje C_n/C_a precej manjše od 1, pride do izraza izotopski efekt med difuzijo CO₂ v rastlino, kar privede do večjih δ¹³C vrednosti, med −20 in −30 ‰ (Kendall in Caldwell, 1998).

Pri C4 rastlinah zaradi drugačne poti fiksacije ogljika prihaja do drugačnih, večjih δ¹³C vrednosti. Encim fosfenolpiruvat karboksilaza, ki nastopa v prvem koraku fiksacije, ima izotopski efekt −2,2 ‰. Zaradi tega se vrednosti δ¹³C v C4 rastlinah gibljejo med −8 in −18 ‰ (Fogel in Cifuentes, 1993).

Na δ¹³C vrednost v rastlinah lahko po istem mehanizmu vpliva tudi količina vode, ki je na voljo rastlini. Če ta zraste v sušnih pogojih, ima bolj zaprte listne reže, kar bistveno zmanjša prevodnost listov za pline in zmanjša koncentracijo CO₂ v njih. Ob pomanjkanju vode pride tudi do upočasnitve karboksilacije, vendar je zmanjšanje prevodnosti listov bistveno večje, kar privede do padca koncentracije CO₂ in zvišanja δ¹³C v tkivih (Farquhar in sod., 1989; Scheidegger in sod., 2000).

2.7.1.2 Izotopska frakcionacija dušika

Dušik v naravi najdemo v obliki dveh stabilnih izotopov, ^{14}N in ^{15}N , kot standard za izračun $\delta^{15}\text{N}$ vrednosti pa se uporablja AIR, ki predstavlja razmerje med stabilnima izotopoma dušika v zemljini atmosferi. To je mogoče, ker se razmerje med ^{15}N in ^{14}N v atmosferi ne spreminja, je konstantno ($R(st)=0,0036765$).

Vse dušikove spojine vsebujejo oba izotopa, vendar v različnih razmerjih, kar je posledica frakcionacije. Med procesom fiksacije atmosferskega dušika, ki jo izvajajo mikroorganizmi ($\text{N}_2 \rightarrow \text{NH}_4^+$) ne opazimo izrazite frakcionacije, zato pa do frakcionacije v večji meri prihaja v vseh nadalnjih pretvorbah dušika. Stopnja frakcionacije je odvisna od narave teh reakcij (Ghidini in sod., 2006). Ko dušikove spojine potujejo po prehranjevalni verigi navzgor, se lažji izotop dušika v večji meri izloča z urinom, težji izotop pa se zaradi tega bolj zadržuje. Dušik v živalskih izločkih se hidrolizira do amonijaka in nato pretvori v nitrate. Pri tem prihaja do koncentracije težjega izotopa v nitratih. Organska gnojila povečajo nivo ^{15}N v prsti in posledično tudi v rastlinah, ki so zrasle na njej (Mariotti in sod., 1981). Bateman in sod. (2007) so na podlagi analiz ekološko in konvencionalno pridelane solate, paradižnika in korenja ugotovili, da parameter $\delta^{15}\text{N}$ lahko služi kot eden izmed indikatorjev pri ugotavljanju avtentičnosti ekološko pridelane zelenjave, vendar je potrebno analizirati večje število vzorcev in rezultate statistično obdelati.

2.7.2 Analize stabilnih izotopov z metodo IRMS

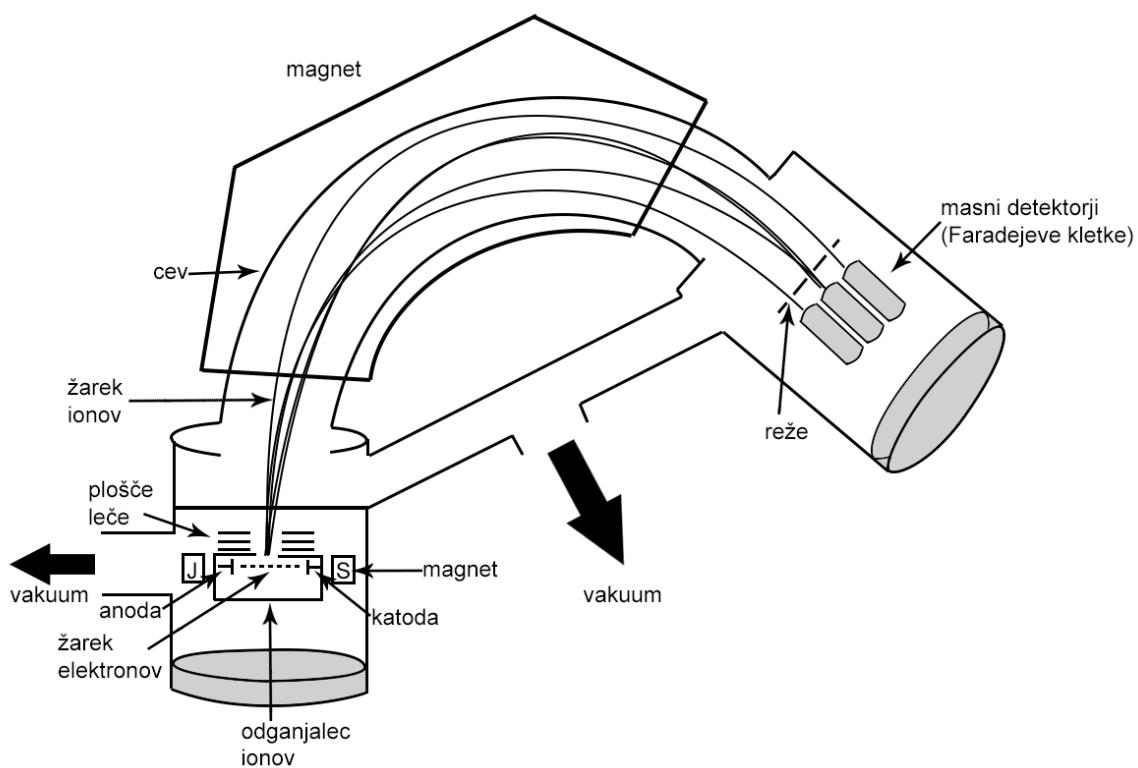
Izotopsko sestavo elementov merimo z masnim spektrometrom za analitiko stabilnih izotopov, IRMS (Isotope Ratio Mass Spectrometer).

Masni spektrometer nabite atome in molekule loči na podlagi njihovega razmerja med maso in nabojem (m/z). m/z je pogost zapis, ki se uporablja za definiranje brezdimenzijske vrednosti, ki jo dobimo, če masno število (m) iona zdelimo z njegovim celotnim nabojem (z). Masno število je vsota števila protonov in nevronov v atomu, molekuli ali ionu.

IRMS naprava številčnost delcev, ki jih analiziramo, določi tako, da jih najprej ionizira, potem pa pospeši skozi magnetno polje, kjer se ti delci zaradi svojega naboja odklonijo. Ker imajo različni delci različno maso in različen nabolj, pride do razlik v odklonu – različni delci potujejo po različnih poteh in pristanejo na različnih delih detektorja. Relativna številčnost delcev je določena z merjenjem električnih tokov, ki jih ustvarijo posamezni, prostorsko ločeni žarki enakih ionov. Detektor je sestavljen iz mnogih Faraday-evih kletk. Ionski žarek se zaleti v notranje stene ene izmed njih in tako na znanem mestu ustvari električni tok. Ker Faraday-eva kletka prepreči vse sekundarne emisije iona, dobimo natančno meritev naboja, ki se ojača in pretvori v digitalen signal, ki ga prejme osebni računalnik. Pred detektor je postavljena plošča z režami, ki so širše od posameznih žarkov elektronov, kar naredi masni detektor manj občutljiv na premike, ki so lahko posledica sprememb geometrije cevi in

električnih elementov zaradi nihanja temperature. Tako za rezultat dobimo tipične vrhove s ploskim vrhom (Kelly, 2003).

Poznamo IRMS s kontinuirnim pretokom in IRMS z dvojnim uvajalnim sistemom nosilnega plina. IRMS z dvojnim uvajalnim sistemom nam omogoča simultano analizo in primerjavo vzorca in standarda. Spektrometer s kontinuirnim pretokom omogoča analizo večjega števila vzorcev, katerih priprava je preprostejša, prednost IRMS z dvojnim uvajalnim sistemom pa je večja natančnost (Epstein in Mayeda, 1953).



Slika 4: Princip delovanja IRMS (Kelly, 2003: 163)

3 MATERIALI IN METODE DELA

3.1 VZOREC

Poskus je potekal med 4. aprilom 2011 in 1. julijem 2011. V 54 loncev smo natehtali po šest kg zemlje, ki najmanj pet let pred tem ni bila gnojena. Pred tem smo jo presejali, jo posušili in ji dodali gnojila. Ker smo preizkušali pet različnih gnojil, smo zemljo s posameznim gnojilom dodali v devet loncev, kar predstavlja tri vzorce s tremi paralelkami. V preostalih devet loncev smo dali zemljo brez gnojila, služila je za vzgojo kontrolnih vzorcev.

3.1.1 Opis gnojil

3.1.1.1 Plantella Organik (v nadaljevanju Organik)

Kot že ime pove, gre za organsko gnojilo, ki vsebuje hranila NPK v organski obliki. Primerno je za pripravo tal in za dognojevanje vseh vrst rastlin. Proizvajalec navaja aktivno delovanje v obdobju več kot 6 mesecev ter zboljšanje zračnosti in sposobnosti tal za zadrževanje vode. Je v obliki mikropelet, ima visok delež suhe snovi in je termično obdelano za preprečitev vnosa plevelov in bolezni. Razmerje NPK v njem je 3:3:2. Podatke smo dobili na etiketi in spletni strani proizvajalca.

3.1.1.2 Fertildung Stallatico umificato pelletato (v nadaljevanju Stallatico)

Je organsko gnojilo z NPK razmerjem 3:3:3 in je sestavljen iz aktivnega hlevskega gnoja perutnine in goveda, ki je bil podvržen počasnemu procesu naravnega zorenja (9 mesecev), kar zagotavlja visok delež humifikacije. Sušeno je bilo naravno, brez uporabe topote, kar zagotavlja bogato mikrofloro. Podatke smo dobili na embalaži in v brošuri proizvajalca.

3.1.1.3 ENTEC perfect (v nadaljevanju ENTEC)

ENTEC perfect je mineralno gnojilo z NPK razmerjem 14:7:17 (+2Mg + 11S), ki je primerno za vse vrste kultur. Od konvencionalnih mineralnih gnojil se razlikuje po dodatku stabilizatorja amonijske oblike dušika imenovanega ENTEC, ki zavira delovanje nitritifikacijskih bakterij in omogoča postopen prehod amonijske oblike dušika v nitratno. Uporabljam ga zgodaj spomladi, ko je na razpolago še dovolj talne vlage v enem obroku. Podatke smo dobili na embalaži in v brošuri proizvajalca.

3.1.1.4 Kristalon modri (v nadaljevanju WSF) (Yara, Norveška)

Je popolnoma vodotopno gnojilo (WSF – water soluble fertiliser) z NPK razmerjem 19:6:20 (+3MG +3S), namenjeno rastlinam v vegetativni fazи. Stimulira razvoj listov. Podatke smo dobili v brošuri proizvajalca.

3.1.1.5 Kombinacija gnojenja z organskim in mineralnim gnojilom (v nadaljevanju Org + M)

Za kombinirano gnojenje smo uporabili organsko gnojilo Plantella Organik, opisano pod točko 3.1.1.1 in mineralno gnojilo Kristalon modri, opisano pod točko 3.1.1.4.

3.1.2 Postavitev preskusa

54 loncev smo razdelili v šest skupin po devet loncev, tako da smo za vsak tip gnojenja lahko posadili 3 rastline v treh ponovitvah. Gnojila Organik, Stallatico in ENTEC smo pred uporabo zmleli v prah. V vsakega izmed loncev smo dodali šest kg razmeroma suhe, presejane zemlje, v katero je bila dobro vmešana zatehta gnojila, le zemlji, namenjeni kontrolnim vzorcem, nismo dodali ničesar. Potrebno količino vsakega izmed tipov gnojil smo izračunali glede na podatke v Smernicah za strokovno utemeljeno gnojenje (Mihelič in sod, 2010), ki navajajo, da je odvzem na 30 ton pridelka kolerabice 160 kg/ha N, 45 kg/ha P₂O₅ in 180 kg/ha K₂O. Ker se razmerja hranil v izbranih gnojilih niso ujemala s temi podatki, smo, da bi se prilagodili sestavi gnojil, normo za P₂O₅ povišali na 80 kg/ha. Gnojilni odmerek, preračunan na kg zemlje v loncih, je tako znašal 80 mg N, 40 mg P₂O₅ in 90 mg K₂O. Količino posameznega tipa gnojila, ki je bila potrebna za vzgojo rastlin, smo preračunali glede na njegovo vsebnost K₂O, ki je bil, glede na zastavljen gnojilni odmerek, limitirajoče hranilo v izbranih gnojilih.

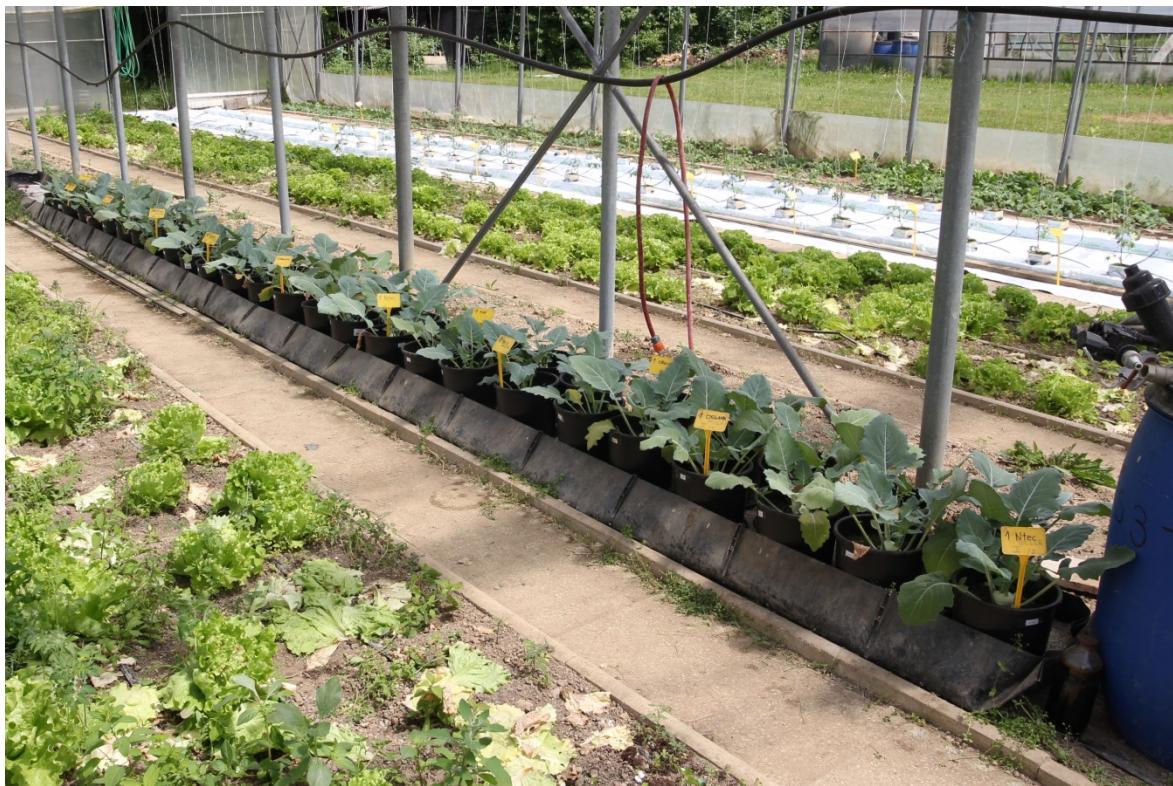
Točne zatehte posameznih gnojil so bile naslednje:

- Organik: 4,5 g/(kg zemlje) → 27,0 g/(6 kg zemlje v loncu)
- Stallatico: 3 g/(kg zemlje) → 18 g/(6 kg zemlje v loncu)
- ENTEC: 0,53 g/(kg zemlje) → 3,2 g/(6 kg zemlje v loncu)
- WSF: v zemljo, namenjeno WSF vzorcem, nismo dodali ničesar
- Stallatico + WSF: Ker gre za gnojenje s kombinacijo organskega in mineralnega vodotopnega gnojila, smo v vsak lonec najprej dodali količino organskega gnojila Stallatico, ki je zadoščala za prvo tretjino rastne dobe vzorcev kolerabice, kar znaša 1 g/(kg zemlje) → 6 g/(6 kg zemlje v loncu).
- Kontrola: v zemljo, namenjeno kontrolnim vzorcem, nismo dodali ničesar.

Po pripravi loncev z zemljo in gnojili smo vanje posadili sadike kolerabice in jih postavili v rastlinjak. Lonce smo v rastlinjaku razvrstili tako, da so bile ponovitve rastlin (skupine treh

rastlin), gnojenih na enak način, med seboj enakomerno oddaljene v smeri jug – sever. Zalivali smo jih dvakrat do trikrat tedensko s količinami od 0,5 do 1,5 L vode na rastlino. Prve tedne smo jih zalivali dvakrat tedensko s po 0,5 L vode, s časom pa smo zaradi naraščajoče potrebe rastlin po vodi zaradi njihove rasti in podnebnih razmer (naraščanje temperatur in padanje relativne vlažnosti), morali povečati količine vode in pogostost zalivanja.

Rastline smo zalivali z vodovodno vodo. V obravnavanju WSF smo ob vsakem zalivanju 0,5 L vode zamenjali z 0,5 L vodne raztopine gnojila. Izračunali smo, da rastline potrebujejo 0,45 g/(kg zemlje) WSF gnojila, kar znaša 2,7 g/(6 kg zemlje v loncu). Ker gre v tem primeru za vodotopno gnojilo, ki se ga dodaja v vodo za fertigacijo, smo pripravili vodno raztopino s koncentracijo gnojila 0,27 g/L, ki nam je omogočila, da bi rastline v svoji rastni dobi z 20 fertigiranj po 0,5 litra te raztopine prejele primerno količino gnojila. Ker so rastline bile tehnikoško zrele v krajšem času, kot smo predvidevali, smo te rastline do spravitve z gnojilom zalili le 16-krat.



Slika 5: Rastline kolerabice v steklenjaku na dan 16.5.2011.

Po 28 dneh smo tudi v obravnavi Stallatico + WSF začeli z dohranjevanjem rastlin z vodno raztopino gnojila WSF z 0,5 L vodne raztopine gnojila s koncentracijo 0,27 g/L dvakrat tedensko. Do spravila so prejele 9 fertigacij po 0,5 L raztopine WSF gnojila.

Na ponedeljek 11. aprila smo opazili, da so polži pojedli večji del dveh izmed sadik iz obravnave WSF, zato smo jih zamenjali z rezervnimi sadikami ter v vse lonce dodali limacid Mesurol granulat, ki vsebuje metiokarb.

Z izjemo težav s polži je poskus potekal brez težav in 1. junija smo se odločili za spravilo pridelka, saj so rastline dosegle primerno velikost in zrelost. Rastline smo čez noč spravili v hladilnico in naslednji dan začeli s pripravo vzorcev za kemijске analize.

Metode dela:

- Analiza vsebnosti nitritnega in nitratnega dušika ter amonijevega dušika (HPLC)
- Določanje antioksidativnega potenciala (metoda DPPH)
- Določanje vsebnosti skupnih fenolov (metoda Folin-Ciocalteu)
- Določanje $\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{15}\text{N}$ vrednosti v kolerabici z masno spektrometrijo (IRMS)
- Določanje $\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{15}\text{N}$ vrednosti v gnojilih in zemlji z masno spektrometrijo (IRMS)

3.2 PREDPRIPRAVA VZORCEV ZA ANALIZE

Iz vsake rastline smo v prvi fazi pripravili vzorce gomoljev in listov, ki smo jih zamrznili in jih uporabili v vseh poznejših analizah. Vsaki izmed rastlin smo prešteli število listov, jo stehtali, ter izmerili višino in premer gomolja. Vzorec gomolja smo pripravili tako, da smo vsak gomolj najprej razrezali na osmine, nato pa odrezali primerljiva režnja tkiva iz dveh nasprotnih koncov gomolja, tako da sta bila reprezentativna in skupaj tehtala približno 30 g, kar je zadoščalo za izvedbo vseh načrtovanih analiz. Režnja smo nato s kuhinjskim nožem narezali na tanke rezine, jih dali v terilnico, prelili s tekočim dušikom, počakali da zamrznejo in jih strli v zelo majhne delce. Zamrznjene smo dali v označene plastične vrečke, ter jih shranili v zamrzovalno omaro.



Slika 6: Tanke rezine gomolja kolerabice v terilnici, prelite s tekočim dušikom.

Za pripravo vzorcev iz listov smo uporabili manjše liste, ki izraščajo iz zgornjega dela odebelenega kolerabičinega steba. Liste smo narezali na majhne koščke, jih spravili v označene plastične vrečke in zamrznili.

3.3 ANALIZA VSEBNOSTI NITRITNEGA IN NITRATNEGA DUŠIKA TER AMONIJEVEGA DUŠIKA

Princip:

Vsebnost nitritnega in nitratnega dušika ter amonijevega dušika smo določali s kolorimetrično metodo na vodnih ekstraktih listov in gomoljev kolerabice s pomočjo naprave Technicon Autoanalyser II.

Reagenti in naprave:

- IKA Ultra-Turax
- Centrifugirke (20 mL)
- Steklene čaše (100 mL)
- Vodna kopel z gretjem
- Carrez 1 in Carrez 2 reagenta
- Filter papir (premer por 100-125 µm)
- Merline bučke (100 mL)
- Technicon Autoanalyser II

Izvedba analize:

Analizo smo izvedli tako na vzorcih listov kot na vzorcih odebelenega steba. Za izbrano metodo smo potrebovali 5 g zmletega vzorca. Predpripravljeni vzorci odebelenega steba so bili že strti v prah in bili primerni za analizo, tako da smo jih le zatehtali v 100 mL steklene čaše. Vzorce listov smo ob dodatku 5 mL destilirane vode v 20 mL centrifugirkah zmleli z napravo Ultra-Turax in raztopino kvantitativno prenesli v 100 mL steklene čaše.

V čaše z vzorci smo dodali približno 60 mL 2x destilirane vode, segrete na 70 °C, in jih za 15 min inkubirali v vodni kopeli pri 70 °C. Po tem smo počakali, da se je vsebina bučk ohladila na sobno temperaturo, jo kvantitativno prenesli v 100 mL merilne bučke in z 2x destilirano vodo dopolnili do oznake. Vzorce listov so tako bili pripravljeni na končno analizo, vzorce odebelenega steba pa smo zaradi motnosti morali še tretirati z reagentoma Carrez 1 in Carrez 2 in prefiltrirati skozi filter papir (R-Biopharm AG, 2013). Tako pripravljene zamrznjene vzorce smo v 20 mL centrifugirkah poslali na analizo na Oddelek za biologijo, kjer so jih odtalili ter vsebnost nitritnega in nitratnega dušika in analizirali po metodi G-016-91.

Metoda G-016-91 temelji na redukciji nitrata s hidrazinijevim sulfatom do nitrita, nitrit pa se določi fotometrično. Aminske skupine sulfonilamida se namreč v kislem okolju v prisotnosti nitritnih ionov diazotirajo. Tako nastane diazonijeva sol, ki se veže na N-naftiletilen diamin diklorid. Pri tem nastane rdeča azo-barva, intenziteto katere izmeri aparat Technicon Autoanalyser II, ki deluje na principu CFA (continuous flow analysis) in tako določi skupno koncentracijo nitritnega in nitratnega dušika v vzorcu. Kolorimetrična meritev poteka pri valovni dolžini 520 nm (Kmecl in sod., 2005).

Amonijev dušik so prav tako določili na aparatu Technicon Autoanalyser II in sicer po metodi IPB (indophenol-blue method) z reagenti: trinatrijev citrat, natrijev salicilat, natrijev nitroprusid, dikloroizocianurna kislina, Triton X-100 in natrijev hidroksid. Iz dikloroizocianurne kisline nastane hipoklorit, ki reagira z amonijakom. Produkt te reakcije je monokloramin, ki po reakciji s salicilatom tvori indofenol (Aminot in sod., 1997). Ta je modre barve, ki spominja na indigo modro. Njegovo koncentracijo ugotovimo z meritvijo absorbance pri valovni dolžini 640 nm.

3.4 DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNEGA POTENCIALA

Princip:

Antioksidativni potencial merimo z uporabo prostega radikala DPPH, ki je temno vijolične barve in svetlobo najbolj absorbira pri valovni dolžini 517 nm. V reakciji z antioksidanti DPPH razpade, s čimer se absorbanca pri 517 nm zniža proporcionalno z vsebnostjo antioksidantov v vzorcu.

Reagenti in naprave:

- DPPH ozziroma 2,2-difenil-1-pikril-hidrazil (Sigma, Nemčija)
- Metanol (Merck, Nemčija)
- UV-VIS spektrofotometer (Shimadzu, UV-160A)

Raztopino DPPH smo pripravili tako, da smo v 100 mL bučko zatehtali 4 mg DPPH v trdni obliku, ter dodali 20 mL metanola. V raztopino smo nato dodali metanol in jo z njim redčili, dokler ji absorbanca pri 517 nm ni padla na vrednost 1. Pripravljena raztopina ni stabilna, zato smo morali pred vsako analizo pripraviti svežo.

Izvedba analize:

Vzorce smo za analizo antioksidativnega potenciala pripravili tako, da smo v centrifugirke zatehtali 5 g zdrobljenega in zamrznjenega vzorca odebelenega steba kolerabice in ga prelili z 10 g raztopine metafosforne kisline. Tako pripravljene vzorce smo zamrznili, na dan analize pa jih odmrznili in centrifugirali 5 minut pri 3000 obratih na minuto. Supernatant smo nato prelili v 3 ependorfke in ga centrifugirali še 5 minut pri 14000 obratih na minuto.

Tako smo iz vsakega vzorca dobili tri paralelke. V končni fazi smo iz vsake ependorfke odpipetirali 30 µL raztopine in jo v čisti ependorfski zmešali z 1,5 mL raztopine DPPH. Vzorec smo nato prelili v kiveto ter mu po 15 minutah izmerili absorbanco pri 517 nm.

Poleg tega smo za izračun antioksidativnega potenciala morali izmeriti tudi referenčno vrednost in absorbanco slepe probe:

1. Referenčna vrednost: V ependorfski zmešamo 30 µL metanola in 1,5 mL raztopine DPPH
2. Slepa proba: V ependorfski zmešamo 30 µL vzorca in 1,5 mL metanola

Izračun:

$$\Delta A = A(\text{referenčna vrednost}) - A(\text{vzorca}) + A(\text{slepa proba}) \quad \dots (9)$$

$$n_{DPPH_2} (\text{mol}) = \frac{\Delta A}{\varepsilon_{DPPH} \left(\frac{L}{\text{mol} \cdot \text{cm}} \right) \cdot L(\text{cm})} \cdot V_{reak. zmesi} (\text{L}) \quad \dots (10)$$

$$AOP \left(\frac{\text{mmol}}{100\text{g}} \right) = \frac{n \cdot 1000(\text{mmol})}{V_{pipeta}(\text{mL}) \cdot \frac{m_{kolerabica}(\text{g})}{V_{kolerabica+metaf.k.}(\text{ml})}} \cdot 100 \quad \dots (11)$$

$$\varepsilon_{DPPH} = 12000 \frac{L}{\text{mol} \cdot \text{cm}} \quad \dots \text{molarna absorptivnost DPPH}$$

$$L = 1 \text{ cm} \quad \dots \text{dolžina poti žarka}$$

$$A \quad \dots \text{absorbanca}$$

3.5 DOLOČANJE VSEBNOSTI SKUPNIH FENOLOV PO SINGLETONU IN ROSSIJU

Princip:

Fenolne spojine absorbirajo predvsem svetlobo UV in vidnega spektra. To nam omogoča, da lahko z odčitavo absorbance pri primerni valovni dolžini ocenimo koncentracijo skupnih fenolov, skupnih antocianov, obarvanih antocianov, delež antocianinov v obarvani obliki, skupnih hidroksicimetnih kislin in ekvivalenta kavne kisline.

Za določanje skupnih fenolov v vzorcu vanj dodamo Folin-Ciocalteujev reagent, ki v alkalni raztopini oksidira fenolne snovi. Alkalne pogoje za potek oksidacije zagotovimo z dodatkom natrijevega karbonata. Folin-Ciocalteujev reagent je vodna raztopina natrijevega volframata (VI), natrijevega molibdata (VI) in litijevega sulfata (VI). Litijev sulfat (IV) prepreči, da bi se reagent obarjal, med tem ko sta volframat (IV) in molibdat (IV) spojini, ki oksidirata fenolne snovi v vzorcu. Redukcija teh dveh spojin poteče le v prisotnosti fenolatnega aniona. Raztopina, ki vsebuje reducirani oblici volframata (IV) in/ali

molibdata (IV), je modro obarvana, raztopina nereduciranih oblik pa je rumene barve. Absorbanco reakcijske mešanice merimo pri valovni dolžini 765 nm, masno koncentracijo skupnih fenolnih snovi pa odčitamo iz umeritvene krivulje in rezultat izrazimo kot mg galne kisline na liter. Galna kislina se uporabi kot standardna referenčna spojina za določanje skupnih fenolnih spojin (Košmerl in Kač, 2007).

Reagenti in naprave:

- Osnovna raztopina galne kisline: zatehtamo 7,8 mg galne kisline, dodano 50 mL absolutnega etanola in raztopimo. Nato odvzamemo 1 mL te raztopine, jo damo v 15 mL centrifugirko in ji dodamo 9 mL deionizirane vode.
- Folin-Ciocalteujev reagent (Merck, Nemčija) tik pred uporabo pripravimo po navodilih proizvajalca. Po navodilih, priloženih Merck-ovemu reagentu, ki smo ga uporabili, smo našega razredčili z deionizirano vodo v razmerju 1:2
- 20 % raztopina natrijevega karbonata
- Deionizirana voda
- UV-VIS spektrofotometer (Shimadzu, UV-160A)
- Kivete (10 mm)
- Merilne bučke (100 mL)
- Polnilne pipete (1 mL, 2 mL, 3 mL, 5 mL, 10 mL)
- Puhalka z deionizirano vodo

Umeritvena krivulja:

Umeritveno krivuljo za določanje skupnih fenolov smo naredili tako, da smo v 2 mL centrifugirke dodali različne volumne raztopine galne kisline ter vode. Za tem smo v vsako dodali 300 µL Folin-Ciocalteu reagenta in jih premešali, po 5 minutah pa je sledil še dodatek 300 µL 20 % raztopine natrijevega karbonata in ponovno mešanje. Po devetdesetih minutah smo izmerili absorbanco pri 765 nm, za slepi vzorec smo uporabili vodo (Košmerl in Kač, 2007).

Preglednica 8: Sestava reagentnih mešanic za umeritveno krivuljo.

Točka umeritvene krivulje	Raztopina galne kisline (µL)	Koncentracija galne kisline v reagentni mešanici (mg/L)	Deionizirana voda (µL)	Folin-Ciocalteu-jev reagent (µL)	20 % raztopina natrijevega karbonata (µL)
1.	0	0	1400	300	300
2.	100	0,73	1300	300	300
3.	200	1,46	1200	300	300
4.	300	2,19	1100	300	300
5.	400	2,92	1000	300	300
6.	500	3,65	900	300	300
7.	600	4,38	800	300	300
8.	700	5,11	700	300	300
9.	800	5,84	600	300	300

Enačba premice umeritvene krivulje:

$$y = kx + n \quad \dots 12$$

Izvedba analize:

Za analizo skupnih fenolov smo uporabili iste preparate vzorcev kot za analizo antioksidativnega potenciala (5 g vzorca v 10 g raztopine metafosforne kisline). Postopek smo izvedli podobno kot pri izdelavi umeritvene krivulje, le da smo v tem primeru namesto raztopine galne kisline uporabili preparat vzorca. V 2 mL centrifugirko smo najprej dodali po 50 μL preparata vzorca, 1350 μL deionizirane vode in 300 μL Folin-Ciocalteu-jevega reagenta, premešali in po 5 minutah dodali še 300 μL 20 % raztopine natrijevega karbonata ter spet premešali. Po devetdesetih minutah smo izmerili absorbanco pri 765 nm (Košmerl in Kač, 2007).

Izračun:

$$c_{g.k. \text{ reagentna m.}} \left(\frac{mg}{L} \right) = \frac{A+n}{k} \quad \dots 13$$

$$c_{g.k. \text{ vzorec}} \left(\frac{mg}{100g} \right) = \frac{c_{g.k. \text{ reagentna m.}} \left(\frac{mg}{L} \right) \cdot V_{\text{reagentne mešanice}} (\mu\text{L})}{V_{\text{preparata vzorca}} (\mu\text{L}) \cdot \frac{m_{\text{kolerabica}} (g)}{V_{\text{kolerabica+metaf.k.}} (L)}} \cdot 100 \quad \dots 14$$

$$c_{g.k.} \quad \dots \text{koncentracija galne kisline}$$

3.6 DOLOČANJE $\delta^{15}\text{N}$ VREDNOSTI Z MASNO SPEKTROMETRIJO

Princip:

Metoda temelji na merjenju razmerja med lažjim in težjim izotopom elementa in primerjavo le tega z mednarodnim standardom, kar pomeni, da se rezultat poda kot vrednost δ v ‰.

Reagenti in naprave

- Referenčni standardi IAEA-NBS (oil), IAEA-CH-7 in IAEA-CH-6
- Kositrove kapsule dimenzij 4/6 mm (PDZ Europa Ltd)
- Pinceta z zvito konico
- Masni spektrometer Europa Scientific 20-20 z ANCA-SL modulom za trdne in tekoče vzorce
- Sušilna omara

Izvedba analize:

To analizo smo izvedli tako na listih kot na vzorcih odebelenega steba, kar pomeni, da smo na koncu dobili dva rezultata za vsako rastlino. Vzorce smo pripravili tako, da smo majhne delce listov in zdrobljeno meso odebelenih stebel dali sušiti v sušilno omaro pri 50 °C do konstantne mase. Med manipulacijo vzorcev smo bili pazljivi, da se jih nismo dotikali z golimi rokami.

Posušene vzorce smo nato s pinceto vstavljeni v kositrove kapsule in sicer tako, da smo v vsako kapsulo zatehtali približno 2 mg posušenega vzorca in jo s pinceto dobro zaprli. Zaprte kapsule smo prenesli v kodirane tablice in jih poslali na analizo Inštitutu »Jozef Stefan« v Ljubljani.

3.7 DOLOČANJE $\delta^{13}\text{C}$ VREDNOSTI Z MASNO SPEKTROMETRIJO

Metoda temelji na merjenju razmerja med lažjim in težjim izotopom elementa in primerjavo tega z mednarodnim standardom, kar pomeni, da se rezultat poda kot vrednost δ v ‰.

Reagenti in naprave

- Referenčni standardi IAEA-N1, IAEA-N2
- Kositrove kapsule dimenzij 4/6 mm (PDZ Europa Ltd)
- Pinceta z zvito konico
- Masni spektrometer Europa Scientific 20-20 z ANCA-SL modulom za trdne in tekoče vzorce
- Sušilna omara

Izvedba analize:

To analizo smo izvedli tako na listih kot na vzorcih odebelenega steba, kar pomeni, da smo na koncu dobili dva rezultata za vsako rastlino. Vzorce smo pripravili tako, da smo majhne delce listov in zdrobljeno meso odebelenih stebel dali sušiti v sušilno omaro pri 50 °C do konstantne mase. Med manipulacijo vzorcev smo bili pazljivi, da se jih nismo dotikali z golimi rokami.

Posušene vzorce smo nato s pinceto vstavljeni v kositrove kapsule in sicer tako, da smo v vsako kapsulo zatehtali približno 2 mg posušenega vzorca in jo s pinceto dobro zaprli. Zaprte kapsule smo prenesli v kodirane tablice in jih poslali na analizo Inštitutu »Jozef Stefan« v Ljubljani.

3.8 DOLOČANJE $\delta^{13}\text{C}$ IN $\delta^{15}\text{N}$ VREDNOSTI V GNOJILIH Z MASNO SPEKTROMETRIJO

Metoda temelji na merjenju razmerja med lažjim in težjim izotopom elementa in primerjavo le tega z mednarodnim standardom, kar pomeni, da se rezultat poda kot vrednost δ v ‰.

Reagenti in naprave

- Referenčni standardi IAEA-N1, IAEA-N2
- Kositrove kapsule dimenzij 4/6 mm (PDZ Europa Ltd)
- Pinceta z zvito konico
- Masni spektrometer Europa Scientific 20-20 z ANCA-SL modulom za trdne in tekoče vzorce
- Sušilna omara

Izvedba analize:

Gnojila smo zmleli v fin prah, jih zapakirali v plastične vrečke in jih poslali na analizo Inštitutu »Jozef Stefan« v Ljubljani.

3.9 STATISTIČNA ANALIZA

Med poskusom zbrane podatke smo zbrali, obdelali in uredili s programom Microsoft Excel 2010. Nato smo jih obdelali z računalniškim programom SAS Software Version 8 s proceduro GLM – General Linear Models. Izračunali smo različne statistične parametre: povprečje, minimum, maksimum, standardni odklon ter koeficient variabilnosti.

4 REZULTATI

4.1 PRIMERJAVA POVPREČNIH VREDNOSTI REZULTATOV ANALIZ IN UGOTAVLJANJE RAZLIK MED RASTLINAMI

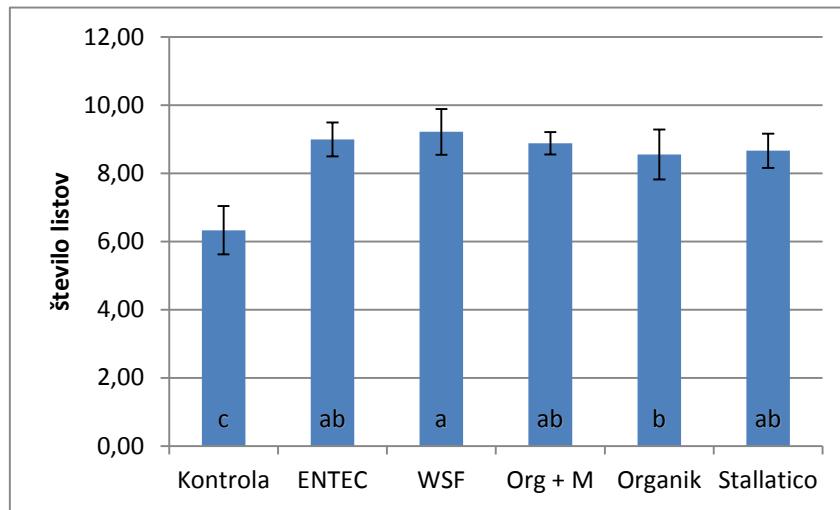
4.1.1 Rezultati meritev števila listov, mase rastline, mase gomolja, višine gomolja in širine gomolja

Preglednica 9: Povprečne vrednosti in standardni odkloni pri rastlinah kolerabice gnojene z različnimi gnojili za število listov, maso rastline, maso gomolja, višino gomolja in širino gomolja.

	Kontrola	ENTEC	WSF	Org + M	Organik	Stallatico
Št. listov	6,3±0,7 ^c	9,00±0,5 ^{ab}	9,2±0,7 ^a	8,9±0,3 ^{ab}	8,6±0,7 ^b	8,7±0,5 ^{ab}
Masa rastline (g)	53,8±8,5 ^d	293,4±18,5 ^a	201,6±50,1 ^b	167,3±21,5 ^c	293,7±18,0 ^a	184,2±9,4 ^{bc}
Masa gomolja (g)	40,9±7,2 ^d	246,4±17,5 ^a	168,3±45,9 ^b	140,0±20,5 ^c	248,0±10,5 ^a	152,1±11,0 ^{bc}
Višina gomolja (mm)	32,9±2,0 ^d	62,7±3,0 ^a	50,7±6,6 ^b	45,0±2,7 ^c	62,7±2,5 ^a	52,1±1,1 ^b
Širina gomolja (mm)	44,3±2,7 ^c	81,7±3,2 ^a	73,1±8,1 ^b	69,9±4,1 ^b	84,0±4,2 ^a	71,3±2,4 ^b

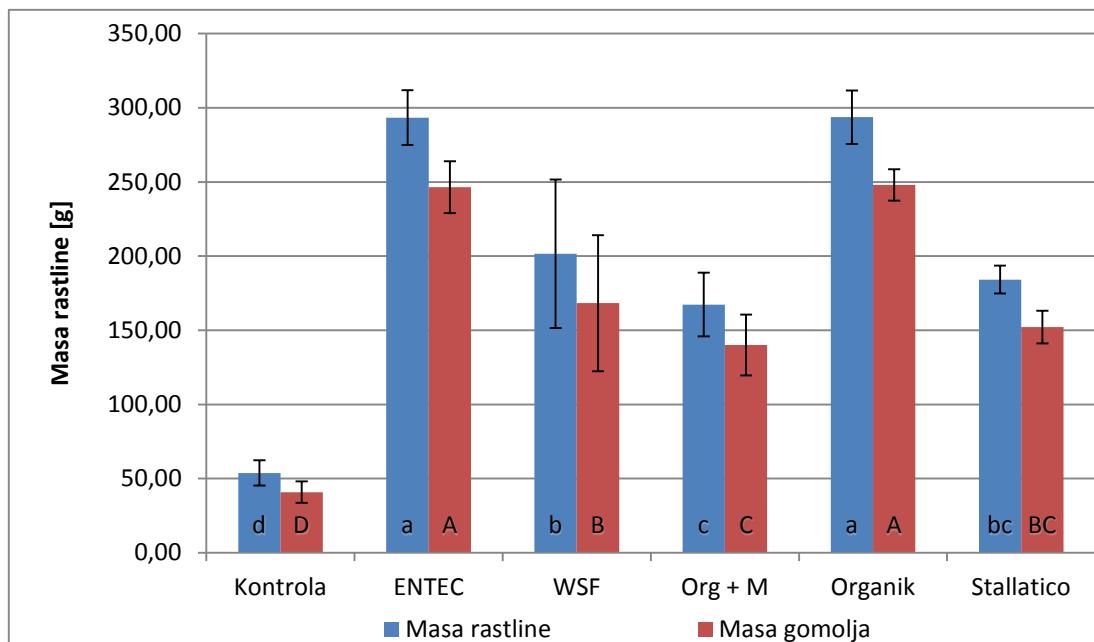
Skupine, ki se med seboj statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$) imajo v indeksu znotraj polja v preglednici različne črke (a, b, c, d).

Število listov predstavlja vsoto vseh listov, ki jih je po spravilu imela rastlina, ne glede na njihovo velikost. Po tem kriteriju izstopajo kontrolni vzorci, ki imajo najmanjše povprečno število listov in se statistično značilno razlikujejo od ostalih vzorcev.



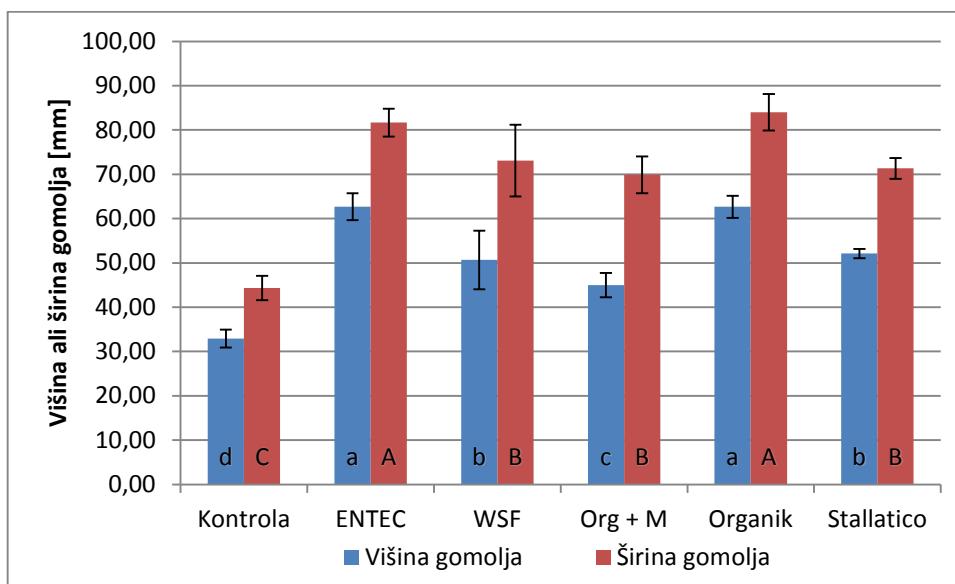
Slika 7: Povprečja in standardni odkloni števila listov kolerabice, gnojene z različnimi gnojili.

Razlike v masah rastlin in gomoljev so zelo izrazite, vendar do njih ne prihaja le med različnimi tipi gnojil (organiskimi in mineralnimi), temveč tudi med različnimi gnojili znotraj teh tipov. Največjo maso so imeli vzorci gnojeni z ENTEC in Organik, ki se statistično značilno razlikujejo od vseh ostalih. Vzorci, gnojeni z gnojili WSF, Org + M in Stallatico, imajo podobne povprečne vrednosti mase, vendar pri gnojilu WSF opazimo velike standardne odklone, ki je posledica bistveno manjše mase dveh izmed devetih WSF rastlin, ki sta med poskusom bili zamenjani in nista dosegli podobne mase kot ostale. WSF vzorci se po masi statistično značilno razlikujejo od Org + M vzorcev. Kontrolni vzorci so po pričakovanjih v rastni dobi dosegli bistveno manjšo maso in se po tem parametru značilno razlikujejo od vseh ostalih.



Slika 8: Povprečne vrednosti in standardni odkloni mase rastlin in mase gomoljev kolerabice, gnojene z različnimi gnojili, izražene v gramih.

Iz preglednice 9 je razvidno, da se vzorci, gnojeni z različnimi gnojili, po višini in širini gomoljev značilno razlikujejo med sabo. Tako v višini kot širini so največje vrednosti dosegli vzorci ENTEC in Organik, ki so bili tudi najtežji. Sledijo jim vzorci WSF, Stallatico in Org + M, ki se po širini med seboj statistično ne razlikujejo, po višini pa so vzorci Org + M statistično značilno različni. Vzorci WSF so v primerjavi z vzorci Stallatico višji, vendar ožji. Najmanjši in statistično različni tako po višini kot po širini so bili gomolji kontrolnih vzorcev.



Slika 9: Povprečna višina in širina gomoljev kolerabice, gnojene z različnimi gnojili, izražena v milimetrih, ter standardni odkloni.

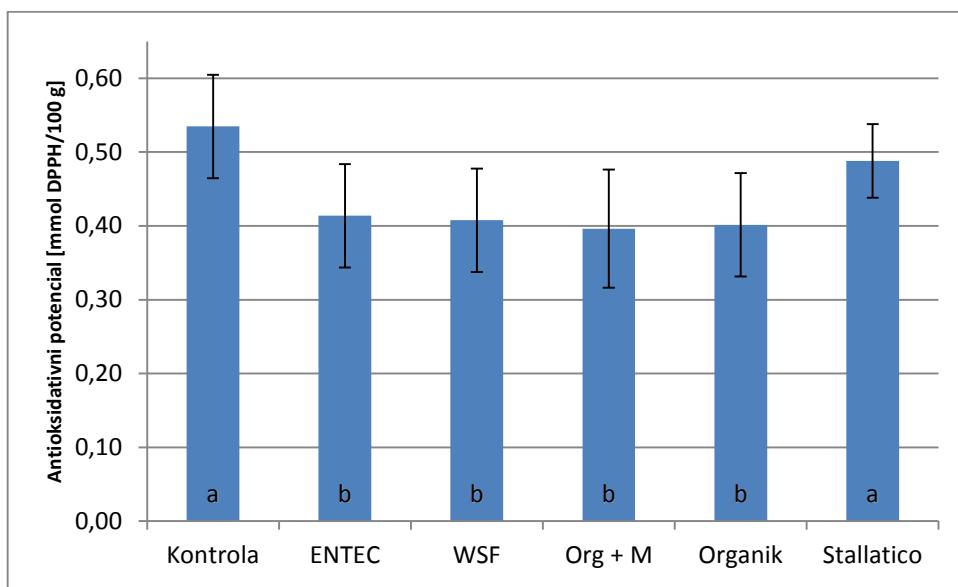
4.1.2 Antioksidativni potencial in skupni fenoli

Preglednica 10: Povprečne vrednosti in standardni odkloni pri rastlinah kolerabice gnojene z različnimi gnojili za antioksidativni potencial in skupne fenole.

	Kontrola	ENTEC	WSF	Org + M	Organik	Stallatico
Antioksidativni potencial (mmol DPPH/100 g)	0,53±0,07 ^a	0,41±0,07 ^b	0,41±0,07 ^b	0,40±0,08 ^b	0,40±0,07 ^b	0,49±0,05 ^a
Skupni fenoli (mg galne kisline/100 g)	43,9±4,6 ^a	28,8±3,9 ^c	35,9±4,8 ^b	31,8±2,9 ^{bc}	35,1±5,0 ^b	34,7±4,1 ^b

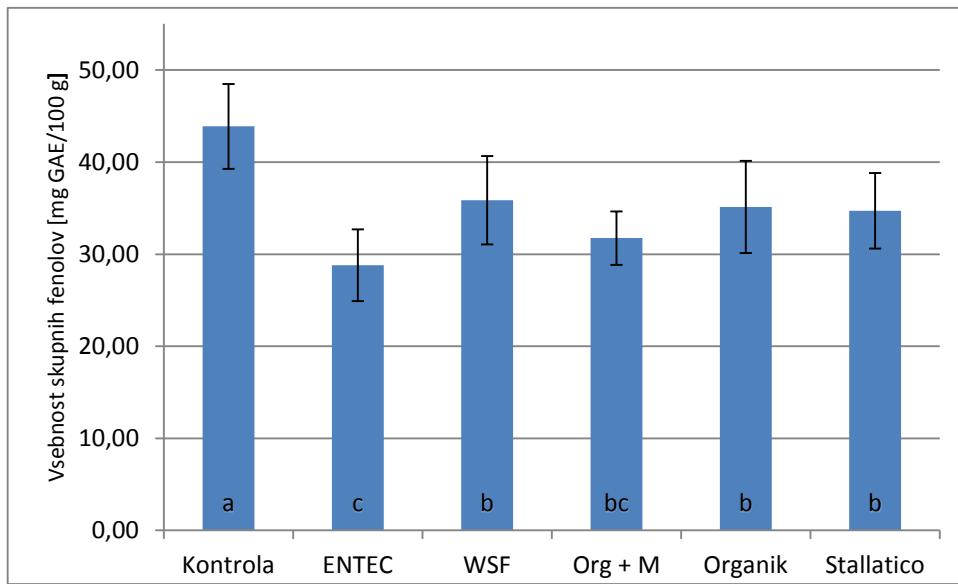
Skupine, ki se med seboj statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$), imajo v indeksu znotraj polja v preglednici različne črke (a, b, c, d).

Iz rezultatov v preglednici 10 je razvidno, da so kontrolni vzorci in vzorci, gnojeni z gnojilom Stallatico, imeli večji antioksidativni potencial od ostalih. Pričakovali smo, da bodo vsi vzorci, gnojeni z organskimi gnojili, imeli večji antioksidativni potencial od tistih, gnojenih z mineralnimi gnojili, vendar rezultati tega ne potrjujejo, saj se rastline, gnojene z gnojilom Organik, statistično značilno ne razlikujejo od vzorcev, gnojenih z gnojili ENTEC, WSF in Org + M.



Slika 10: Povprečne vrednosti in standardni odkloni antioksidativnega potenciala gomoljev kolerabice, gnojene z različnimi gnojili, izražene v mmol DPPH/100 g.

Rezultati analiz skupnih fenolov kažejo, da so imele največjo koncentracijo teh kontrolne rastline, ki so se statistično značilno razlikovale od vseh ostalih. Najmanjšo koncentracijo skupnih fenolov smo ugotovili v rastlinah, ki so bile gnojene z gnojilom ENTEC. Te so bile po vsebnosti skupnih fenolov statistično značilno različne od vseh ostalih, razen od rastlin, gnojenih z Org + M. Pričakovali smo, da bodo ekološko pridelane rastline imele večjo povprečno vsebnost fenolov od tistih, ki so bile pridelane na kovencionalni način, vendar tega po ogledu rezultatov ne moremo trditi, saj se po vsebnosti fenolov bistveno razlikujejo le od konvencionalno pridelanih rastlin, ki so bile gnojene z gnojilom ENTEC.



Slika 11: Povprečne vrednosti in standardni odkloni koncentracije skupnih fenolov v gomoljih kolerabice, gnojene z različnimi gnojili, izražene v mg ekvivalentov galne kisline na 100 g.

4.1.3 Nitritni, nitratni in amonijev dušik v gomolju in listih

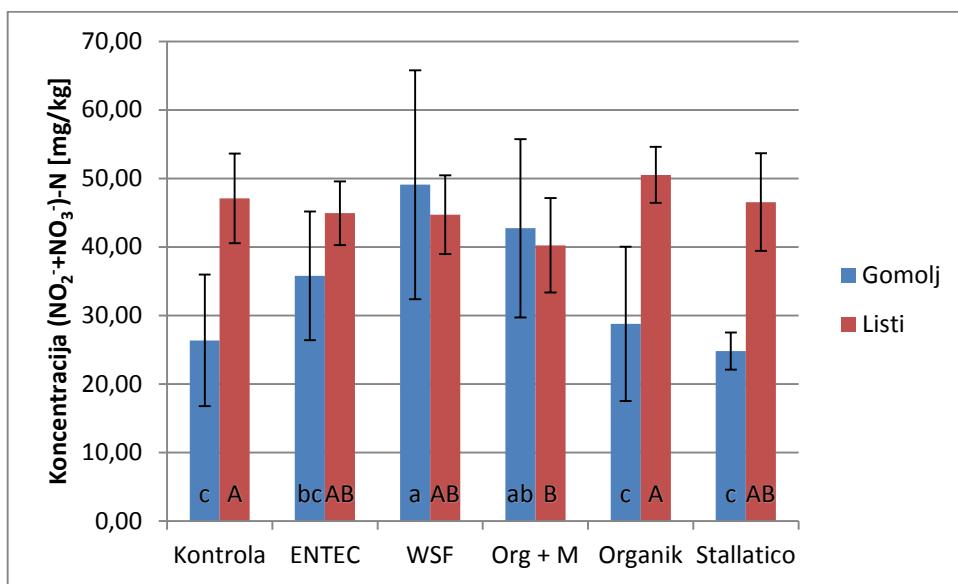
Preglednica 11: Povprečne vrednosti in standardni odkloni v rastlinah kolerabice gnojene z različnimi gnojili za nitritni in nitratni dušik ter za amonijev dušik v gomolju in v listih.

	Kontrola	ENTEC	WSF	Org + M	Organik	Stallatico
(NO ₂ ⁻ +NO ₃ ⁻)-N (mg/kg) gomolj	26±10 ^c	36±9 ^{bc}	49±17 ^a	43±13 ^{ab}	28±11 ^c	25±3 ^c
NH ₄ ⁺ -N (mg/kg) gomolj	31±11 ^a	42±11 ^a	46±22 ^a	41 ±12 ^a	33±14 ^a	35±11 ^a
(NO ₂ ⁻ +NO ₃ ⁻)-N (mg/kg) listi	47±7 ^a	45±5 ^{ab}	45±6 ^{ab}	40±7 ^b	50±4 ^a	47±7 ^{ab}
NH ₄ ⁺ -N (mg/kg) listi	32±45 ^b	46±9, ^a	43±5 ^a	43±11 ^a	38±4 ^{ab}	38±7 ^{ab}

Skupine, ki se med seboj statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$) imajo v indeksu znotraj polja v preglednici različne črke (a, b, c, d).

Rezultati analiz vsote nitritnega in nitratnega dušika v gomoljih kolerabice kažejo na manjšo koncentracijo v ekološko pridelanih rastlinah. Največjo koncentracijo smo ugotovili v rastlinah, ki so bile gnojene z vodotopnim mineralnim gnojilom (WSF in Org + M), sledile pa so jim rastline, gnojene z ENTEC. Gomolji kolerabic, ki so bile gnojene z organskimi gnojili, in gomolji kontrolnih rastlin, so imeli manjšo koncentracijo nitritnega in nitratnega dušika in so se statistično značilno razlikovali od vseh ostalih.

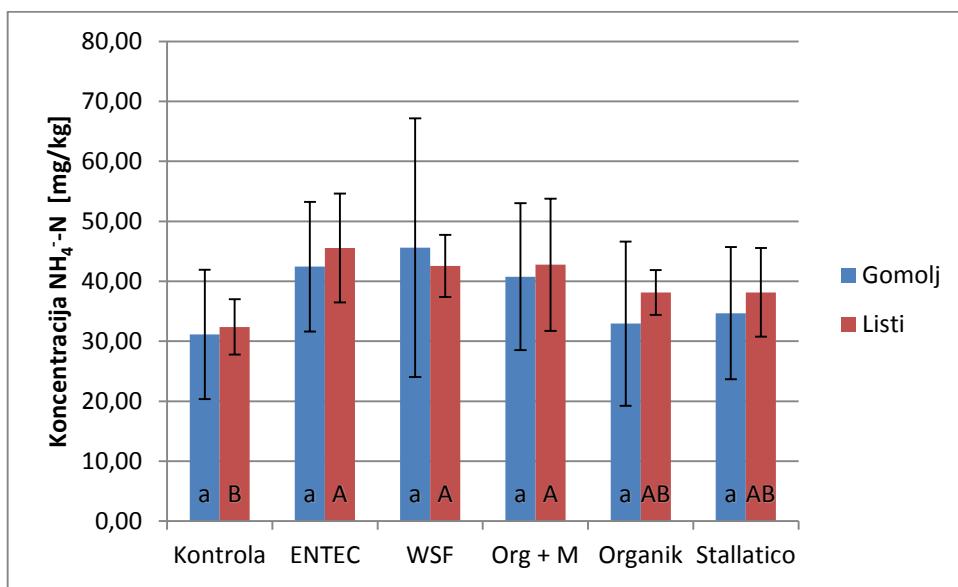
Analiza vsebnosti nitritnega in nitratnega dušika v listih kolerabice nam je pokazala povsem drugačne koncentracije kot v gomoljih. Največje koncentracije smo zaznali pri konvencionalno pridelanih in kontrolnih rastlinah, najmanjše pa pri tistih, ki so bile gnojene z vodotopnim mineralnim gnojilom. V vsebnosti nitritnega in nitratnega dušika v listih kolerabice se od ostalih vzorcev statistično značilno razlikuje samo vzorec, gnojen s kombinacijo gnojil Org + M.



Slika 12: Povprečne vrednosti in standardni odkloni vsote koncentracij nitratnega in nitritnega dušika v listih in gomoljih kolerabice, gnojene z različnimi gnojili, izražene v mg/kg.

Koncentracije amonijevega dušika v gomoljih rastlin, ki so bile gnojene z različnimi gnojili, so bile različne, vendar zaradi relativno visokih standardnih odklonov ne moremo trditi, da katerikoli izmed tipov gnojenja bistveno vpliva na vsebnost amonijevega dušika v gomolju, saj vrednosti niso statistično značilno različne. Najmanjše koncentracije smo zaznali v kontrolnih vzorcih in vzorcih ekološko pridelanih rastlin. Pri konvencionalno pridelanih kolerabicah so povprečne vrednosti koncentracij amonijevega dušika v gomolju bile manjše, največjo povprečno vrednost pa smo zasledili v rastlinah, gnojenih z gnojilom WSF.

Analiza koncentracije amonijevega dušika v listih kolerabic nam je dala podobne rezultate kot analiza gomoljev, vendar se je izkazala za nekoliko natančnejšo, saj so standardni odkloni manjši. Povprečno so najmanjšo koncentracijo amonijevega dušika imele kontrolne rastline, sledile pa so jim ekološko pridelane rastline (Organic, Stallatico). Koncentracije v konvencionalno pridelanih rastlinah so bile večje, v povprečju smo največjo koncentracijo ugotovili v listih rastlin, ki so bile gnojene z gnojilom ENTEC. Po koncentraciji amonijevega dušika v listih se od vzorcev iz rastlin, pridelanih z mineralnimi gnojili, statistično značilno razlikujejo le vzorci v kontrolnih rastlinah.



Slika 13: Povprečne vrednosti in standardni odkloni koncentracije amonijevega dušika v listih in gomoljih kolerabice, gnojene z različnimi gnojili, izražene v mg/kg.

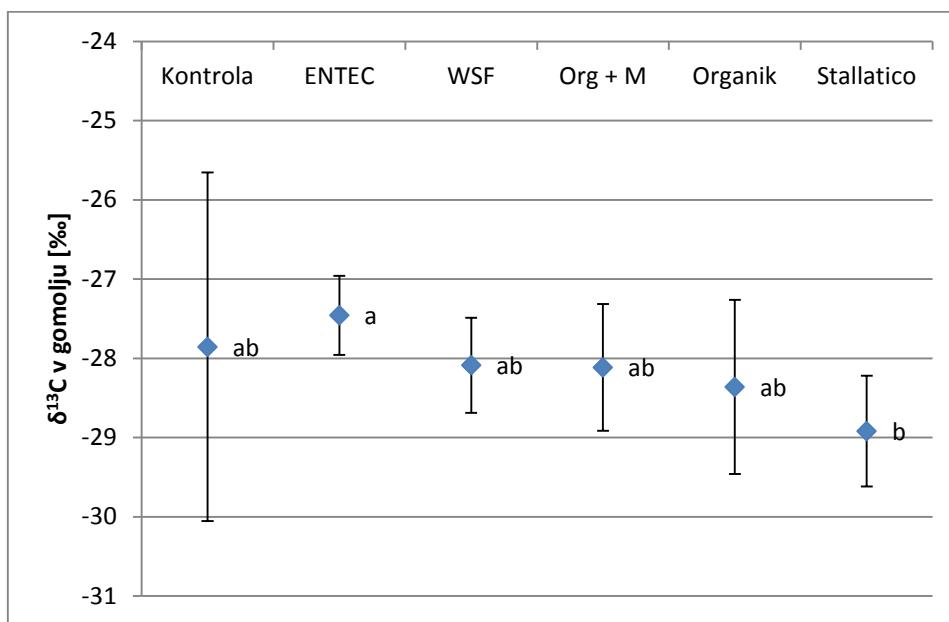
4.1.4 Vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{15}\text{N}$ v gomoljih in listih

Preglednica 12: Povprečne vrednosti in standardni odkloni v rastlinah kolerabice, gnojene z različnimi gnojili vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{15}\text{N}$ v gomoljih in listih.

	Kontrola	ENTEC	WSF	Org + M	Organik	Stallatico
$\delta^{13}\text{C}$ gomolj	$-27,9 \pm 2,2^{\text{ab}}$	$-27,5 \pm 0,5^{\text{a}}$	$-28,1 \pm 0,6^{\text{ab}}$	$-28,1 \pm 0,8^{\text{ab}}$	$-28,4 \pm 1,1^{\text{ab}}$	$-28,9 \pm 0,7^{\text{b}}$
$\delta^{13}\text{C}$ listi	$-29,8 \pm 0,4^{\text{bc}}$	$-28,8 \pm 1,4^{\text{a}}$	$-28,8 \pm 0,7^{\text{a}}$	$-29,7 \pm 0,6^{\text{b}}$	$-29,4 \pm 0,4^{\text{ab}}$	$-30,3 \pm 0,7^{\text{c}}$
$\delta^{15}\text{N}$ gomolj	$7,1 \pm 1,9^{\text{a}}$	$2,1 \pm 1,8^{\text{c}}$	$4,1 \pm 1,9^{\text{b}}$	$3,2 \pm 0,8^{\text{bc}}$	$7,8 \pm 1,9^{\text{a}}$	$7,5 \pm 1,4^{\text{a}}$
$\delta^{15}\text{N}$ listi	$5,0 \pm 1,5^{\text{b}}$	$3,1 \pm 0,7^{\text{c}}$	$2,7 \pm 1,1^{\text{c}}$	$3,3 \pm 0,5^{\text{c}}$	$7,7 \pm 1,1^{\text{a}}$	$6,9 \pm 1,6^{\text{a}}$

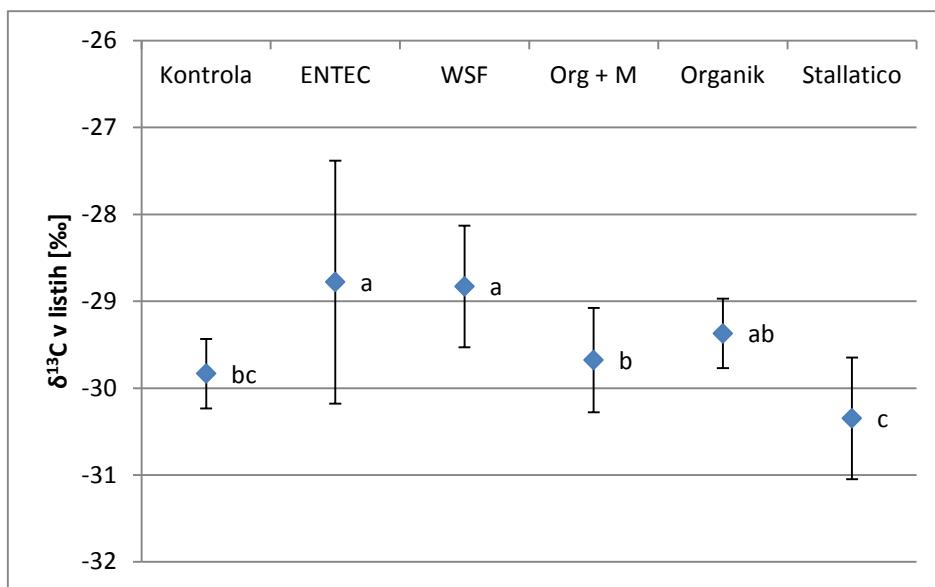
Skupine, ki se med seboj statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$) imajo v indeksu znotraj polja v preglednici različne črke (a, b, c, d).

Največji delež težjega izotopa ogljika (^{13}C) smo ugotovili v rastlinah, gnojenih z gnojilom ENTEC, najmanjšega pa v rastlinah, ki so bile gnojene z gnojilom Stallatico. Za ti dve skupini rastlin lahko trdimo, da sta med seboj statistično značilno različni. Ostale skupine rastlin se po vrednostih $\delta^{13}\text{C}$ od njiju ne razlikujejo dovolj, da bi lahko z gotovostjo trdili, da so različne, je pa vredno omeniti, da smo manjše povprečne vrednosti ugotovili v organsko gnojenih kolerabicah.



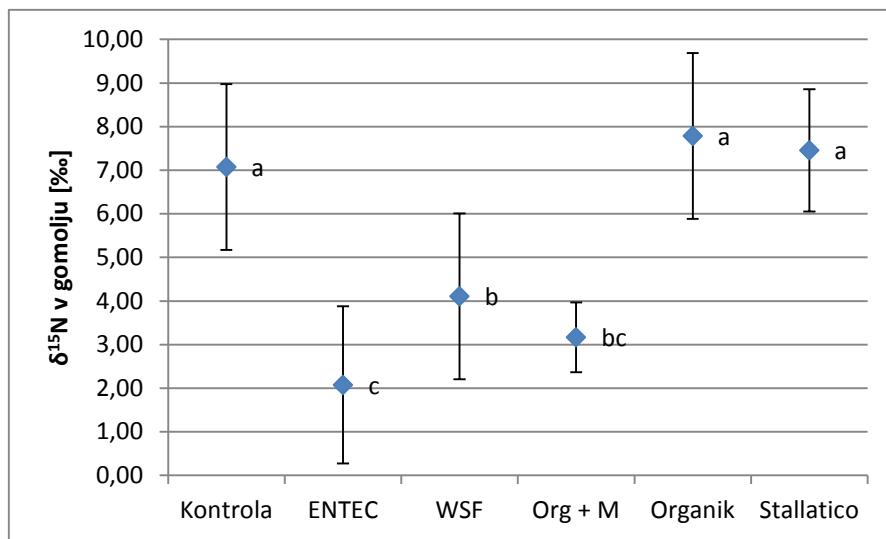
Slika 14: Povprečne vrednosti in standardni odkloni $\delta^{13}\text{C}$ proti standardu VPDB v gomoljih kolerabice, gnojene z različnimi gnojili, izražene v promilih.

Povprečne vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ v listih so bile manjše, kot v gomoljih, vendar pa vrstni red skupin rastlin, ki so bile gnojene z različnimi gnojili, ni bil enak. Tudi tokrat smo največji povprečni delež izotopa ^{13}C ugotovili v rastlinah, ki so bile gnojene z gnojilom ENTEC in najmanjšega v rastlinah, gnojenih z gnojilom Stallatico, vendar so tokrat rastline, ki smo jih gnojili s kombinacijo organskega in mineralnega gnojila, v listih imele manjšo povprečno vrednost $\delta^{13}\text{C}$, kot rastline, gnojene z gnojilom Organik.

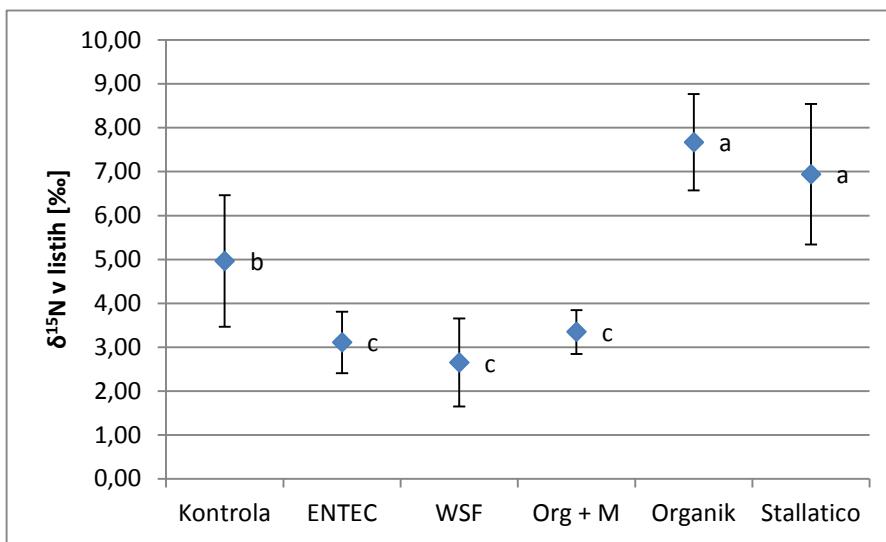


Slika 15: Povprečne vrednosti in standardni odkloni $\delta^{13}\text{C}$ proti standardu VPDB v listih kolerabice, gnojene z različnimi gnojili, izražene v promilih.

Analiza vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ nam je dala zelo jasne rezultate, ki so se ujemali z našo hipotezo, da bodo rastline, gnojene z organskimi gnojili, imele večji delež težjega izotopa dušika (^{15}N) od konvencionalno pridelanih. Tako v gomoljih kot v listih so ekološko pridelane rastline imele bistveno večji delež izotopa ^{15}N in so se statistično značilno razlikovale od kolerabic, gnojenih z mineralnimi gnojili. Presenetljiv je le povprečen rezultat ugotovljen v rastlinah, ki so bile gnojene s kombinacijo organskega in vodotopnega mineralnega gnojila, saj te niso imele bistveno drugačnega razmerja izotopov dušika od tistih, ki so bile gnojene samo z mineralnimi gnojili, so pa v primerjavi z rastlinami, ki smo jih gnojili samo z vodotopnim mineralnim gnojilom, imele nekoliko večji delež težjega izotopa v listih in nekoliko manjšega v gomoljih, vendar razlike niso bile statistično značilne.



Slika 16: Povprečne vrednosti in standardni odkloni $\delta^{15}\text{N}$ proti standardu AIR v gomoljih kolerabice, gnojene z različnimi gnojili, izražene v promilih.



Slika 17: Povprečne vrednosti in standardni odkloni $\delta^{15}\text{N}$ proti standardu AIR v listih kolerabice, gnojene z različnimi gnojili, izražene v promilih.

Preglednica 13: $\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{15}\text{N}$ vrednosti v uporabljenih gnojilih, izražene v ‰.

gnojilo	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)
ENTEC	-26,3	-0,4
WSF	-27,6	-0,1
Organik	-21,3	3,9
Stallatico	-17,9	10,0

Preglednica 13 prikazuje vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{15}\text{N}$ v gnojilih, ki smo jih uporabili v poskusu. Pri organskih gnojilih (Organik in Stallatico) opazimo večje deleže težjega izotopa dušika kot pri mineralnih (ENTEC in WSF).

4.2 KORELACIJE MED RAZLIČNIMI PARAMETRI

Preglednica 14: Pearsonovi korelacijski koeficienti in p-vrednosti za parametre: število listov, masa rastline, masa gomolja, višina gomolja in širina gomolja.

	masa rastline	masa gomolja	višina gomolja	širina gomolja
število listov	0,65949	0,64272	0,60896	0,74514
	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001
	54	54	54	54
masa rastline	1	0,99459	0,96849	0,96207
	54	<,0001	<,0001	<,0001
masa gomolja		1	0,96256	0,96298
		54	<,0001	<,0001
višina gomolja			1	0,92050
			54	<,0001
širina gomolja				1
				54

Celice s statistično značilnimi korelacijskimi koeficienti ($p < 0,05$) so pobarvane in njihova vsebina je odenbeljena. Spodnje število v vsaki izmed celic predstavlja skupno število rastlin, vključenih v primerjavo.

Preglednica 14 nam kaže korelacijske koeficiente med številom listov, maso rastlin in gomoljev ter fizično velikostjo gomoljev. Med vsemi parametri smo ugotovili statistično značilno korelacijo. Največje stopnje pozitivne korelacije smo ugotovili pri primerjavi mase, mase gomoljev, višine gomoljev in širine gomoljev ($> 0,9$), med tem ko je korelacija med številom listov bila nekoliko manjša.

Preglednica 15: Pearsonovi korelacijski koeficienti in p-vrednosti za parametre: število listov, masa, antioksidativni potencial, skupni fenoli, nitritni+nitratni dušik v gomolju, nitritni+nitratni dušik v listih, amonijev dušik v listih in amonijev dušik v gomolju.

	masa rastline	AOP	fenoli	NH ₄ -N gomolj	(NO ₂ +NO ₃)-N gomolj	NH ₄ -N list	(NO ₂ +NO ₃)-N list
število listov	0,65949 <0,0001 54	-0,35859 0,0078 54	-0,49840 0,0001 54	0,18862 0,1720 54	0,25203 0,0660 54	0,38351 0,0050 52	-0,09559 0,5002 52
masa rastline	1 54	-0,45307 0,0006 54	-0,47495 0,0003 54	0,01979 0,8870 54	0,03303 0,8126 54	0,31073 0,0250 52	0,17395 0,2175 52
AOP		1 54	0,32059 0,0181 54	-0,23775 0,0834 54	-0,41388 0,0019 54	-0,20730 0,1403 52	0,09868 0,4864 52
fenoli			1 54	0,03514 0,8008 54	-0,11189 0,4205 54	-0,19450 0,1671 52	0,11378 0,4219 52
NH ₄ -N gomolj				1 54	0,71244 <0,0001 54	0,17108 0,2253 52	-0,00749 0,9580 52
(NO ₂ +NO ₃)-N gomolj					1 54	0,15462 0,2737 52	-0,17411 0,2170 52
NH ₄ -N list						1 52	0,10945 0,4399 52

Celice s statistično značilnimi korelacijskimi koeficienti ($p < 0,05$) so pobarvane in njihova vsebina je odenbeljena. Spodne število v vsaki izmed celic predstavlja skupno število rastlin, vključenih v primerjavo.

Preglednica 15 prikazuje korelacije med merjenimi parametri. Ugotovili smo relativno visoke negativne, statistično značilne koeficiente korelacije med maso in antioksidativnim potencialom, maso in koncentracijo fenolov, številom listov in antioksidativnim potencialom ter številom listov in koncentracijo fenolov. Obstaja tudi statistično značilna, negativna korelacija med vsoto koncentracij nitritnega in nitratnega dušika v gomolju kolerabice ter njenim antioksidativnim potencialom. Največjo stopnjo korelacije je pokazala primerjava rezultatov analize koncentracije vsote nitritnega in nitratnega dušika ter amonijevega dušika v gomolju, ugotovili pa smo tudi korelaciji med koncentracijo amonijevega dušika v listih ter številom listov in maso rastlin.

Iz preglednice 15 je razvidno tudi, da z večanjem koncentracije fenolov v rastlini narašča njen antioksidativni potencial, vendar je korelacija zelo šibka.

Preglednica 16: Pearsonovi korelacijski koeficienti in p-vrednosti med parametri število listov, masa, višina gomolja, širina gomolja, $\delta^{13}\text{C}$ v gomolju, $\delta^{13}\text{C}$ v listih, $\delta^{15}\text{N}$ v gomolju in parametri $\delta^{13}\text{C}$ v gomolju, $\delta^{13}\text{C}$ v listih, $\delta^{15}\text{N}$ v gomolju, $\delta^{15}\text{N}$ v listih.

	število listov	masa	višina gomolja	širina gomolja	$\delta^{13}\text{C}$ gomolj	$\delta^{13}\text{C}$ list	$\delta^{15}\text{N}$ gomolj
$\delta^{13}\text{C}$ gomolj	0,00216	0,04155	0,01160	-0,03146	1		
	0,9876	0,7655	0,9336	0,8213			
	54	54	54	54	54		
$\delta^{13}\text{C}$ list	0,20513	0,33919	0,31300	0,29469	0,28296	1	
	0,1368	0,0121	0,0212	0,0305	0,0381		
	54	54	54	54	54	54	
$\delta^{15}\text{N}$ gomolj	-0,35446	-0,19437	-0,12403	-0,17930	-0,10722	-0,24637	1
	0,0085	0,1590	0,3715	0,1945	0,4403	0,0725	
	54	54	54	54	54	54	54
$\delta^{15}\text{N}$ list	-0,16640	-0,19437	0,11534	0,08478	-0,08644	-0,28522	0,75220
	0,2291	0,1590	0,4062	0,5422	0,5343	0,0366	<,0001
	54	54	54	54	54	54	54

Celice s statistično značilnimi korelacijskimi koeficienti ($p < 0,05$) so pobarvane in njihova vsebina je odebujena. Spodnje število v vsaki izmed celic predstavlja skupno število rastlin, vključenih v primerjavo.

Večina ugotovljenih statistično značilnih korelacij v preglednici 16 ima relativno majhne koeficiente korelacije, izstopa koeficient med deležem težjega izotopa dušika v listih in deležem istega izotopa v gomolju, ki kaže na izrazito pozitivno korelacijo.

Preglednica 17: Pearsonovi korelacijski koeficienti in p-vrednosti med parametri: antioksidativni potencial, skupni fenoli, nitritni+nitratni dušik v gomolju, nitritni+nitratni dušik v listih, amonijev dušik v listih, amonijev dušik v gomolju in parametri $\delta^{13}\text{C}$ v gomolju, $\delta^{13}\text{C}$ v listih, $\delta^{15}\text{N}$ v gomolju, $\delta^{15}\text{N}$ v listih.

	AOP	fenoli	NH ₄ -N gomolj	(NO ₂ +NO ₃)-N gomolj	NH ₄ -N list	(NO ₂ +NO ₃)-N list
$\delta^{13}\text{C}$ gomolj	0,02511	0,07958	0,04754	-0,00366	0,0972	-0,07385
	0,8570	0,5673	0,7328	0,9790	0,4927	0,6029
	54	54	54	54	52	52
$\delta^{13}\text{C}$ list	-0,29889	-0,08597	0,15070	0,19617	0,3552	-0,05998
	0,0281	0,5365	0,2767	0,1551	0,0098	0,6727
	54	54	54	54	52	52
$\delta^{15}\text{N}$ gomolj	0,46180	0,28016	-0,35421	-0,51914	-0,4401	0,33955
	0,0004	0,0402	0,0086	<,0001	0,0011	0,0138
	54	54	54	54	52	52
$\delta^{15}\text{N}$ list	0,26672	0,24252	-0,24544	-0,47806	-0,3399	0,29665
	0,0512	0,0772	0,0736	0,0003	0,0137	0,0327
	54	54	54	54	52	52

Celice s statistično značilnimi korelacijskimi koeficienti ($p < 0,05$) so pobarvane in njihova vsebina je odebujena. Spodnje število v vsaki izmed celic predstavlja skupno število rastlin, vključenih v primerjavo.

Iz podatkov v preglednici 17 je razvidno, da obstaja statistično značilna pozitivna korelacija med koncentracijo amonijevega dušika v listih in deležem izotopa ^{13}C v listih, medtem ko je antioksidativni potencial z deležem težjega izotopa ogljika v listih bil v statistično značilni negativni korelacijski.

Rastline z večjim deležem težjega izotopa dušika v gomolju so razvile manj listov, imele so večji antioksidativni potencial ter večjo koncentracijo fenolov. Delež izotopa ^{15}N v gomolju je bil tudi v statistično značilni negativni korelacijski s koncentracijama amonijevega dušika v listih in gomolju ter vsoto koncentracij nitritnega in nitratnega dušika v gomolju. Med vsoto nitritnega in nitratnega dušika v gomolju in deležem izotopa ^{15}N v gomolju je obstajala statistično značilna pozitivna korelacija.

Delež težjega izotopa dušika v listih je bil v statistično značilni negativni korelacijski z vsoto koncentracij nitritnega in nitratnega dušika v gomolju in v statistično značilni pozitivni korelacijski z vsoto nitritnega in nitratnega dušika v listih.

Preglednica 18: Pearsonovi korelacijski koeficienti in p-vrednosti med položajem v rastlinjaku in vsemi ostalimi parametri.

	položaj		položaj		položaj
število listov	-0,02031	AOP	0,25977	(NO₂+NO₃)-N list	0,04983
	0,8841		0,0578		0,7257
	54		54		52
masa rastline	0,02156	fenoli	-0,00396	$\delta^{13}\text{C}$ gomolj	0,41814
	0,8770		0,9773		0,0017
	54		54		54
masa gomolja	0,06442	NH₄-N gomolj	-0,01563	$\delta^{13}\text{C}$ list	0,38437
	0,6435		0,9107		0,0041
	54		54		54
višina gomolja	0,01049	(NO₂+NO₃)-N gomolj	-0,13061	$\delta^{15}\text{N}$ gomolj	0,40687
	0,9400		0,3465		0,0023
	54		54		54
širina gomolja	0,06341	NH₄-N list	-0,00924	$\delta^{15}\text{N}$ list	0,24675
	0,6487		0,9481		0,0721
	54		54		54

Celice s statistično značilnimi korelacijskimi koeficienti ($p < 0,05$) so pobarvane in njihova vsebina je odenbeljena. Spodnje število v vsaki izmed celic predstavlja skupno število rastlin, vključenih v primerjavo.

Podatki iz preglednice 18 kažejo, da položaj rastline v rastlinjaku ni imel statistično značilnega vpliva na večino parametrov, ki smo jih analizirali, vendar smo zabeležili statistično značilen vpliv položaja na delež izotopa ^{13}C v gomolju in listih ter na delež izotopa ^{15}N v gomolju. Pri vseh treh korelacijskih velja, da je delež analiziranih izotopov naraščal od juga proti severu, kar je najbrž posledica boljše izmenjave zraka na jugu rastlinjaka, kjer so bila vrata v času poskusa stalno odprta.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Vpliv gnojenja na $\delta^{13}\text{C}$

Analiza deležev stabilnih izotopov dušika se ni izkazala za uporabno pri razlikovanju ekološko pridelane kolerabice od tiste, ki je bila pridelana z mineralnimi gnojili. Izstopale so le rastline, gnojene z organskim gnojilom Stallatico, ki so v listih imele značilno manjši delež težjega izotopa ogljika od vseh ostalih z izjemo kontrolnih vzorcev. Manjšo vrednost $\delta^{13}\text{C}$ lahko razložimo z večjo mikrobnou aktivnostjo pri tem gnojilu (Hogberg in sod., 1995; Molk, 2011). Prav tako organsko pridelana kolerabica, ki je zrasla v zemlji, gnojeni z gnojilom Organik, po izotopski sestavi ogljika ni bila različna od konvencionalno pridelanih rastlin.

Uporaba metode IRMS za analizo stabilnih izotopov ogljika je uporabna predvsem za ugotavljanje potvorb živil, saj asimilacija CO_2 preko C_3 , C_4 ali CAM poti privede do različnih vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ v končnih proizvodih. Omogoča nam npr. zaznavanje prisotnosti sladkornih sirupov iz C_4 rastlin (sladkorni trs, koruza) v proizvodih iz C_3 rastlin, kot so sadni sokovi, med, javorjev sirup, ipd. Gre za primerjalno metodo, saj so v rastlinah vedno prisotna naravna nihanja vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ zaradi različnih okoljskih dejavnikov, kot sta količina vode in svetlobe (Kelly, 2003).

5.1.2 Vpliv gnojenja na $\delta^{15}\text{N}$

Med potovanjem dušikovih spojin po prehranjevalni verigi navzgor se lažji izotop dušika v večji meri izloča z urinom, težji izotop pa se zaradi tega bolj zadržuje. Dušik v živalskih izločkih se hidrolizira do amonijaka in nato pretvori v nitrate. Pri tem prihaja do višanja deleža težjega izotopa v nitratih. Organska gnojila povečajo nivo ^{15}N v prsti in posledično tudi v rastlinah, ki so zrasle na njej (Mariotti in sod., 1981).

Zelenjava gnojena z organskimi gnojili vsebuje večji delež izotopa ^{15}N od tiste, gnojene z mineralnimi gnojili, zato se vrednost $\delta^{15}\text{N}$ lahko uporablja za razlikovanje med ekološko in konvencionalno pridelano zelenjavovo (Bateman in sod., 2007).

Tako gomolji kot listi ekološko pridelane kolerabice so imeli večji delež izotopa ^{15}N od konvencionalno pridelane. Po vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ so se ekološko pridelane rastline tudi statistično značilno razlikovale od konvencionalno pridelanih. Kontrolni vzorci, ki so zrasli v negnojeni zemlji, so po rezultatih analize $\delta^{15}\text{N}$ bili podobni ekološko pridelanim vzorcem.

5.1.3 Vpliv gnojenja na maso rastlin, število listov in velikost gomoljev

Gnojenje ter tip gnojila sta imela velik vpliv na rast in posledično na fizikalne lastnosti rastlin ob obiranju. Najmanjšo povprečno maso smo zabeležili pri kontrolnih rastlinah, ki so dosegle povprečno maso 53,8 g in so se tako značilno razlikovale od vseh ostalih rastlin, ki so zrasle v pognojeni zemlji, katerih povprečne mase so se gibale med 167,3 g in 293,7 g.

Čeprav smo vse rastline pognojili z enako količino kalija, ki smo ga definirali kot limitirajoči faktor v naših gnojilih, smo pri različnih tipih gnojil opazili zelo različne intenzivnosti rasti, ki niso bile odvisne od tipa gnojila (organsko/mineralno). Največjo povprečno maso, nad 290 g, so dosegle rastline, gnojene z gnojili ENTEC in Organik, medtem ko so se ostala tretiranja z gnojili izkazala za bistveno manj učinkovita, saj so ostale rastline v povprečju dosegale mase med 201,6 g in 167,6 g.

Do razlik v rasti je najbrž prišlo zaradi razlik v tipu gnojil, sistema doziranja gnojil in zaradi razlik v razmerju elementov N, P, K v gnojilih:

- Lawlor in sod. (1988) so zapisali, da obilna oskrba z dušikom namreč poveča število meristemov v rastlinah in njihovo rast. Dušik iz mineralnih gnojil je rastlinam dostopen v nespremenjeni obliki, kar pomeni, da se v rastline lahko absorbira hitreje in pospeši njihovo rast.
- Razliko med rastjo rastlin, gnojenih z WSF in tistimi, ki so bile gnojene z gnojilom ENTEC, lahko razložimo z razliko v sistemu doziranja. Gnojilo ENTEC smo že na začetku dodali v celoti, medtem ko smo WSF dodajali v majhnih deležih skozi celo rastno dobo, kar pomeni, da je bila med rastjo koncentracija hranil v zemlji pri teh rastlinah različna. Poleg tega so rastline dosegle tehnološko zrelost v krajšem času, kot smo pričakovali, kar je pomenilo, da so tiste, ki so gnojilo dobivale v obrokih, z zalivanjem, prejele 20 % manj gnojila, kot je bilo predvideno.
- Ker smo gnojila dozirali glede na njihovo vsebnost kalija, so nekatere rastline imele na voljo različne količine ostalih elementov, kar lahko privede do razlik v rasti.

Med parametri masa rastline, masa gomolja, višina gomolja, širina gomolja smo ugotovili izjemno visoke korelačijske koeficiente ($>0,92$), kar je povsem logično, saj gre za parametre, ki so tesno povezani in se njihove vrednosti večajo skladno z rastjo rastline. Z istimi parametri smo primerjali tudi število listov in ugotovili pozitivne korelacije. Zanimivo je, da smo med številom listov in širino gomolja opazili večjo korelacijo (0,75) kot med številom listov in višino gomolja (0,61).

5.1.4 Antioksidativni potencial

Zhao in sod. (2007) so ugotovili, da imajo organsko pridelane rastline večji antioksidativni potencial in so tako bolje zaščitene pred stresnimi okoljskimi dejavniki.

Če primerjamo organska in mineralna gnojila, ugotovimo, da se dušik iz organskih sprošča počasneje, kar se manifestira v počasnejši vegetativni rasti, vendar se tvori večja količina sekundarnih metabolitov, med katerimi je veliko antioksidantov (Faller in Fialho, 2010; Molk, 2011).

Največji povprečen antioksidativni potencial so imeli kontrolni vzorci (0,53 mmol DPPH/100 g), vzorci, gnojeni s gnojilom Stallatico, pa niso veliko zaostajali (0,49 mmol DPPH/100 g). Rastline, gnojene z drugimi gnojili, so v povprečju imele manjši antioksidativni potencial (0,40-0,41 mmol DPPH/100 g), med organsko in konvencionalno pridelanimi rastlinami nismo našli statistično značilnih razlik, ki so jih našle nekatere raziskave. Ugotovili pa smo negativno korelacijo med maso rastlin in njihovim antioksidativnim potencialom (koreacijski koeficient -0,45307), kar se ujema z razlago avtorjev Faller in Fialho (2010) in Molk (2011), ki razlike v antioksidativnem potencialu med ekološko in konvencionalno pridelanimi razlagata z dostopnostjo dušika in hitrostjo vegetativne rasti.

Do razlike v antioksidativnem potencialu med gnojili Organik in Stallatico je najbrž prišlo zaradi bistveno večje vsebnosti dušika v gnojilu Organik, ki je pospešila rast. Pozitivna korelacija med $\delta^{15}\text{N}$ in antioksidativnim potencialom (koreacijski koeficient 0,46) kaže na to, da imajo ekološko pridelane rastline, ki imajo večji delež izotopa ^{15}N , večji antioksidativni potencial.

5.1.5 Skupni fenoli

Rastline povečujejo koncentracijo fenolov, da se ščitijo pred napadi žuželk, ta pa ima tudi vpliv na senzorične lastnosti rastline. Fenolne spojine namreč povečajo grenkobo in trpkost okusa (Mondy in sod., 1971). Njihova koncentracija in kvaliteta se lahko zelo spreminja zaradi intrinzičnih in ekstrinzičnih faktorjev, kot so genetika rastline, sestava prsti, rastni pogoji, zrelost rastline in pogoji po spraviti (Scalbert in sod., 2005).

Največjo povprečno koncentracijo skupnih fenolov smo ugotovili v vzorcih kontrolnih rastlin (43,9 mg/100 g), najmanjšo pa v rastlinah, gnojenih z gnojilom ENTEC (28,8 mg/100 g). Obe omenjeni skupini sta se statistično značilno razlikovali od vseh ostalih skupin rastlin, gnojenih drugače. Med temi nismo ugotovili pomembnih razlik, kar je glede na rezultate analiz antioksidativnega potenciala nekoliko presenetljivo, saj smo tam pri gnojilu Stallatico zaznali bistveno večje antioksidativne potenciale, kot pri ostalih. Fenoli delujejo kot antioksidanti, njihova koncentracija pa je bila v pozitivni korelacji z antioksidativnim potencialom rastlin. Hounsome in sod. (2009) so zapisali, da je antioksidativni potencial v različnih rastlinah vrstah rodu *Brassica* v pozitivni v korelaciji z vsebnostjo fenolov in pa tudi s koncentracijo askorbinske kisline. Na večji antioksidativni potencial rastlin, ki so bile gnojene z gnojilom Stallatico je tako najverjetneje vplivala večja koncentracija askorbinske

kisline v teh rastlinah. Gnojilo WSF se je v tem pogledu izkazalo za primerljivo organskim gnojilom ter za boljše od kombinirane uporabe gnojila WSF z gnojilom Organik.

Po pričakovanjih smo med skupnimi fenoli in antioksidativnim potencialom ugotovili značilno pozitivno korelacijo (koeficient korelacije: 0,32). Čeprav nismo našli statistično značilnih razlik v antioksidativnem potencialu med vsemi organsko in konvencionalno pridelanimi rastlinami, rezultati kažejo, da, podobno kot pri antioksidativnem potencialu, obstaja statistično značilna negativna korelacija med koncentracijo fenolov in maso rastlin (koreacijski koeficient: -0,47).

Dostopnost dušika je bila pri nekaterih rastlinah manjša kot pri drugih, zato so te več sredstev namenile za sintezo ogljikovih spojin (organske kisline, polifenoli), namesto da bi sintetizirale dušikove spojine (beljakovine) (Molk, 2011). Gnojilo WSF smo rastlinam dodajali postopoma, medtem ko smo gnojilo ENTEC dodali vse naenkrat ob začetku poskusa, kar je imelo velik vpliv na dostopnost dušika in posledično na presnovo v rastlinah. Poleg tega nam pred zaključkom poskusa ni uspelo vnesti celotne predvidene količine WSF, v primerjavi z gnojilom ENTEC pa je vsebovalo tudi nekoliko manjši delež dušika.

Ugotovili smo tudi pozitivno korelacijo med parametrom $\delta^{15}\text{N}$ in skupnimi fenoli (koreacijski koeficient 0,28), kar nakazuje na to, da imajo ekološko pridelane rastline, ki imajo večji delež izotopa ^{15}N , večjo vsebnost skupnih fenolov.

5.1.6 Nitritni in nitratni dušik

Gnojila z dušikom so široko uporabljena in predvsem tista, ki vsebujejo nitratre, povzročajo akumulacijo teh v rastlini, če je hitrost njihovega sprejema večja od hitrosti njihove redukcije v amonij (Anjana in sod., 2009).

Gomolji rastlin, ki so bile gnojene z organskimi gnojili, so vsebovali bistveno manjše vsote nitritnega in nitratnega dušika, kot gomolji rastlin, ki so bile gnojene z mineralnimi gnojili. Prav tako smo majhno vsebnost nitritnega in nitratnega dušika ugotovili pri kontrolnih rastlinah, ki so se skupaj z organsko gnojenimi statistično značilno razlikovale od konvencionalno pridelanih rastlin. Mineralna gnojila, bogata z nitrati, so povzročila večjo akumulacijo nitritov in nitratov v gomoljih kolerabic, v povprečju pa je koncentracija teh bila največja v rastlinah, ki smo jih gnojili samo z vodotopnim gnojilom, kar pomeni, da so sproti, z vsakim zalivanjem dobine lahko dostopna, mineralna hrana. Nekoliko manj nitratov so vsebovali gomolji rastlin, gnojenih s kombinacijo organskih in mineralnih gnojil, še manj pa so jih vsebovale rastline, gnojene z gnojilom ENTEC. Citak in Sonmez (2010) sta primerjala koncentracijo nitratov v ekološko in konvencionalno pridelani špinači in prišla do podobnih ugotovitev. Manjšo vsebnost nitratov v ekološko pridelani špinači sta pojasnila s počasnejšo hitrostjo mineralizacije organskih gnojil. Do podobne ugotovitve so prišli tudi Barker (1975) ter Herencia in sod. (2011), Fujiwara in sod. (2005) pa so z razliko v hitrosti

mineralizacije organskega gnojila utemeljili razlike v vsebnosti nitratov med špinaco, ki je bila pridelana poleti in tisto, ki je bila pridelana pozimi.

Vsota koncentracij nitritnega in nitritnega dušika v listih kolerabice iz prehranskega vidika ni enako pomembna kot v gomoljih, vendar je zanimivo dejstvo, da sta ti vsoti pri istih skupinah rastlin bili precej različni. Pri kontrolnih in ekološko pridelanih rastlinah smo v listih zabeležili večje vsote koncentracij nitritnega in nitratnega dušika, kot pri konvencionalno pridelanih rastlinah, kar je ravno obratno od rezultatov, ugotovljenih na gomoljih.

5.1.7 Amonijev dušik

Rastline amonija in njegovega ravnotežnega partnerja amonijaka ne morejo shranjevati v vakuolah, saj sta za njih toksična. Zato ju že v koreninah vključijo v organske molekule (aminokisline, amidi, ipd.) (Marschner, 1995). V rastlini nastaja iz nitrata, ki ne more biti neposredno vključen v organske molekule, temveč je za to najprej potrebna redukcija do amonija (Lack in Evans, 2001).

Po statistični obdelavi podatkov zaradi visokih odstopanj ne moremo trditi, da katerikoli izmed tipov gnojenja povzroči statistično značilno razliko v koncentraciji amonija v gomoljih rastlin. Kontrolni vzorci so imeli najmanjšo povprečno koncentracijo amonijevega dušika v gomoljih. Nekoliko večjo koncentracijo amonijevega dušika smo ugotovili v gomoljih organsko pridelanih rastlin, največjo pa so imele tiste, ki so bile gnojene z mineralnimi gnojili.

Rezultati analiz koncentracije amonijevega dušika v listih so zelo podobni analizi na gomoljih. Najmanjšo koncentracijo so imele kontrolne rastline, sledile so jim ekološko pridelane in nato ostale. Ker so odstopanja bila nekoliko manjša kot pri gomoljih, se kontrolni vzorci po koncentraciji amonija v listih statistično značilno razlikujejo od ostalih, za organsko pridelane rastline pa ne moremo trditi, da se razlikujejo od konvencionalno pridelanih.

Koncentracija amonija v listih je bila značilno povezana z njihovim številom (koeficient korelacije 0,39) in z maso rastlin (koeficient korelacije: 0,31).

5.2 SKLEPI

Rezultati naših analiz gomoljev in listov kolerabice nam omogočajo, da o rastlinah in različnih tipih gnojenja podamo naslednje sklepe:

- Rastline, gnojene z organskimi gnojili, v listih in gomoljih vsebujejo bistveno večji delež težjega izotopa ogljika ($\delta^{15}\text{N}$), kot tiste gnojene z mineralnimi gnojili.
- Delež težjega izotopa ogljika ($\delta^{13}\text{C}$) se ni izkazal kot uporaben za ločevanje konvencionalno in ekološko pridelane kolerabice.
- Različna gnojila in razmerja hranil v njih imajo velik vpliv na končno maso rastlin in na maso, širino ter višino njihovih gomoljev, vendar različna organska in različna mineralna gnojila dajejo različne rezultate. Večjega donosa ni mogoče povezati ne z enim ne z drugimi.
- Rastline, ki zrastejo povsem brez gnojila, dosežejo bistveno manjšo končno maso in velikost, vendar imajo največjo vsebnost skupnih fenolov in največji antioksidativni potencial.
- Rastline, pri katerih pride do hitrejše vegetativne rasti, tvorijo manj zaščitnih snovi, ogljikovih spojin, in imajo zaradi tega manjši antioksidativni potencial ter manjšo vsebnost skupnih fenolov.
- Organska gnojila v primerjavi z mineralnimi povzročajo manjšo akumulacijo nitritnega in nitratnega dušika v gomoljih kolerabice, vendar večjo akumulacijo v listih.
- Rastline, gnojene z vodotopnim mineralnim gnojilom, vsebujejo največ nitritnega in nitratnega dušika.

6 POVZETEK

Namen diplomske naloge je bil ugotoviti primernost metode analize izotopske sestave ogljika in dušika v listih in gomolju kolerabice (*Brassica oleracea* L. var. *gongylodes* L.) z metodo IRMS (Isotope Ratio Mass Spectrometry) za ločevanje med ekološko in konvencionalno pridelanimi rastlinami. Poleg tega smo opravili tudi različne kemijske analize, ki so nam omogočile, da smo ovrednotili njihovo prehransko kakovost.

Za namene poskusa smo vzgojili 54 rastlin. Posadili smo jih v plastične lonce, v katere smo pred tem zatehtali zemljo, ki pred poskusom ni bila pognojena vsaj 5 let, in v vsakega dodali preračunano količino gnojila. Preizkusili smo dve organski in dve mineralni gnojili; kombinacijo organskega in mineralnega gnojila; kontrolne rastline so zrasle brez gnojil. Isti tip gnojenja smo preizkušali na 9 rastlinah, ki so bile razdeljene v 3 paralelke, tako da so bile enakomerno razporejene po rastlinjaku, v katerem so rasle. Poskus se je začel 4. aprila 2011, ko so bile rastline posajene in smo začeli z zalivanjem. 1. julija 2011 so kolerabice dosegle tehnološko zrelost, tako smo jih pobrali in začeli s kemijskimi analizami.

Povprečne izmerjene vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ so bile bistveno večje pri ekološko pridelani kolerabici (6,9 – 7,8 ‰), kot pri tisti, ki je bila gnojena z mineralnimi gnojili (2,1 – 4,1 ‰). Razlike v deležih stabilnih izotopov dušika so se tudi izkazale za statistično značilne, iz česar lahko zaključimo, da je analiza izotopov dušika z metodo IRMS uporabna pri ugotavljanju avtentičnosti ekološko pridelane kolerabice.

Meritve deleža težjega izotopa ogljika ^{13}C nam niso dale rezultatov, s katerimi bi rastline, gnjene z organskimi gnojili, lahko ločili od tistih, ki so bile gnjene z mineralnimi gnojili. Statistično značilno različen rezultat smo dobili le pri analizi listov kolerabice, gnjene z gnojilom Stallatico.

Antioksidativni potencial in vsebnost skupnih fenolov sta bila v negativni korelaciji s končno maso rastlin, kar potrjuje, da se v rastlinah, ki imajo na voljo več dušika in dosežejo večjo vegetativno rast, tvori manjša količina sekundarnih metabolitov (Faller in Fialho, 2010). Med ekološko in konvencionalno pridelanimi rastlinami nismo našli razlik v antioksidativnem potencialu in koncentraciji fenolov. Izstopale so le rastline, gnjene z organskim gnojilom Stallatico, ki so imele značilno večji antioksidativni potencial od ostalih, vendar so dosegle relativno manjše mase od tistih, ki so bile gnjene z organskim gnojilom Organik.

Pri analizi vsote koncentracij nitritnega in nitratnega dušika v gomoljih se je ekološka pridelava izkazala za boljšo, saj so rastline, gnjene z organskimi gnojili, v njih akumulirale bistveno manj nitritov in nitratov. V listih, ki nimajo velike prehranske pomembnosti, pa ekološko pridelane kolerabice niso akumulirale manj nitritov in nitratov.

Med ekološko in konvencionalno pridelanimi rastlinami nismo ugotovili statistično značilnih razlik v vsebnosti amonijevega dušika v listih in v gomoljih.

7 VIRI

- Abram V., Simčič M. 1997. Fenolne spojine kot antioksidanti. Farmacevtski vestnik, 48: 573-589
- Aminot A., Kirkwood D.S., Kérouel R. 1997. Determination of ammonia in seawater by the indophenol-blue method: Evaluation of the ICES NUTS I/C 5 questionnaire. Marine Chemistry, 56: 59-75
- Anjana, Umar S., Iqbal M. 2009. Factos responsible for nitrate accumulation: A review. V: Sustainable agriculture. Lichtfouse E., Navarrete M., Debaeke P., Véronique S., Alberola C. (eds.). Dordrecht, Springer: 533-549
- Arnon D.I., Stout P.R. 1939. The essentiality of certain elements in minute quantity for plants with special refference to copper. Plant Physiology, 14, 3: 371-375
- Asami D.K., Hong Y., Barrett D.M., Mitchell A.E. 2003. Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried marionberry, strawberry, and corn grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51: 1237-1241
- Barker A.V. 1975. Organic vs. inorganic nutrition and horticultural crop quality. HortScience, 10, 1: 50-53
- Bateman A.S., Kelly S.D., Woolfe M. 2007. Nitrogen isotope composition of organically and conventionally grown crops. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55, 7: 2664-2670
- Bavec M., Naglič M., Bavec F., Repič P., Flisar Novak Z., Poštrak N., Bantan I., Pevec T., Maljevič J., Matis G., Miklavc J., Pšaker P., Darovic A., Štabuc-Starčevič D., Ambrožič I., Zupančič M., Slabe A., Tkalcic E., Orešek E. 2001. Ekološko kmetijstvo. Ljubljana, Kmečki glas: 20-24
- Briviba K., Sies H. 1994. Nonenzymatic antioxidant defense systems. V: Natural antioxidants in human health and disease. Frei B. (ed.). London, Academic Press: 107-128
- Brown J.R., Christy M., Smith G.S. 1993. G9804, Nitrate in soils and plants. Columbia, University of Missouri: 6 str.
<http://extension.missouri.edu/xplor/agguides/agchem/g09804.htm> (19.2.2013)
- Bryan N. S., Grinsven H. 2013. The role of nitrate in human health. Advances in Agronomy, 119: 153-182

- Bryce J.H., Hill S.A. 1993. Energy production in plant cells. V: Plant biochemistry and molecular biology. Lea P., Leegood R. C. (eds.). Chichester, John Wiley and Sons, cop.: 1-26
- Cartea M.E., Francisco M., Soengas P., Velasco P. 2011. Phenolic compounds in *Brassica* vegetables. *Molecules*, 16: 251-280
- Chan T.Y.K. 2011. Vegetable-borne nitrate and nitrite and the risk of methaemoglobinemia. *Toxicity Letters*, 200: 107-108
- Citak S., Sonmez S. Effects of conventional and organic fertilization on spinach (*Spinacea oleracea* L.) growth, yield, vitamin C and nitrate concentration during two successive seasons. *Scientia Horticulturae*, 126, 4: 415-420
- Coplein T.B. 1996. New guidelines for reporting stable hydrogen, carbon and oxygen isotope-ratio data. *Geochemica et Cosmochimica Acta*, 60: 3359-3360
- Craig H. 1953. The geochemistry of stable carbon isotopes. *Geochemica et Cosmochimica Acta*, 3: 53-92
- Černe M. 1998. Kapusnice. Ljubljana, Kmečki glas: 173 str.
- Černe M., Vrhovnik I. 1992. Vrtnine, vir zdravja in naša hrana. Ljubljana, Kmečki glas: 80 str.
- Dermastia M. 2007. Pogled v rastline. Ljubljana, Nacionalni inštitut za biologijo: 130-130
- Epstein S., Mayeda T. K. 1953. Variation of ^{18}O content of water from natural sources. *Geochemica et Cosmochimica Acta*, 4: 213-224
- Fageria N.K., Baligar V.C., Clark R.B. 2002. Micronutrients in crop production. *Advances in Agronomy*, 77: 185-268
- Fageria N.K., Moreira A. 2011. The role of mineral nutrition on root growth of crop plants. *Advances in Agronomy*, 110: 251-331
- Faller A.L.K, Fialho E. 2010. Polyphenol content and antioxidant capacity in organic and conventional plant foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23, 6: 561-568
- Farquhar G.D., Ehleringer J.R., Hubick K.T. 1989. Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 40: 504-505
- Fogel M.L., Cifuentes L.A. 1993. Isotope fractionation during primary production. V: Organic geochemistry: principles and applications. Engel M.H., Macko S.A. (eds.). New York, Plenum: 73-98

- Friedman I., O'Neil J.R. 1977. Compilation of stable isotope fractionation factors of geochemical interest. V: Data of geochemistry. 6th ed. Fleischer M. (ed.). Washington, United States Government Printing Office: KK1-KK12
- Fujiwara T., Kumakura H., Ohta S., Yoshida Y., Kameno T. 2005. Seasonal variation of l-ascorbic acid and nitrate content of commercially available spinach. Horticultural Research, 4, 3: 347-352
- Gat J.R. 1980. The isotopes of hydrogen and oxygen in precipitation. V: Fritz P., Fontes J.C. (eds.). Handbook of environmental isotope geochemistry. Amsterdam, Elsevier: 21-47
- Ghidini S., Ianieri A., Zanardi E., Conter M., Boschetti T., Iacumin P., Bracchi. P.G. 2006. Stable isotope determination in food authentication: a review. Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria di Parma, 26: 193-204
- Gutteridge J.M.C., Halliwell B. 1995. Antioxidants in nutrition, health, and disease. Oxford, Oxford University Press: 143 str.
- Herencia J.F., García-Galavísa P.A., Doradoa J.A.R., Maquedab C. 2011. Comparison of nutritional quality of the crops grown in an organic and conventional fertilised soil. Scientia Horticulturae, 129, 4: 882-888
- Hogberg P., Johannison C., Hogberg M., Hogbom L., Nasholm T., Hallgren J.E. 1995. Measurment of abundances of N-15 and C-13 as tools in retrospective studies of N balances and water-stress in forests: a discussion of preliminary results. Plant Soil, 1: 168-169, 125-133
- Hounsome N., Hounsome B., Tomos D., Edwards-Jones G. 2009. Changes in antioxidant compounds in white cabbage during winter storage. Postharvest Biology and Technology, 52, 2: 173-179
- Hall D.O., Rao K.K. 1999. Photosynthesys. 6th ed. Cambridge, Cambridge University Press: 113-115
- Hribar J., Simčič M. 2000. Antioksidanti v sadju in vrtninah. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L., Hočevar I. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 151-158
- Jahangir M., Hye K.K., Young H.C., Robert V. 2009. Health-affecting compounds in *Brassicaceae*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 8, 2: 31-43

- Kelly S.D. 2003. Using stable isotope ratio mass spectroscopy (IRMS) in food authentication and traceability. V: Food authenticity and traceability. Lees M. (ed.). Cambridge, Woodhead Publishing Limited: 156-183
- Kendall C., Caldwell E.A. 1998. Fundamentals of isotope geochemistry. V: Isotope tracers in catchment hydrology. Kendal C., McDonnell J.J. (eds.). Amsterdam, Elsevier Science B.V.: 51-86
- Kmecl V., Sušin J., Zupančič-Kralj L. 2005. Validation of analytical methods used for determination of nitrate in soil. Accreditation and Quality Assurance, 10, 4: 172-176
- Košmerl T., Kač M. 2007. Osnovne kemijske analize mošta in vina: laboratorijske vaje za predmet Tehnologija vina. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 97-101
- Košir I.J., Kocjančič M., Ogrinc N., Kidrič J. 2001. Use of SNIF-NMR and IRMS in combination with chemometric methods for determination of chaptalisation and geographical origin of wines (The example of Slovenian wines). Analytica Chimica Acta, 429, 2: 195-206
- Kreft I., Škrabanja V., Bonefaccia G. 2000. Temelji prehranskih in biotskih vplivov antioksidantov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L., Hočevar I. (ur.). Ljubljana, Biotehnična fakulteta, Oddelek za živilstvo: 33-39
- Kuščer I., Moljk A. 1960. Fizika (atomika). Ljubljana, Univerzitetna založba: 132-138
- Lack A.J., Evans D.E. 2001. Plant biology. Oxford, BIOS Scientific Publishers Limited: 332 str.
- Lawlor D.W., Boyle F.A., Keys A.J., Kendall A.C., Young A.T. 1988. Nitrate nutrition and temperature effects on wheat: a synthesis of plant growth and nitrogen uptake relation to metabolic and physiological processes. Journal of Experimental Botany, 39: 329-343
- Lawrence E. 2005. Henderson's dictionary of biology. 13th ed. Harlow, Pearson Education Limited: 338-338
- Leegood R.C. 1993a. The calvin cycle and photorespiration. V: Plant biochemistry and molecular biology. Lea P., Leegood R. C. (eds.). Chichester, John Wiley and Sons, cop.: 47-72
- Leegood R.C. 1993b. Carbon dioxide-concentrating mechanisms. V: Plant biochemistry and molecular biology. Lea P., Leegood R.C. (eds.). Chichester. John Wiley and Sons, cop.: 27-45

- Leifert C., Golden M.H. 2000. Dietary nitrate: A re-evaluation of the beneficial and other effects of dietary nitrate. Proceedings of International Fertiliser Society, 456: 1-22
- Lešić R., Borošić J., Buturac I., Ćustić M., Poljak M., Romič D. 2004. Povrčarstvo. Čakovec, Zrinski: 576-576
- Levin S. A., Mooney H. A., Field C. 1989. The dependence of plant root:shoot ratios on internal nitrogen concentration. Annals of Botany, 64: 71-75
- Madhavi, D.L., Singhal R.S., Kulkarni P.R. 1996. Technological aspects of food antioxidants. V: Food antioxidants: technological toxicological, and health perspective. Madhavi D.L., Deshpande S.S., Salunkhe D.K. (eds.). New York, Marcel Dekker: 159-265
- Mariotti A., Germon J. C., Hubert P., Kaiser P., Letolle R., Tardieu A., Tardieu P. 1981 Experimental determination of nitrogen kinetic isotope fractionation: some principles; illustration for the denitrification and nitrification. Plant and Soil, 62, 3: 413-430
- Marschner H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. 2nd ed. London, Academic Press: 889 str.
- Mihelič R., Čop J., Jakše M., Štampar F., Majer D., Tojnko S., Vršič S. 2010. Smernice za strokovno uteviljeno gnojenje. Ljubljana, Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano: 124-126
- Mitscherlich, E.A. 1954. Bodenkunde für Land- und Forstwirte, Forstwirte und Gärtner in pflanzenphysiologischer Ausrichtung und Auswertung. Berlin, Parey: 327 str.
- Molk T. 2011. Karakterizacija plodov paprike s stabilnimi izotopi ogljika in dušika. Diplomsko delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Oddelek za živilstvo: 60 str.
- Mondy N.I., Connie M., Plasted R.L. 1971. Potato flavor as related to chemical composition. Journal of Food Science, 36, 3: 459-461
- Osborne C.P., Freckleton R.P. 2009. Ecological selection pressures for C4 photosynthesis in the grasses. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 276, 1663: 1753-1760
- Olsthoorn A.F.M., Tiktak A. 1991. Fine root density and root biomass of two Douglas-fir stands on sandy soils in the Netherlands. Netherlands Journal of Agricultural Science, 39: 61-77
- Osvald J., Kogoj-Osvald M. 1998. Pridelovanje zelenjave na vrtu. Ljubljana, ČZP Kmečki glas: 241 str.

- Oxtoby D. W., Gills H. P., Campion A. 2008. Principles of modern chemistry. Belmont, Thomson Higher Education: 295-295
- Pavlek P. 1988. Specijalno povrčarstvo. Zagreb, Sveučilište u Zagrebu: 384-384
- Pryor W.A. 1994. Free radicals and lipid peroxidation: what they are and how they got that way, V: Natural antioxidants in human health and disease. Frei B. (ed.). San Diego, Academic Press: 1-24
- R-Biopharm AG. 2013. UV method for the determination of nitrate (NO_3^-) in foodstuffs and other materials. Darmstadt, R-Biopharm AG: 5 str.
http://www.food-diagnostics.se/files/enzymatiska/Nitrate_EN_10905658035_2011-07.pdf (15.3.2103).
- Santamaria P. 2006. Nitrate in vegetables: toxicity, content, intake and EC regulation. Journal of the Science of Food and Agriculture, 86: 10-17
- Santamaria P., Elia A., Serio F. Todaro E. 1999. A survey of nitrate and oxalate content in fresh vegetables. Journal of the Science of Food and Agriculture, 79, 13: 1882-1888
- Scalbert A., Johnston I.T., Saltmarsh M. 2005. Polyphenols: antioxidants and beyond. American Journal of Clinical Nutrition, 81: 215-217
- Scharpf H. C. 1991. Nutrient influences on the nitrate content of vegetables. Proceedings of the International Fertiliser Society, 313: 1-24
- Scheidegger Y., Saurer M., Bahn, M., Siegwolf R., 2000. Linking stable oxygen and carbon isotopes with stomatal conductance and photosynthetic capacity: a conceptual model. Oecologia, 125: 350–357
- Smirnoff N., Stewart G.R. 1985. Nitration assimilation and translocation by higher plants: Comparative physiology and ecological consequences. Physiologia Plantarum, 64, 133-140 cit. po Orea A., Pajuelo P., Romero J. M., Márquez A. J. 2005. Nitrate assimilation: influence of the nitrogen supply. V: Lotus japonicus handbook. Marquez A. J. (ed.). Dordrecht, Springer: 315-328
- Steingröver E. 1986. Nitrate accumulation in spinach: Uptake and reduction of nitrate during a dark or a 'low light' night period. Plant and Soil, 91, 3: 429-432
- Suhadolc M., Rupreht J., Zupan M. 2006 Študijsko gradivo za vaje iz pedologije za strokovni študij agronomije. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 54 str.
- SURS. 2012. Ekološko kmetijstvo, Slovenija, 2011 - končni podatki. Ljubljana, Statistični urad Republike Slovenije: 2 str.
http://www.stat.si/novica_prikazi.aspx?id=4791 (15.3.2013)

- Taiz L., Zeiger E. 2006. Plant physiology. 4th ed. Massachusetts, Sinauer Associates, Publishers: 215-216
- Uno G., Storey R., Moore R. 2001. Principles of botany. New York, The McGraw Hill Companies: 240-241, 245-249
- Vodnik D. 2012. Osnove fiziologije rastlin. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 141 str.
- Ward M.H., Brender J.D. 2011. Drinking water nitrate and health. V: Encyclopedia of environmental health. Nriagu J. O. (ed.) London, Elsevier Science: 167-178
- Willer H. 2012. The european market for organic food. Landbau, FiBL: 15 str.
<http://www.organic-world.net/fileadmin/documents/yearbook/2012/2012-02-16/willer-2012-02-16-session-global-market.pdf> (31.1.2013)
- Zhao X., Cerey E., Young W., Iwamoto T. 2007. Influences of organic fertilization, high tunnel environment, and postharvest storage on phenolic compounds in lettuce. HortScience, 42: 71-76
- Zhao D., Reddy K.R., Kakani V.G., Reddy V.R. 2005. Nitrogen deficiency effects on plant growth, leaf photosynthesis, and hyperspectral properties of sorghum. European Journal of Agronomy, 22: 391-403

ZAHVALA

Mentorju prof. dr. Rajku Vidrihu in somentorici doc. dr. Nini Kacjan Maršić se zahvaljujem za pomoč in svetovanje pri izvedbi diplomskega dela, prof. dr. Tatjani Košmerl hvala za natančno recenzijo.

Izr. prof. dr. Nives Ogrinc in tehničnemu sodelavcu Stojanu Žigonu iz Inštituta Jožef Štefan se zahvaljujem za pomoč pri analizi stabilnih izotopov ogljika in dušika.

Zahvaljujem se tudi tehnični sodelavki Zdenki Zupančič za pomoč v laboratoriju in Mateju Slaku za vso pomoč pri izvedbi praktičnega dela diplomske naloge.

Lini Burkan Makivić hvala za natančen pregled besedila diplomskega dela.

Posebno se zahvaljujem družini za vso podporo in potrpljenje v času študija in Hani za neizmerno zaupanje in podporo.