

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Matej SLAK

**KARAKTERIZACIJA ŠPINAČE S POMOČJO  
STABILNIH IZOTOPOV OGLJIKA IN DUŠIKA**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Matej SLAK

**KARAKTERIZACIJA ŠPINAČE S POMOČJO STABILNIH  
IZOTOPOV OGLJIKA IN DUŠIKA**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

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

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2015

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 znanosti o okolju Instituta »Jožef Stefan«.

Za mentorja diplomskega dela je imenovan prof. dr. Rajko Vidrih, za somentorico izr. prof. dr. Nives Ogrinc in za recenzentko prof. dr. Tatjana Košmerl.

Mentor: prof. dr. Rajko Vidrih

Somentorica: izr. prof. dr. Nives Ogrinc

Recenzentka: prof. dr. Tatjana Košmerl

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisani se strinjam z objavo svojega dela na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddal v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Matej Slak

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ŠD | Dn                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| DK | UDK 635.41:631.8:641.1:543.067(043)=163.6                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| KG | špinača/ <i>Spinacia oleracea</i> L./ekološka pridelava/konvencionalna pridelava/gnojila/stabilni izotopi ogljika in dušika/fenolne spojine/nitratni dušik/nitritni dušik/amonijev dušik/antioksidativni potencial/IRMS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| AV | SLAK, Matej                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| SA | VIDRIH, Rajko (mentor)/OGRINC, Nives (somentorica)/KOŠMERL, Tatjana (recenzentka)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| KZ | SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| ZA | Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| LI | 2015                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| IN | KARAKTERIZACIJA ŠPINAČE S POMOČJO STABILNIH IZOTOPOV OGLJIKA IN DUŠIKA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| TD | Diplomsko delo (univerzitetni študij)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| OP | IX, 50 str., 11 pregl., 22 sl., 78 vir.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| IJ | sl                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| JI | sl/en                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| AI | <p>Namen diplomskega dela je bila karakterizacija špinače s stabilnimi izotopi ogljika in dušika v odvisnosti od načina pridelave (organsko, konvencionalno). Špinačo (<i>Spinacia oleracea</i> L.), ki smo jo uporabili za vzorec, smo pridelali sami. Za to smo uporabili presajeno in posušeno zemljo, katera že vsaj pet let ni bila pognojena. Vzorce špinače smo razvrstili v 6 skupin. Ena skupina je služila kontroli, brez dodatka gnojil, ostalim pa smo dodali organsko, mineralno gnojilo ali kombinacijo obeh vrst gnojil. V vzgojenih rastlinah smo z metodo masne spektrometrije za analitiko stabilnih izotopov lahkinih elementov (angl. Isotope Ratio Mass Spectrometry –IRMS) določali izotopsko sestavo ogljika in dušika in ugotavljali ali je ta metoda primerna za ločevanje med ekološko in konvencionalno pridelano špinačo. Poleg izotopske sestave smo v vzorcih določali tudi vsebnost skupnih fenolov, vsebnost amonijevega iona, nitrita in nitrata ter antioksidativni potencial. Vse dobljene rezultate smo statistično obdelali. Rastline gnojene z mineralnimi gnojili so dosegle večjo maso in so vsebovale več nitritnega, nitratnega ter amonijevega dušika. Rastline gnojene z organskim gnojilom pa so imele višji antioksidativni potencial ter nižje vrednosti nitritnega, nitratnega in amonijevega dušika. Določitev vrednosti <math>\delta^{15}\text{N}</math> se je izkazala kot najbolj učinkovita metoda za razlikovanje ekološke in integrirane pridelave špinače, saj smo pri špinači gnojeni z organskimi gnojili dobili statistično značilno višje vrednosti <math>\delta^{15}\text{N}</math>. Vrednosti <math>\delta^{15}\text{N}</math> organsko pridelanih rastlin so variirale med 7,8 in 8,6 ‰, medtem ko so se vrednosti konvencionalno pridelanih rastlin gibale med 2,0 in 2,9 ‰.</p> |

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC UDC 635.41:631.8:641.1:593.067(043)=163.6  
CX spinach/*Spinacia oleracea* L./ecological agriculture/conventional agriculture/fertilizers/stable isotopes of carbon and nitrogen/total polyphenols/nitrate nitrogen/nitrite nitrogen/ammonium nitrogen/antioxidant potential/IRMS  
AU SLAK, Matej  
AA VIDRIH, Rajko (supervisor)/OGRINC, Nives (co-advisor)/KOŠMERL, Tatjana (reviewer)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology  
PY 2015  
TI CHARACTERIZATION OF SPINACH WITH STABLE CARBON AND NITROGEN ISOTOPES  
DT Graduation thesis (University studies)  
NO IX, 50 p., 11 tab., 22 fig., 78 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB The purpose of the thesis was to characterize spinach with stable carbon and nitrogen isotopes with respect to the agriculture production practice (organic, conventional). The spinach (*Spinacia oleracea* L.) used in the experiment was cultivated in dry soil that was not fertilized for at least 5 years. The spinach was classified in 6 groups. One group of spinach served as a control group (without added fertilizers), while in other groups either organic or mineral fertilizers or mixture of both was added. We used stable carbon and nitrogen isotope analysis performed by Isotope Ratio Mass Spectrometry (IRMS) in order to test if the method is suitable to differentiate between organically and conventionally cultivated spinach. Additionally, the content of total phenolics, ammonium, nitrite and nitrate ions and antioxidant activity was measured. All analyzed parameters were statistically evaluated with different methods. The use of synthetic fertilizers resulted in better growth of plants and higher average contents of nitrite, nitrate and ammonia nitrogen. On the other hand, the use of organic fertilizers resulted in higher antioxidant activity and lower content of nitrite, nitrate and ammonia nitrogen. Stable nitrogen measurement turned out to be the best tool for differentiation between organically and conventionally cultivated spinach. Our experiment showed that organically fertilized plants had statistically significant higher  $\delta^{15}\text{N}$  values ranging between 7.8 and 8.6 ‰.  $\delta^{15}\text{N}$  values of conventionally cultivated plants were statistically significant lower, namely between 2.0 and 2.9 ‰.

## KAZALO VSEBINE

|                                                               |             |
|---------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>              | <b>III</b>  |
| <b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>                          | <b>IV</b>   |
| <b>KAZALO VSEBINE .....</b>                                   | <b>V</b>    |
| <b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>                                | <b>VII</b>  |
| <b>KAZALO SLIK .....</b>                                      | <b>VIII</b> |
| <b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>                             | <b>IX</b>   |
| <b>1 UVOD .....</b>                                           | <b>1</b>    |
| 1.1 NAMEN DELA.....                                           | 2           |
| 1.2 DELOVNE HIPOTEZE .....                                    | 2           |
| <b>2 PREGLED OBJAV .....</b>                                  | <b>3</b>    |
| 2.1 EKOLOŠKO KMETIJSTVO .....                                 | 3           |
| 2.2 RAZLIKE MED EKOLOŠKIM IN KONVENCIONALNIM KMETIJSTVOM..... | 3           |
| 2.3 ZGODOVINA ŠPINAČE .....                                   | 4           |
| 2.4 BOTANIČNA OPREDELITEV ŠPINAČE.....                        | 4           |
| 2.5 ZAHTEVE ŠPINAČE GLEDE PRIDELAVE.....                      | 5           |
| 2.5.1 Temperatura .....                                       | 5           |
| 2.5.2 Rastna doba .....                                       | 5           |
| 2.5.3 Tla .....                                               | 5           |
| 2.5.4 Vlaga.....                                              | 5           |
| 2.5.5 Gnojenje .....                                          | 5           |
| 2.5.6 Spravilo .....                                          | 6           |
| 2.5.7 Škodljivci in bolezni špinače.....                      | 6           |
| 2.6 PREHRANSKA VREDNOST ŠPINAČE .....                         | 6           |
| 2.7 POMEN MAKRO- IN MIKROELEMENTOV .....                      | 7           |
| 2.7.1 Funkcija makro- in mikroelementov .....                 | 8           |
| 2.7.2 Pomen dušika v rastlinah.....                           | 9           |
| 2.7.2.1 Asimilacija nitrata .....                             | 9           |
| 2.7.2.2 Asimilacija amonija.....                              | 9           |
| 2.7.2.3 Kroženje dušika v naravi .....                        | 10          |
| 2.7.3 Vpliv dušika na zdravje ljudi .....                     | 11          |
| 2.7.4 Pomen ogljika v rastlinah .....                         | 11          |
| 2.7.4.1 Calvinov cikel ali C <sub>3</sub> .....               | 11          |
| 2.7.4.2 Hatch-Slackov cikel ali C <sub>4</sub> rastlin.....   | 12          |
| 2.7.4.3 CAM cikel .....                                       | 13          |
| 2.8 ANTIOKSIDANTI.....                                        | 13          |
| 2.9 FENOLI.....                                               | 14          |
| 2.9.1 Flavonoidi.....                                         | 15          |
| 2.10 STABILNI IZOTOPI IN NJIHOVA PORAZDELITEV V NARAVI .....  | 16          |
| 2.11 FRAKCIONACIJA IZOTOPOV .....                             | 17          |
| 2.11.1 Frakcionacija ogljikovega izotopa .....                | 18          |
| 2.11.2 Frakcionacija dušikovega izotopa.....                  | 18          |
| 2.12 ANALITIKA STABILNIH IZOTOPOV Z METODO IRMS .....         | 18          |

|          |                                                                                                                             |           |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>3</b> | <b>MATERIAL IN METODE.....</b>                                                                                              | <b>20</b> |
| 3.1      | VZORCI.....                                                                                                                 | 20        |
| 3.1.1    | Opis gnojil.....                                                                                                            | 20        |
| 3.1.1.1  | Entec perfect.....                                                                                                          | 20        |
| 3.1.1.2  | Fertildung Stallatico umificato pellettato.....                                                                             | 20        |
| 3.1.1.3  | Kristalon modri (Yara, Norveška).....                                                                                       | 20        |
| 3.1.1.4  | Plantella Organik Unichem.....                                                                                              | 20        |
| 3.1.1.5  | Kombinacija gnojenja z organskim in mineralnim gnojilom.....                                                                | 21        |
| 3.1.2    | Gojenje špinače.....                                                                                                        | 21        |
| 3.2      | PRIPRAVA VZORCEV ZA ANALIZE.....                                                                                            | 23        |
| 3.3      | FIZIKALNO-KEMIJSKE METODE.....                                                                                              | 24        |
| 3.3.1    | Določanje antioksidativnega potenciala v špinači z radikalom DPPH <sup>•</sup> .....                                        | 24        |
| 3.3.2    | Določanje vsebnosti skupnih fenolov.....                                                                                    | 25        |
| 3.3.3    | Določanje vsebnosti nitratnega in nitritnega dušika ter amonijevega dušika.....                                             | 28        |
| 3.3.1    | Določanje $\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{15}\text{N}$ vrednosti v vzorcih špinače z metodo IRMS (AOAC 998.12, 1999)..... | 29        |
| 3.3.2    | Določanje $\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{15}\text{N}$ vrednosti v gnojilih z metodo IRMS (AOAC 998.12, 1999).....        | 30        |
| 3.4      | STATISTIČNA ANALIZA.....                                                                                                    | 30        |
| <b>4</b> | <b>REZULTATI.....</b>                                                                                                       | <b>31</b> |
| 4.1      | REZULTATI MERITEV ŠTEVILA RASTLIN, SKUPNE TEŽE RASTLIN IN POVPREČNE TEŽE RASTLIN ŠPINAČE.....                               | 31        |
| 4.2      | REZULTATI POSAMEZNIH FIZIKALNO-KEMIJSKIH ANALIZ.....                                                                        | 33        |
| 4.2.1    | Skupni fenoli in antioksidativni potencial.....                                                                             | 33        |
| 4.2.2    | Nitratni, nitritni in amonijev dušik v špinači.....                                                                         | 35        |
| 4.2.3    | Vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{15}\text{N}$ v rastlinah špinače.....                                           | 36        |
| 4.2.1    | Vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{15}\text{N}$ v gnojilih.....                                                    | 38        |
| 4.3      | REZULTATI STATISTIČNE ANALIZE.....                                                                                          | 38        |
| 4.3.1    | Korelacije med posameznimi parametri.....                                                                                   | 38        |
| <b>5</b> | <b>RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>                                                                                              | <b>39</b> |
| 5.1      | RAZPRAVA.....                                                                                                               | 39        |
| 5.1.1    | Vpliv gnojenja na doseženo maso rastlin.....                                                                                | 39        |
| 5.1.2    | Vpliv gnojenja na izotopsko sestavo ogljika.....                                                                            | 39        |
| 5.1.3    | Vpliv gnojenja na izotopsko sestavo dušika.....                                                                             | 40        |
| 5.1.4    | Skupni fenoli.....                                                                                                          | 40        |
| 5.1.5    | Antioksidativni potencial.....                                                                                              | 41        |
| 5.1.6    | Vsebnost nitratnega in nitritnega dušika.....                                                                               | 41        |
| 5.1.7    | Vsebnost amonijevega dušika.....                                                                                            | 42        |
| 5.2      | SKLEPI.....                                                                                                                 | 43        |
| <b>6</b> | <b>VIRI.....</b>                                                                                                            | <b>44</b> |
|          | <b>ZAHVALA</b>                                                                                                              |           |

## KAZALO PREGLEDNIC

|                                                                                                                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Preglednica 1: Osnovne razlike med ekološkim in konvencionalnim načinom kmetovanja (Bavec in sod., 2001:22) .....                                                                        | 4  |
| Preglednica 2: Hranilne vrednosti špinače v 100 g špinače (Rubatzky in Yamaguchi, 1997:809) .....                                                                                        | 6  |
| Preglednica 3: Vsebnost nekaterih vitaminov in mineralov v 100 g špinače (Rubatzky in Yamaguchi, 1997:809) .....                                                                         | 7  |
| Preglednica 4: Glavne skupine flavonoidov, njihovi predstavniki in vir v hrani (Nijveldt in sod., 2001:419) .....                                                                        | 16 |
| Preglednica 5: Sestava reagentnih mešanic za umeritveno krivuljo .....                                                                                                                   | 26 |
| Preglednica 6: Povprečne vrednosti in standardni odkloni pri rastlinah špinače gnojene z različnimi gnojili za skupno težo rastlin, število rastlin in povprečno težo špinače .....      | 31 |
| Preglednica 7: Povprečne vrednosti in standardni odkloni rastlin špinače gnojene z različnimi tipi gnojil za skupne fenole in antioksidativni potencial .....                            | 33 |
| Preglednica 8: Povprečne vrednosti in standardni odkloni v rastlinah špinače gnojene z različnimi tipi gnojil za nitratni in nitritni dušik ter amonijev dušik, izražene v (mg/kg) ..... | 35 |
| Preglednica 9: Povprečne vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{15}\text{N}$ ter standardni odkloni v rastlinah špinače, gnojene z različnimi tipi gnojil, izražene v ‰ .....       | 36 |
| Preglednica 10: Vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{15}\text{N}$ v gnojilih .....                                                                                                | 38 |
| Preglednica 11: Pearsonovi koeficienti korelacije med posameznimi parametri .....                                                                                                        | 38 |

## KAZALO SLIK

|                                                                                                                                                                                                        |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Slika 1: Shematični prikaz kroženja dušika v naravi (Hofman in van Cleemput, 2004:2) .....                                                                                                             | 10 |
| Slika 2: Shematični prikaz Calvinovega cikla (Heldt in Piechulla, 2011:165) .....                                                                                                                      | 12 |
| Slika 3: Shematični prikaz Hatch-Slackovega cikla (Goldberg, 2010:135).....                                                                                                                            | 12 |
| Slika 4: Shematični prikaz CAM cikla (Goldberg, 2010:135).....                                                                                                                                         | 13 |
| Slika 5: Osnovno ogrožje flavonoidov (Gülçin, 2012) .....                                                                                                                                              | 15 |
| Slika 6: Strukturna formula flavonov (levo) in strukturna formula flavononov (desno)<br>(Nijveldt in sod., 2001) .....                                                                                 | 16 |
| Slika 7: Strukturna formula katehinov (levo) in strukturna formula antocianinov (desno)<br>(Nijveldt in sod., 2001) .....                                                                              | 16 |
| Slika 8: Shematični prikaz IRMS (Kelly, 2003: 163) .....                                                                                                                                               | 19 |
| Slika 9: Špinača gnojena z gnojilom Organik (levo) in špinača gnojena z gnojilom Stallatico<br>(desno) tik pred pobiranjem na dan 31.5.2011 (foto: Slak M.) .....                                      | 22 |
| Slika 10: Štetje rastlin špinače gnojene z gnojilom Wsf (levo) in štetje špinače gnojene z<br>gnojilom Stallatico (foto: Slak M.) .....                                                                | 23 |
| Slika 11: Vzorec špinače v terilnici prelit s tekočim dušikom (foto: Slak M.) .....                                                                                                                    | 23 |
| Slika 12: Prva umeritvena krivulja za določanje vsebnosti skupnih fenolov v špinači.....                                                                                                               | 27 |
| Slika 13: Druga umeritvena krivulja za določanje vsebnosti skupnih fenolov v špinači .....                                                                                                             | 27 |
| Slika 14: Povprečne skupne teže in standardni odkloni teže špinače, gnojene z različnimi<br>gnojili, izražene v gramih.....                                                                            | 31 |
| Slika 15: Povprečne vrednosti števila vzgojenih rastlin po 8 tednih in standardni odkloni<br>špinače, gnojene z različnimi gnojili.....                                                                | 32 |
| Slika 16: Povprečne teže rastlin in standardni odkloni špinače, gnojene z različnimi gnojili,<br>izražene v gramih .....                                                                               | 32 |
| Slika 17: Povprečne vrednosti in standardni odkloni koncentracije skupnih fenolov v<br>rastlinah špinače, gnojene z različnimi tipi gnojil, izražene v mg ekvivalentov galne<br>kisline na 100 g ..... | 34 |
| Slika 18: Povprečne vrednosti in standardni odkloni antioksidativnega potenciala rastlin<br>špinače, gnojene z različnimi tipi gnojil, izražene v mmol DPPH/100 g.....                                 | 34 |
| Slika 19: Povprečne vrednosti in standardni odkloni vsote koncentracij nitritnega in<br>nitratnega dušika v rastlinah špinače, gnojene z različnimi tipi gnojil, izražene v mg/kg .....                | 35 |
| Slika 20: Povprečne vrednosti in standardni odkloni koncentracije amonijevega dušika v<br>rastlinah špinače, gnojene z različnimi tipi gnojil, izražene v mg/kg .....                                  | 36 |
| Slika 21: Vrednost $\delta^{13}\text{C}$ v vzorcih špinače, gnojene z različnimi gnojili .....                                                                                                         | 37 |
| Slika 22: Vrednost $\delta^{15}\text{N}$ v vzorcih špinače, gnojene z različnimi gnojili.....                                                                                                          | 37 |

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

|                       |                                                                                                             |
|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| $\delta^{13}\text{C}$ | izotopska sestava ogljika, izražena v promilih (‰)                                                          |
| $\delta^{15}\text{N}$ | izotopska sestava dušika, izražena v promilih (‰)                                                           |
| AOP                   | antioksidativni potencial                                                                                   |
| HPLC                  | tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (angl. High Performance Liquid Chromatography)                 |
| IRMS                  | masna spektrometrija za analizo stabilnih izotopov lahkih elementov (angl. Isotope Ratio Mass Spectrometry) |
| KON                   | kontrolni vzorec                                                                                            |
| $\text{N}_2$          | atmosferski dušik                                                                                           |
| $\text{NH}_4^+$       | amonijev ion                                                                                                |
| NO                    | dušikov oksid                                                                                               |
| $\text{NO}_2^-$       | nitritni ion                                                                                                |
| $\text{NO}_3^-$       | nitratni ion                                                                                                |
| NR                    | nitrat reduktaza                                                                                            |
| NRT1                  | nitratni transporter 1 (angl. Low Affinity Transport System)                                                |
| NRT2                  | nitratni transporter 2 (angl. High Affinity Transporter System)                                             |
| Org                   | gnojilo Plantella Organik Unichem                                                                           |
| Org + min             | kombinacija gnojila Plantella Organik in Kristalon modri                                                    |
| PEP                   | fosfoenolpiruvat karboksilaza                                                                               |
| PEPC                  | fosfoenolpiruvat                                                                                            |
| SF                    | skupni fenoli                                                                                               |
| Wsf                   | gnojilo Kristalon modri (angl. Water soluble fertilizer)                                                    |

## 1 UVOD

Ljudje v 21. stoletju živimo v informacijski dobi, kjer so informacije dostopne na vsakem koraku zato se ni čuditi dejstvu, da je današnji potrošnik dobro seznanjen o vplivu hrane na zdravje. Na spletu so na voljo raznovrstne prehranske piramide, ki priporočajo povečano uživanje sadja in zelenjave. Omenjeni skupini živil vsebujeta veliko vitaminov, mineralov, fenolnih spojin, antioksidantov in prehranske vlaknine, ki pripomorejo k boljšemu zdravju. Špinača spada med listnato zelenjavo, ki vsebuje veliko vode in ima nizko energijsko vrednost. Bogata je s karotenoidi, vitamini (C in K) in minerali (Fe in Ca) (Hedges in Lister, 2007).

Dobro informiran potrošnik se zaveda pomena zdrave in varne hrane, zato se je v zadnjem času zanimanje za ekološko pridelano hrano povečalo. Ekološki pridelovalci si prizadevajo za trajnostni razvoj in pridelavo varne, visoko kakovostne hrane. Do tega je privedlo večje povpraševanje in zanimanje potrošnikov za izbiro zdrave hrane, ki ima večjo prehransko vrednost v primerjavi z živili pridelanimi na konvencionalni način. Današnji potrošnik želi izvedeti več informacij o pridelavi zelenjave, kje in na kakšen način je bila pridelana in je pripravljen plačati več za kakovostnejšo hrano (Bavec in Bavec, 2007). Toda kljub višji ceni sadja in zelenjave to še ne pomeni, da je bila hrana resnično pridelana na ekološki način. To je privedlo do uvedbe nadzora nad pridelovalci in iskanju metod s katerimi je možno določiti parametre, ki služijo razlikovanju ekološko in konvencionalno pridelane hrane. Šturm in Lojen (2011) sta z analitiko stabilnih izotopov določali vrednosti  $\delta^{15}\text{N}$  in ugotovili, da ima ekološko pridelana zelenjava višje vrednosti v primerjavi s konvencionalno pridelano.

Povečano povpraševanje po zdravi prehrani je privedlo do porasta ekoloških pridelovalcev. Ekološko kmetijstvo je v EU postalo eno izmed najbolj dinamičnih kmetijskih dejavnosti, saj je med letoma 1993 in 1998 poraslo za 25 %. Vendar ekološki pridelovalci še vedno predstavljajo samo 3 % vseh kmetijskih pridelovalcev v EU (Bavec in Bavec, 2007). V Sloveniji začetki ekološkega kmetijstva segajo v 90. leta prejšnjega stoletja. Ekološki kmetje so oblikovali združenje ekoloških kmetov Slovenije. Kmetije, ki so v Registru ekoloških kmetij pa so morale pridobiti certifikat, ki zagotavlja pristnost njihovih pridelkov (Bavec in sod., 2001).

Sam sistem ekološkega kmetovanja ni samo proces, ki uporablja naravne metode gnojenja in kroženja snovi v naravi, temveč dovoljuje tudi stalno dosledno kontrolo pridelave in predelave pridelkov in živil, s čimer se zagotavlja večjo varnost potrošnikom, ki se odločijo za tako pridelana živila. Organizacije za kontrolo in certificiranje sprotno skrbijo za stalni nadzor pridelovanja, na podlagi katerega potem lahko izdajo certifikat ekološke pridelave v skladu z določenimi predpisi. Število ekoloških pridelovalcev oziroma kmetij in pridelovalcev v Sloveniji letno narašča. Po podatkih Ministrstva za kmetijstvo in okolje

je bilo leta 1998 v kontrolo vključenih le 41 kmetijskih gospodarstev ali pridelovalcev. V letu 2013 pa že kar 3049, kar še vedno predstavlja majhen delež oziroma le 4,1 % vseh kmetijskih gospodarstev v Sloveniji. Obstoječe ekološke kmetije so večinoma usmerjene v pridelovanje mesnih izdelkov, kljub temu, da je povpraševanje potrošnikov največje po svežem sadju in zelenjavi. Iz tega sklepamo, da se povečanje ekoloških pridelovalcev pričakuje tudi v prihodnjih letih (MKGP, 2014).

## 1.1 NAMEN DELA

Namen diplomskega dela je bil ugotoviti, ali je določanje izotopske sestave dušika in ogljika v špinači primerno za ločevanje med rastlinami, pridelanimi na ekološki način (z uporabo organskih gnojil) in rastlinami, pridelanimi na konvencionalni način (z uporabo mineralnih gnojil). Poleg določanja izotopske sestave smo analizirali vrednosti nekaterih drugih parametrov, in sicer vsebnost nitratnega in nitritnega dušika, amonijevega dušika, skupnih polifenolov in antioksidativni potencial. Te vrednosti so nam pomagale pri ugotavljanju ali je špinača, pridelana na ekološki način kakovostnejša od špinače, pridelane na konvencionalni način, saj so omenjeni parametri pomembni za oceno kakovosti.

## 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- delež izotopa  $^{15}\text{N}$  je manjši v konvencionalno pridelani špinači
- ekološko pridelana špinača ima višji antioksidativni potencial
- ekološka pridelana špinača ima večjo vsebnost skupnih fenolnih spojin
- vsebnost nitritnega, nitratnega in amonijevega dušika je večja v špinači pridelani na konvencionalni način

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 EKOLOŠKO KMETIJSTVO

Osnovna načela ekološkega kmetijstva so varovanje narave, preprečevanje škodljivih vplivov na okolje in pokrajino, ohranjanje biološke raznolikosti, skrb za pitno vodo in pridelava visoko kakovostne hrane. V skladu s tem je namen ekološkega kmetijstva uporaba naravnih metod gnojenja, izboljšanje naravnih virov ter zmanjšanje onesnaževanja okolja. Pri ekološkem načinu kmetovanja je prepovedana uporaba sintetičnih insekticidov, fungicidov, herbicidov in gnojil. Poleg tega je prepovedana uporaba sintetičnih dodatkov in regulatorjev rasti, antibiotikov ter hormonov za povečanje proizvodnje živalskih proizvodov. Ekološko kmetijstvo prav tako ne dovoljuje uporabe gensko spremenjenih organizmov (Bavec in Bavec, 2007). Pri zaščiti rastlin pred boleznimi, škodljivci in pleveli, se uporabljajo mehanični načini zatiranja (vabe, odstranjevanje plevela, lepljive plošče, ipd.), poslužujemo se pravilne obdelave tal in izbiramo odpornejše sorte. Dovoljena je uporaba sredstev za varstvo rastlin na podlagi bakra, žvepla, piretrina, mineralnega in parafinskega olja, krompirjevega dekstrina, ipd. (Bavec in sod., 2001).

### 2.2 RAZLIKE MED EKOLOŠKIM IN KONVENCIONALNIM KMETIJSTVOM

Ekološko kmetijstvo se od drugih načinov pridelovanja hrane razlikuje predvsem v tem, da spodbuja uporabo obnovljivih virov ter organskih gnojil. Posebna skrb pri proizvodnji živalskih produktov, kot je meso, je namenjena dobremu počutju živalim in uporabi krme, pridelane na ekološki način. Ekološki način pridelave hrane spoštuje naravne zakonitosti preprečevanja bolezni in škodljivcev ter se tako izogiba uporabi sintetičnih pripravkov za zatiranje le-teh. Priporoča se uporaba mehanskih tehnik, ki temeljijo na preventivnih načinih varovanja rastlin in pripomorejo k zmanjšanju onesnaženja okolja (Bavec in Bavec, 2007). Pri ekološkem kmetijstvu rodovitnost tal izboljšujemo z uporabo organskih gnojil ter kolobarja, pri konvencionalnem načinu kmetovanja pa tla izboljšujemo z dodajanjem umetnih mineralnih gnojil. Prehrana rastlin je, v nasprotju kot pri ekološkem načinu, dostopna rastlinam v nespremenjeni obliki, torej z uporabo lahko topnih mineralnih gnojil. Za zatiranje bolezni, škodljivcev in plevela se uporabljajo fitofarmacevtska sredstva. Ekološko kmetovanje temelji na naravnih danostih, je do okolja prijazno in usmerjeno k trajnostnem razvoju (temelji na kroženju snovi v sklenjenem krogu tla-rastline-živali-človek). Živila pridobljena v ekološki pridelavi so pridelana na okolju prijazen način in so zagotovilo za zdravo prehranjevanje, kar pa današnji potrošniki vse bolj iščejo in cenijo. Intenzivno kmetovanje temelji na manjši porabi delovnega časa na enoto pridelka, na lažjem delu in cenejšem pridelku, hkrati pa se na varstvo okolja pretirano ne ozira (Bavec in sod., 2001). V preglednici 1 so podane temeljne razlike med ekološkim in konvencionalnim načinom kmetovanja.

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

|                              | <b>Ekološko kmetijstvo</b>                                                | <b>Konvencionalno kmetijstvo</b>                                                 |
|------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| Izboljšanje rodovitnosti tal | Uporaba kolobarja, organskih gnojil                                       | Uporaba mineralnih gnojil                                                        |
| Prehrana rastlin             | Hranila se postopoma spuščajo iz gnojila                                  | Hranila dostopna rastlinam v nespremenjeni obliki                                |
| Varstvo rastlin              | Odpravljanje vzrokov, preprečitev nastanka bolezni, škodljivcev, plevelov | Uporaba fitofarmacevtskih sredstev za zatiranje škodljivcev, plevelov in bolezni |
| Živinoreja                   | Živalim primerna prosta reja                                              | Baterijska reja perutnine, reja živali v zaprtih prostorih                       |
| Prehrana živali              | Kakovostna doma pridelana hrana                                           | Dopolnilni dodatki krme (beljakovinski in vitaminski dodatki)                    |
| Zdravljenje živali           | Preventivno povečanje odpornosti                                          | Zdravljenje bolezenskih znakov                                                   |

### 2.3 ZGODOVINA ŠPINAČE

Špinačo (*Spinacia oleracea* L.) so prvič omenjali že v kitajskih zapisih v 7. stoletju, prav tako so jo poznali že Perzijci. Ime *Spinacia* izvira iz latinskega imena *spina*, *oleracea* pa izvira iz Španije. V Španijo so špinačo v 12. stoletju prinesli Mavri, od tu pa se je razširila tudi drugod po Evropi. Izvorna špinača je imela bodičasta oziroma trnasta semena, kasneje se je s križanjem uveljavila špinača z gladkimi semeni. Sredi 13. stoletja so se prvi zapisi o špinači pojavili v Nemčiji, v 15. stoletju pa so jo poznali tudi v Angliji in Franciji. V Severno Ameriko so špinačo prinesli ameriški kolonisti (Nonnecke, 1989). V 16. stoletju je bila špinača že toliko razširjena, da je začela izpodrivati druge listnate rastline, ki so jih do tedaj gojili po vrtovih, predvsem lobodo in blitvo (Černe, 1998).

### 2.4 BOTANIČNA OPREDELITEV ŠPINAČE

Špinača spada v družino metlikovk oziroma lobodovk (latinsko *Chenopodiaceae*). Je enoletna listnata rastlina, katero pridelujemo izključno zaradi njenih listov. Špinača požene veliko plitvih stranskih korenin, ki se razvijejo iz glavne korenine (Rubatzky in Yamaguchi, 1997). Ima kratko steblo z rozetasto oblikovanimi listi, ki so lahko rahlo podolgovate, koničaste ali zaobljene oblike (Osvald in Kogoj – Osvald, 2005). Na število in velikost listov vpliva prostor, ki ga ima rastlina na voljo za rast ter okoljski dejavniki. Rob listov je lahko gladek ali valovit, površina listov pa je gladka do zgubana (Rubatzky in Yamaguchi, 1997). Špinača je tetramorfna rastlina, kar pomeni, da obstajajo štiri različne vrste rastline, in sicer ekstremno moške rastline, vegetativne moške rastline, enodomne rastline in ženske rastline (Osvald in Kogoj – Osvald, 2005). Bolj priljubljene so ženske in vegetativne moške rastline, ker so večje, donosnejše in kasneje cvetijo (Rubatzky in Yamaguchi, 1997).

## 2.5 ZAHTEVE ŠPINAČE GLEDE PRIDELAVE

### 2.5.1 Temperatura

Optimalna temperatura za vznik semen je 20 °C, za rast špinače pa 18 – 20 °C. Pri 10 °C je rast špinače upočasnjena, če pa je rastlina na nizke temperature prilagojena, lahko prenese temperature tudi do -10 °C. Temperatura nima vpliva samo na rast špinače, ampak tudi na kakovost njenih listov. Nizke temperature povzročijo, da so listi špinače debelejši, a manjši in bolj gladki (Rubatzky in Yamaguchi, 1997).

### 2.5.2 Rastna doba

Rastlina doseže tehnološko zrelost v 35 – 60 dneh po setvi v jesenskem in spomladanskem času. Pri prezimnem pridelovanju pa po 200 dneh (Osvald in Kogoj – Osvald, 2005).

### 2.5.3 Tla

Špinača uspeva na različnih tleh, vendar je najbolj primerna zemlja, ki ima veliko sposobnost zadrževanja vode in drenaže. Ker je špinača občutljiva na kislost zemlje, je najbolj optimalno gojenje špinače na tleh z rahlo kislim do nevtralnimi značajem (pH vrednost 6,5 – 8,0) (Rubatzky in Yamaguchi, 1997). Če je zemlja prekisla je potrebno apnenje. Pomemben faktor pri setvi je sončna lega zemljišča, saj lahko na taki legi pridelamo kvalitetnejše pridelke z nižjo vsebnostjo nitratov v primerjavi s senčnimi legami (Osvald in Kogoj – Osvald, 2005).

### 2.5.4 Vlaga

Za dobro rast in dobre pridelke moramo imeti 60 – 70 % vlažnost tal, ter 80 – 85 % relativno zračno vlago. Pri avgustovski setvi je po vzniku pomembno namakanje tal (Osvald in Kogoj – Osvald, 2005).

### 2.5.5 Gnojenje

Špinača večino svoje mase pridobi tik preden pobereмо pridelek. Da zadostimo potrebam hitre rasti, špinačo gnojimo. Poleg tega je gnojenje pomembno, da dosežemo zeleno maso listov. Ker špinačo po navadi gojimo v zimskem času, lahko z uporabo dušikovih gnojil povečamo pridelek, saj je nitrifikacija (oksidacija amoniaka) pri nižjih temperaturah manjša (Rubatzky in Yamaguchi, 1997). Po navadi ne gnojimo s hlevskim gnojem (če že, uporabimo dobro kompostiran hlevski gnoj). Pred setvijo gnojimo z mineralnimi gnojili. Povprečno gnojimo z 70-90 kg/ha dušika (N), 60 kg/ha fosforja (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) ter 140 kg/ha kalija (K<sub>2</sub>O) (Osvald in Kogoj – Osvald, 2005).

### 2.5.6 Spravilo

Ko špinača doseže primerno velikost, lahko začnemo s pobiranjem pridelka. Velikost rastline je odvisna od sezonskih dejavnikov in temperature. Večina rastlin je primerna za pobiranje ko razvijejo 5 do 8 listov, povprečno pa špinača od setve do pobiranja doseže okoli 25 listov (Rubatzky in Yamaguchi, 1997). Rastline pospravljamo zjutraj ali zvečer, vendar pazimo, da so rastline suhe in da jih ne tlačimo (Osvald in Kogoj – Osvald, 2005). Če s pobiranjem pridelka odlašamo lahko povečamo njegovo količino, vendar hkrati negativno vplivamo na kakovost. Spravljena špinača je lahko pokvarljiva zaradi visoke stopnje oksidacije (Rubatzky in Yamaguchi, 1997). Da ohranimo kakovost špinače jo moramo skladiščiti pri ustrezni temperaturi (0 °C) ter visoki relativni zračni vlagi (Nonnecke, 1989). Pri temperaturi 0 °C ter relativni zračni vlagi 95 % je taka špinača obstojna 10 dni (Rubatzky in Yamaguchi, 1997).

### 2.5.7 Škodljivci in bolezni špinače

Špinača dobro raste v pogojih, ki spodbujajo rast različnih trav, predvsem različnih vrst amaranta. Skupaj s špinačo pogosto rastejo sezonske trave, grint, portulak, pirika ter metlika. Za kontrolo in omejevanje rasti omenjenih trav se poslužujemo predvsem presajanja špinače ter uporabo razpršil, da trave zatremo že v kali. Špinačo napadajo tudi različni insekti, med njimi so najpogostejše listne uši, gosenice, pršice ter ličinke. Za kontrolo teh škodljivcev uporabljamo insekticide ter kolobarjenje. Pri špinači so pogoste tudi različne bolezni, kot so rastlinska snet in različne plesni. Poleg tega se na listih špinače lahko pojavijo nezaželene pike kot posledica plesni *Alternaria spinaciae* (Rubatzky in Yamaguchi, 1997), korenine in semena pa pogosto napade gniloba (Nonnecke, 1989).

## 2.6 PREHRANSKA VREDNOST ŠPINAČE

Špinača je prehransko zelo bogato živilo. Vsebuje veliko vitaminov in mineralov, ki telo varujejo pred nastankom bolezni in so nujno potrebni za normalno delovanje bioloških funkcij. Vsebuje tudi fitonutriente, ki preprečujejo nastanek kroničnih srčnih obolenj, rakavih obolenj in pomagajo pri ostalih zdravstvenih težavah povezanih s staranjem (Hedges in Lister, 2007).

**Preglednica 2: Hranilne vrednosti špinače v 100 g špinače (Rubatzky in Yamaguchi, 1997:809)**

| Energijska vrednost (kcal/100g) | 25   |
|---------------------------------|------|
| Ogljikovi hidrati (g/100 g)     | 4    |
| Beljakovine (g/100 g)           | 3,20 |
| Maščobe (g/100 g)               | 0,33 |
| Vlaknina (g/100 g)              | 0,65 |

Iz preglednice 2 je razvidno, da je energijska vrednost špinače 25 kcal/100 g živila. Od tega je največ ogljikovih hidratov, in sicer 4 g/100 g. Poleg tega 100 g špinače vsebuje 3,20 g beljakovin, 0,33 g maščob ter 0,65 g vlaknine.

Špinača je izredno bogata s karotenoidi, poleg tega vsebuje veliko železa. Glavni mikronutrienti so vitamin A (iz  $\beta$ -karotena), C vitamin in vitamin K ter folat. Glavni minerali prisotni v špinači so kalcij, železo in kalij. Ostali nutrienti so prisotni v manjših količinah, in sicer vitamin E, vitamin B<sub>1</sub> (tiamin), vitamin B<sub>2</sub> (riboflavin), vitamin B<sub>6</sub> ter minerali kot so magnezij, mangan in cink. Špinača vsebuje tudi veliko vlaknin, dodatna prednost pa je tudi nizka kalorična vrednost (Hedges in Lister, 2007). V preglednici 3 so zbrane vsebnosti nekaterih vitaminov in mineralov v špinači.

**Preglednica 3: Vsebnost nekaterih vitaminov in mineralov v 100 g špinače (Rubatzky in Yamaguchi, 1997:809)**

| <b>Vitamini</b>        |              |
|------------------------|--------------|
| Vitamin A              | 7045 $\mu$ g |
| Vitamin C              | 50 mg        |
| Vitamin B <sub>1</sub> | 0,4 mg       |
| Vitamin B <sub>2</sub> | 0,2 mg       |
| Niacin                 | 0,6 mg       |
| <b>Minerali</b>        |              |
| Kalcij                 | 107 mg       |
| Fosfor                 | 57 mg        |
| Kalij                  | 605 mg       |
| Natrij                 | 110 mg       |
| Magnezij               | 92 mg        |
| Železo                 | 2,7 mg       |

## 2.7 POMEN MAKRO- IN MIKROELEMENTOV

Rastline vsebujejo majhne količine več kot 90 elementov, vendar je med njimi le 17 nujno potrebnih (esencialnih) za rast rastlin (Epstein in Bloom, 2004). Mednje sodijo ogljik (C), vodik (H), dušik (N), kisik (O), fosfor (P), žveplo (S), kalij (K), kalcij (Ca), magnezij (Mg), baker (Cu), cink (Zn), železo (Fe), mangan (Mn), molibden (Mo), bor (B), klor (Cl) in nikelj (Ni) (Fageria in sod., 2010).

Esencialni elementi naj bi ustrezali naslednjim kriterijem (Arnon in Stout, 1939):

- pomanjkanje elementa vodi v abnormalno rast, prezgodnje odmrtnje rastline ali prekinitve celičnega cikla,
- element je sestavni del rastline (molekule ali organske strukture), ki je za rastlino nujno potreben (npr. N v beljakovinah),
- element je neposredno vključen v rast rastline.

Esencialne mineralne elemente lahko glede na količino, ki jo rastlina potrebuje, razdelimo v dve skupini. Tiste elemente, ki jih rastlina potrebuje v večjih količinah imenujemo makroelementi, medtem ko elemente, ki so za rast potrebni v manjših količinah imenujemo mikroelementi. Med makroelemente spadajo ogljik, vodik, dušik, kisik, fosfor, žveplo, kalij, kalcij in magnezij. Preostale elemente, baker, cink, železo, molibden, mangan, bor, klor in nikelj pa prištevamo med mikroelemente (Fageria in sod., 2010). Klor rastline absorbirajo v velikih količinah, vendar spada med mikroelemente zaradi tega, ker ga rastlina nujno potrebuje le v manjših količinah. Pomanjkanje klora pa se le redkokdaj opazi (Fageria in sod., 2002).

### **2.7.1 Funkcija makro- in mikroelementov**

Mineralni elementi, kot so dušik, žveplo in fosfor, so osnovni gradniki beljakovin in nukleinskih kislin. Ostali mineralni elementi, na primer magnezij in drugi esencialni mikroelementi služijo kot gradniki organskih struktur, predvsem encimov, kjer so posredno ali neposredno vpleteni v encimsko aktivnost. Izjema sta klor in kalij, ki sta edina elementa, ki ne služita kot gradnika organskih molekul rastlin. Omenjena elementa igrata pomembno vlogo pri osmoregulaciji, ohranjanju elektrokemijskega ravnotežja celic ter uravnavanju encimske aktivnosti. (Marschner, 1995). Elementi, kot so baker, železo, mangan, nikelj in cink so esencialni, vendar lahko za rastlino pri določeni vrednosti postanejo toksični. Rastline absorbirajo tudi ne- esencialne elemente, kljub temu, da ti elementi ne prispevajo k boljšemu metabolizmu rastline. Že zelo nizke vrednosti teh elementov (Ce, Cr, Cd in La) so lahko za rastline toksične (Kötschau in sod., 2012).

Glede na biokemijske in fiziološke poti, v katerih makro- in mikroelementi sodelujejo jih razdelimo v 4 skupine (Mengel in sod., 2001):

- Skupina 1: C, H, O, N in S: elementi, ki služijo kot osnovni gradniki organskih molekul ter sodelujejo v encimskih in redoks reakcijah
- Skupina 2: P in B: elementa, ki sodelujeta v reakcijah prenosa energije in reakcijah esterifikacije
- Skupina 3: K, Ca, Mg, Mn in Cl: elementi, ki igrajo pomembno vlogo v osmoregulaciji ter ohranjanju elektrolitskega ravnotežja
- Skupina 4: Fe, Cu, Zn in Mo: elementi, ki so prenašalci elektronov; imenujemo jih tudi kelati.

Čeprav so mikroelementi v rastlinah prisotni le v majhnih količinah, je njihova vloga v rastlinah izjemno pomembna. Pri rastlinah se pogosto lahko pojavi pomanjkanje mikroelementov kot posledica povečane potrebe hranil zaradi intenzivnega načina pridelave, gojenje pridelkov na osiromašeni zemlji, uporabe gnojil z majhno vsebnostjo hranil ter zmanjšane uporabe živalskega gnoja in komposta (Fageria in sod., 2002).

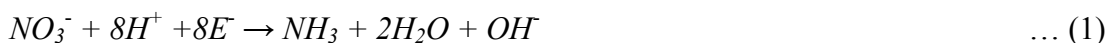
## 2.7.2 Pomen dušika v rastlinah

Dušik je sestavni del večine rastlinskih struktur, kot so klorofil, encimi ter proteini. V primerjavi z ostalimi esencialnimi elementi, ga rastline potrebujejo v velikih količinah, saj spodbuja rast korenin ter razvoj rastlin in privzem drugih hranil. Suh rastlinski material vsebuje od 1 do 4 % dušika, od tega ga največ, in sicer 5 % najdemo v stročnicah (Hofman in van Cleemput, 2004).

Rastline lahko dušik absorbirajo v anorganski ali organski obliki (Wirén in sod., 1997). Glavni vir anorganskega dušika sta nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) in amonij ( $\text{NH}_4^+$ ) (Marschner, 1995), organskega pa urea in aminokisline (Wirén in sod., 1997). S prilagajanjem na različna okolja so razvile različne mehanizme absorbiranja dušika, kot sta na primer absorpcija nitrata in fiksacija dušika, nekatere pa se poslužujejo celo mesojedstva (Wirén in sod., 1997). Večina amonija se že v koreninah vključi v organske spojine, medtem ko se nitrat lahko shranjuje v vakuolah korenin, poganjkov in skladiščnih organih rastline (Marschner, 1995) ali pa se v citosolu reducira v nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ). Zaradi tega rastline teoretično raje absorbirajo dušik v obliki amonija, saj za njegovo vključitev v rastlinske sestavne dele redukcija ni potrebna. V dobro prepustnih tleh je oksidacija  $\text{NH}_4^+$  hitra in je posledično vsebnost  $\text{NO}_3^-$  v zemlji večja. Poleg tega je nitrit v zemlji bolj mobilni, kar pospeši njegovo absorpcijo v rastline (Hofman in van Cleemput, 2004).

### 2.7.2.1 Asimilacija nitrata

Absorpcija nitrata v rastline poteka s prisotnostjo nitratnih transporterjev NRT1 (LATS- angl. Low Affinity Transport System) in NRT2 (HATS- angl. High Affinity Transport System) (Miller in sod., 2007). Po tem ko rastline absorbirajo  $\text{NO}_3^-$  se le ta shrani v vakuole rastlin ali pa se v citosolu reducira v  $\text{NO}_2^-$  s pomočjo encima nitrat reduktaza (NR). Nato nitrit vstopi v kloroplast in se pretvori v amonijev ion ( $\text{NH}_4^+$ ) s pomočjo encima nitrit reduktaza (NiR). Reakcija redukcije nitrata do amoniaka je prikazana z enačbo 1.



Nitrat reduktaza je kompleksni encim, ki se nahaja v citoplazmi rastlin. Kot donor elektronov pri omenjenem encimu služita NADH oziroma NADPH. Medtem se nitrit reduktaza nahaja v kloroplastih ter koreninah rastlin in elektrone pridobi od ferodoksina.

### 2.7.2.2 Asimilacija amonija

Amonijeve ione rastline absorbirajo preko korenin, amoniak pa nastane z redukcijo nitrata (enačba 1) ali s fiksacijo dušika. Medtem ko nitrat za rastline ni toksičen, sta amonij ter

zlasti njegov ravnotežni partner amoniak (enačba 2) toksična že pri relativno nizkih koncentracijah.

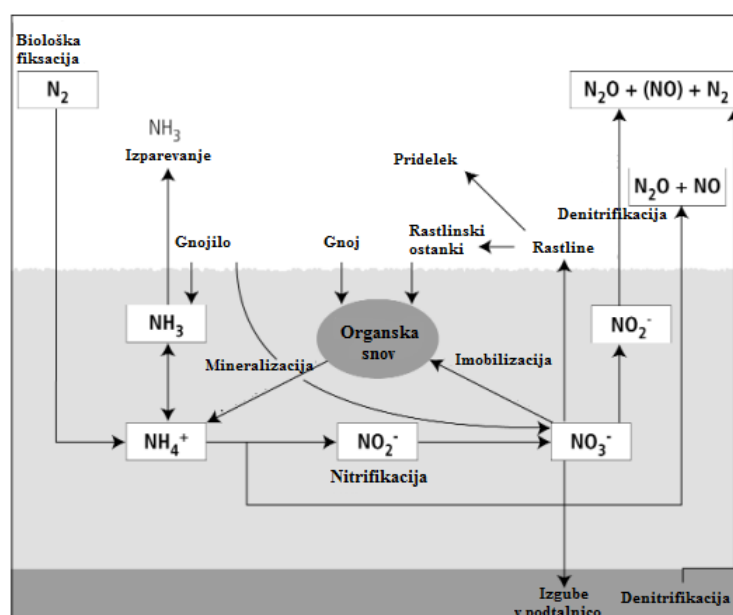


Glavne poti detoksifikacije amonijevih ionov ter amoniaka vključujejo sintezo aminokislin, amidov in sorodnih spojin. Ključno vlogo igrata glutamat in glutamin v tako imenovani glutamin sintaza-glutamat sintaza poti, kjer sta pomembna encima glutamin sintetaza in glutamat sintaza (Marschner, 1995).

Številni avtorji navajajo, da rastline lažje prenašajo pomanjkanje kisika, če so gnojene z dušikovimi gnojili (Trought in Drew, 1981; Allegre in sod., 2004; Thomas in Sodek, 2005; Horchani in sod., 2010). Tako je na primer v raziskavah Horchani in sod. (2010) ter Thomas in Sodek (2005) uporaba nitrata kot gnojila pri pridelavi soje in paradižnika ugodno vplivala na različne rastne parametre. Tako gnojene rastline sta imeli boljši koreninski sistem, večjo površino listov in boljše razmerje poganjek/korenina.

### 2.7.2.3 Kroženje dušika v naravi

Da rastline lahko uporabijo atmosferski dušik ( $N_2$ ), se mora slednji najprej pretvoriti v  $NO_3^-$ . V procesu biološke fiksacije se  $N_2$  pretvori v  $NH_4^+$ , ki v rastlinah sodeluje v mnogih biokemijskih procesih. V odmrlih tkivih sproščeni dušik ni dostopen, zato v procesu mineralizacije pride do pretvorbe dušika najprej v  $NH_4^+$  ter nato v procesu nitrifikacije do  $NO_3^-$ . V anaerobnih pogojih se nastali  $NO_3^-$  v procesu denitrifikacije pretvori v dušikov oksid (NO) ter končno v  $N_2$ , ki se vrne v atmosfero. (Hofman in van Cleemput, 2004).



Slika 1: Shematični prikaz kroženja dušika v naravi (Hofman in van Cleemput, 2004:2)

### 2.7.3 Vpliv dušika na zdravje ljudi

Rastline predstavljajo največji dnevni delež vnosa nitrata v človeško telo (Eichholzer in Gutzwiller, 1988). Večja vsebnost nitratov v zelenjavi je škodljiva za človeško zdravje predvsem zaradi večjega tveganja nastanka rakavih obolenj želodca in motenj ščitnice (Hernandes-Ramires in sod., 2010). Večji vnos nitrata predstavlja tveganje za nastanek methemoglobinemije, saj iz nitrata nastane nitrit, le ta pa se veže na hemoglobin. Nastane methemoglobin na katerega se kisik ne more vezati, kar privede do cianoze.



Temu pojavu so najbolj podvrženi dojenčki. Smrtna doza za dojenčke je 60 % nastalega methemoglobina (Hill, 1999).

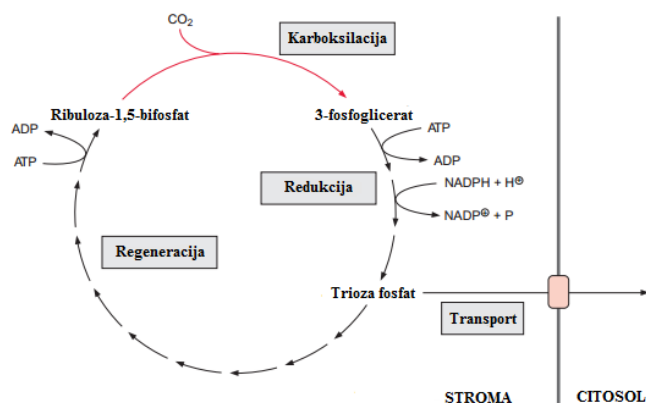
Reducirani nitrat v kitajskem zelju povečuje tveganje nastanka različnih obolenj, saj je bilo kitajsko zelje (*Brassica campestris* L. ssp. *Chinesis* (L.)) z raziskavo klasificirano kot zelenjava z visoko vsebnostjo nitrata (1500 – 4000 mg N/kg) (Reinink in Eenink, 1988).

### 2.7.4 Pomen ogljika v rastlinah

Vnos ogljika in sinteza ogljikovih spojin se pri rastlinah začne s fotosintezo. Prvi korak fotosinteze je absorpcija svetlobe s klorofilom. Kloroplast je eden najpomembnejših celičnih organelov, saj za biosintetske poti (redukcija žvepla in nitrata, sinteza lipidov in aminokislin ter fiksacija CO<sub>2</sub>) uporablja ATP in NADPH. Fiksacija CO<sub>2</sub> je mogoča le v prisotnosti svetlobe, ki aktivira encime potrebne za nastanek obeh oblik energije ATP in NADPH, ki se ob tem porabljata (Leegood, 2004). Rastline lahko glede na fotosintetsko pot fiksacije ogljikovega dioksida klasificiramo v C<sub>3</sub> in C<sub>4</sub> rastline. Rastline, katerih prvi stabilni produkt fotosinteze je spojina s tremi C atomi se imenujejo C<sub>3</sub> rastline, medtem ko rastline katerih prvi stabilni produkt fotosinteze je spojina s štirimi C atomi, imenujemo C<sub>4</sub> rastline (Wang in sod., 2012).

#### 2.7.4.1 Calvinov cikel ali C<sub>3</sub>

V Calvinovem ali C<sub>3</sub> ciklu se atmosferski CO<sub>2</sub> takoj po vstopu v kloroplast veže na ribulozo-1,5-difosfat. Reakcijo katalizira encim ribuloza-1,5-bifosfat-karboksilaza (rubisco) (Boyer, 2005) in poteka v mezofilnih celicah (Wang in sod., 2012). Nastala ribuloza-1,5-bifosfat razpade na dve molekuli 3-fosfoglicerata, ta pa se reducira do gliceraldehida-3-fosfata (Boyer, 2005).

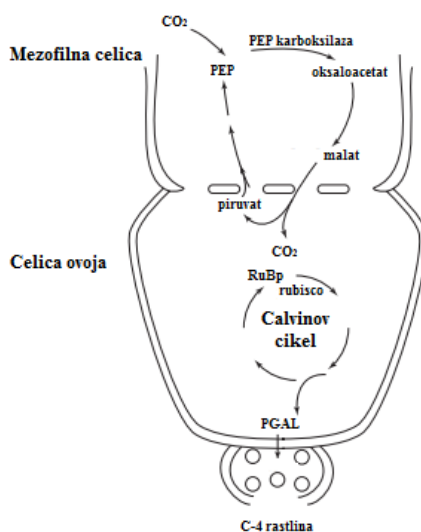


Slika 2: Shematični prikaz Calvinovega cikla (Heldt in Piechulla, 2011:165)

#### 2.7.4.2 Hatch-Slackov cikel ali C<sub>4</sub> rastlin

C<sub>4</sub> cikel je posebna oblika fotosinteze, ki poteka v listih C<sub>4</sub> rastlin, med katere spadajo tropske trave kot sta kornjača in sladkorni trs, ki sta eni najpomembnejših rastlinskih vrst (Dermastia, 2007). Fiksacijo ogljikovega dioksida v C<sub>4</sub> rastlinah katalizira encim fosfoenolpiruvat karboksilaza (PEPC), pri čemer iz fosfoenolpiruvata (PEP) in CO<sub>2</sub> nastane oksaloacetat. Ta se pretvori v malat, ki se premakne v celice ovoja, tam pa se malat dekarboksilira, pri čemer nastane piruvat in CO<sub>2</sub>. Slednji se vključi v Calvinov cikel, piruvat pa se v mezofilnih celicah uporabi za regeneracijo PEP (Wang in sod., 2012).

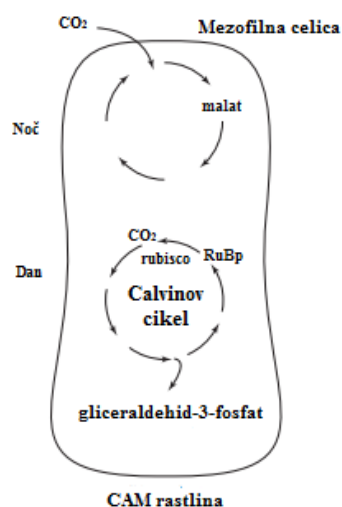
Rastline, ki so razvile fotosintetsko pot C<sub>4</sub> bolje rastejo v suhem in vročem podnebju. S sposobnostjo koncentriranja CO<sub>2</sub> v okolici encima rubisca, poskrbijo, da so listne reže bolj zaprte, s tem pa preprečijo večje izgube vode v vročih dneh (Leegood, 2004; Uno in sod., 2001).



Slika 3: Shematični prikaz Hatch-Slackovega cikla (Goldberg, 2010:135)

#### 2.7.4.3 CAM cikel

CAM (*Crassulacean acid metabolism*) rastline lahko uporabljajo oba cikla vezave CO<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> in C<sub>4</sub> cikel, kar je posledica evolucijske prilagoditve rastlin v okolju, kjer voda ni zelo dostopna (Leegood, 2004). Rastline so sposobne ponoči fiksirati CO<sub>2</sub>, pri čemer nastane jabolčna kislina, ki se skladišči v celičnih vakuolah. Podnevi, ko so listne reže zaprte, se jabolčna kislina dekarboksilira, pri čemer se sprošča CO<sub>2</sub>, ki vstopa v Calvinov cikel. V procesu glikolize iz škroba ali drugih skladiščnih ogljikovih hidratov nastane fosfoenolpiruvat. Ta se dekarboksilira, pri tem pa se regenerirajo tri ogljikovi atomi (Black in Osmond, 2003).



Slika 4: Shematični prikaz CAM cikla (Goldberg, 2010:135)

## 2.8 ANTIOKSIDANTI

Hrana vsebuje preko 25.000 bioaktivnih snovi, od katerih mnoge igrajo pomembno vlogo v procesih, ki so povezani s številnimi boleznimi. Največji vir bioaktivnih snovi so rastline, zato jih imenujemo fitonutrienti. Večino slednjih predstavljajo antioksidanti (Dasgupta in Klein, 2014).

Raziskave na področju antioksidantov in prostih radikalov v devetdesetih letih so vodile do odkritja novih znanj o prostih radikalih in njihovi vpletenosti v metabolizem organizmov in procese staranja (Ramarathnam in sod., 1996). Oksidativni stres, ki ga povzroča reaktivna oblika kisika igra pomembno vlogo pri nastanku mnogih kroničnih in degenerativnih obolenj kot so kardiovaskularna obolenja, rakavost, sladkorna bolezen, staranje in nevrodegenerativna obolenja (Azizova, 2002; Young in Woodside, 2001). Reaktivna oblika kisika, ki se sproži v procesu metabolizma lahko povzroči peroksidacijo lipidne membrane in vodi v akumulacijo lipidnih peroksidov (Ramarathnam in sod., 1996). Najbolj pogoste oblike reaktivnega kisika so superoksidni radikal, vodikov peroksid,

hidroksi prosti radikal, prosti kisik in dušikov oksid, ki imajo visoko biološko aktivnost tako *in vivo* kot *in vitro*. Te spojine lahko neposredno vodijo do DNK mutacij, spremembe izražanja genov, spremembe prenašanja signalov v celicah, celične apoptoze, peroksidacije lipidov in razgradnje beljakovin (Nordberg in Arner, 2001).

Osnovna funkcija antioksidantov je preprečitev oksidacije molekul in posledično zmanjšanje škodljivega učinka te reakcije. Delujejo na principu inhibicije začetka verižne reakcije oksidacije z lovljenjem prostih radikalov (Namiki, 1990). Njihova ključna vloga je tako preprečiti škodljive učinke reaktivne oblike kisika in posledično preprečitev razvoja degenerativnih bolezni (Shahidi, 1996). Antioksidativna aktivnost je ključnega pomena za življenje, saj nevtralizira močno oksidirano okolje v živih celicah (Velioglu in sod., 1998). Pozitivne strani antioksidacije so tudi preprečitev mutacij, rakotvornosti in staranja (Cook in Samman, 1996).

Med naravne antioksidante spada širok spekter fenolnih spojin, dušikovih spojin in karotenoidov (Velioglu in sod., 1998). Sadje in zelenjava predstavljata le majhen delež zaužite energije, vendar je njihov prispevek za človekovo zdravje veliko večji od kaloričnega vnosa. K ugodnemu učinku na zdravje človeka prispevajo predvsem vitamini, kot so askorbinska kislina in tokoferoli ter provitamini kot so karotenoidi. Poleg tega pa sadje in zelenjava vsebujeta veliko fenolnih spojin (Loliger, 1992), ki imajo veliko antioksidativno učinkovitost (Ho, 1992; Velioglu in sod., 1998; Kähkönen in sod., 1999). Cao in sod. (1996) so odkrili, da ima zelenjava, kot so zeleni ohrovt, pesa, paprika, brokoli, špinača, šalotka, krompir, korenje in zelje veliko antioksidativno aktivnost.

## 2.9 FENOLI

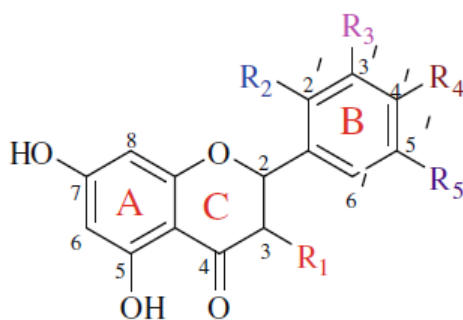
Fenolne spojine so spojine, ki jih sestavljajo eden ali več aromatskih obročev, na katere je vezana ena ali več hidroksilnih skupin. Mednje sodijo fenolne kisline, flavonoidi, stilbeni, kumarini in tanini. Med omenjenimi skupinami, fenolne kisline vključujejo 2 podskupini, in sicer derivate hidroksibenzojske in hidroksicinamične kisline. V naravi običajno najdemo spojine z več hidroksilnimi spojinami, zato se je zanje uveljavilo tudi ime polifenoli. Fenolne spojine so sekundarni metaboliti spojin, ki ščitijo rastline pred UV žarki ter določenimi patogeni. Poleg tega so raziskave pokazale, da fenolne spojine varujejo pred različnimi boleznimi, kot so rakava obolenja, kardiovaskularne bolezni, sladkorna bolezen, hipertenzija, astma ter celo pred infekcijami, če jih zaužijemo v zadostni količini (Dagupta in Klein, 2014).

Bogat vir fenolnih spojin so grozdje, hruške in češnje, saj vsebujejo od 200 do 300 mg polifenolnih spojin/100 g sadja. Kozarec rdečega vina ali skodelica čaja pa lahko vsebuje več kot 100 mg teh spojin. Veliko vsebnost antioksidantov vsebujejo tudi stročnice in čokolada. Do danes je bilo karakteriziranih že več kot 8000 polifenolnih spojin. V kavi je

pomemben vir antioksidantov kofeinska kislina, med najpomembnejše antioksidante pa spada resveratrol, ki ga uvrščamo med stilbene in se nahaja v grozdju in rdečem vinu. Med karotenoidi je najbolj zastopan antioksidant  $\beta$ -karoten, sledijo mu likopen, lutein,  $\beta$ -kriptooksantin in staksantin. Karoteni dajejo rastlinam tipične barve; na primer, likopen je zaslužen za rdečo barvo paradižnika, lubenice, papaje, grenivke in marelice (Dasgupta in Klein, 2014).

### 2.9.1 Flavonoidi

Flavonoidi so polifenolne spojine, ki so zgrajene iz 15 ogljikovih atomov, urejenih v difenilpropransko ogrodje ( $C_6C_3C_6$ ) (Abram in Simčič, 1997). Osnovno strukturo flavonoidov sestavljata dva aromatična obroča (obroč A in B), ki sta povezana preko oksidiranega heterocikličnega obroča (obroč C). Aromatska obroča B in C nastaneta iz prekursorja fenilalanina, obroč A pa nastane iz acetyl-CoA (Goodwin in Mercer, 1983). Osnovno ogrodje flavonoidov (2-fenilbenzopiron) je predstavljeno na sliki 5.

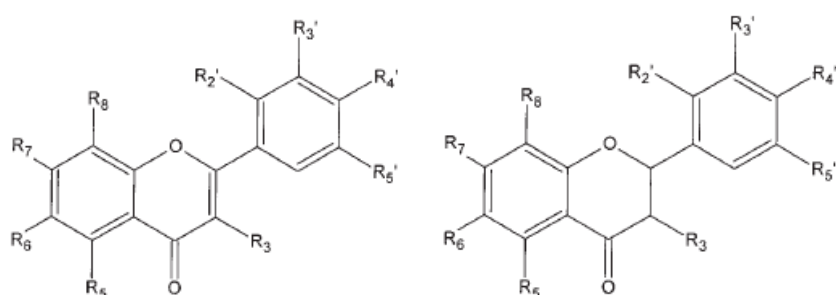


Slika 5: Osnovno ogrodje flavonoidov (Gülçin, 2012)

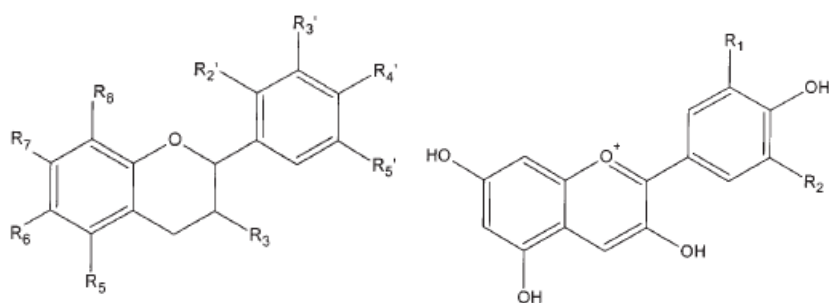
Flavonoide glede na molekulsko strukturo razdelimo v štiri glavne skupine: flavoni, flavanoni, katehini in antocianini. Glavni predstavniki posameznih skupin flavonoidov in njihov vir v hrani so predstavljeni v preglednici 4, njihove strukturne formule pa so grafično predstavljene na slikah 6 in 7.

**Preglednica 4: Glavne skupine flavonoidov, njihovi predstavniki in vir v hrani (Nijveldt in sod., 2001:419)**

| Skupina     | Predstavniki           | Vir v hrani                                    |
|-------------|------------------------|------------------------------------------------|
| Flavoni     | kampferol, quercetin   | jagodičevje, brokoli, čebula, peteršilj, olive |
| Flavanoni   | fisetin, narigin       | citrusi                                        |
| Katehini    | katehin, epikatehin    | rdeče vino, čaj                                |
| Antocianini | cianidin, pelargonidin | maline, češnje, rdeče vino, grozdje            |



**Slika 6: Strukturna formula flavonov (levo) in strukturna formula flavononov (desno) (Nijveldt in sod., 2001)**



**Slika 7: Strukturna formula katehinov (levo) in strukturna formula antocianinov (desno) (Nijveldt in sod., 2001)**

## 2.10 STABILNI IZOTOPI IN NJIHOVA PORAZDELITEV V NARAVI

Stabilni izotopi so izotopi elementa, ki ne razpadejo tekom radioaktivnih procesov. Mnogi elementi imajo več stabilnih izotopov. Vodik ima dva stabilna izotopa, in sicer  $^1\text{H}$  in  $^2\text{H}$  (devterij). Ogljik in dušik imata prav tako dva različna stabilna izotopa, in sicer  $^{12}\text{C}$  in  $^{13}\text{C}$  ter  $^{14}\text{N}$  in  $^{15}\text{N}$ , kisik pa zastopajo trije stabilni izotopi  $^{16}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$  in  $^{18}\text{O}$ . Stabilni izotopi se od radioaktivnih izotopov ločijo po tem, da sčasoma ne razpadejo, medtem ko imajo

radioaktivni izotopi omejeno življenjsko dobo in z razpadom oblikujejo nov element. Življenjske dobe različnih radioaktivnih izotopov se med seboj razlikujejo, tako da razpad nekega izotopa lahko traja od nekaj milisekund do tisočletja (Ghidini in sod., 2006).

Analitika stabilnih izotopov je uporabna za določitev sledljivosti oziroma geografskega porekla in s tem avtentičnosti nekega proizvoda. V živilih se najpogosteje določa sestavo vodikovih, ogljikovih, dušikovih, žveplovih in kisikovih izotopov. Razmerje vsebnosti stabilnih izotopov oziroma vsebnost težjega izotopa glede na lažji izotop izražamo z vrednostjo  $\delta$ . Le ta nam predstavlja relativno razliko izotopske sestave preiskovanega vzorca (vz) glede na izbrani standard (st) in je izražena v promilih (‰):

$$\delta = \frac{R(vz) - R(st)}{R(st)} \times 1000 \quad \dots(4)$$

V enačbi 4, vrednost R ponazarja razmerje med težjim in lažjim izotopom ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ). Nacionalni inštitut za standarde in tehnologijo iz ZDA (NIST) in Mednarodna agencija za atomsko energijo na Dunaju (IAEA) sta določila mednarodne standarde, ki so točno določene homogenizirane spojine. To pomeni, da so izbrani tako, da imajo izotopska razmerja čim bolj podobna povprečni razširjenosti določenega izotopa v naravi (Engel in Macko, 1993). Delta  $\delta$  vrednost vsakega standarda je definirana z 0 ‰. Negativne vrednosti pomenijo, da vsebuje vzorec manj težkega izotopa kot standard, pozitivne pa, da ga vsebuje več. Za dušik je privzet standard zračni dušik (AIR), ki ima vrednost  $R_{st} = 0,0036765$  (Coplein, 1996), za ogljik pa je kot privzet karbonatni standard fosila *Belemnite Americana* iz kredne formacije PeeDee iz Južne Kalifornije (PDB – Pee Dee Belemnite), ki ima vrednost  $R_{st} = 0,0112372$  (Craig, 1953). Ker je v naravi količina PDB zelo majhna, so izdelali umetni karbonat z enako sestavo izotopov in ga označili z VPDB (VPDB – Vienna Pee Dee Belemnite) in se vsi rezultati podajajo glede na vrednost VPDB (Coplein, 1996).

Za izotopske sestavo se velikokrat uporablja izraz »osiromašen« s  $^{13}\text{C}$  ali  $^{15}\text{N}$ , kar pomeni, da osiromašena snov vsebuje relativno manj težjega izotopa  $^{13}\text{C}$  ali  $^{15}\text{N}$ . Namesto izraza osiromašen se uporablja tudi »lahek«. Nasprotno velja za substanco, ki vsebuje relativno več težjega izotopa, za katero pravimo, da je »obogatena« ali »težja« (Kukovec, 2006).

## 2.11 FRAKCIONACIJA IZOTOPOV

Frakcionacija je izraz, ki izraža različno izotopsko porazdelitev reaktantov in produktov med reakcijami. Proces, ki vodi do frakcionacije imenujemo izotopski efekt. Ta efekt je povezan z večino kemijskih, fizikalnih in bioloških procesov, ki vključujejo stabilne izotope. Kemijska vez je v molekulah, ki vsebujejo težji izotop elementa močnejša, zato takšne molekule težje razpadejo v primerjavi z molekulami, ki vsebujejo lažji izotop elementa. Kemijska reakcija, v kateri substrat vsebuje lažji izotop je hitrejša v primerjavi z

kemijsko reakcijo, kjer substrat vsebuje težji izotop. Zato pride do različnega razporejanja stabilnih izotopov med substrati in produkti ter posledično razlik v pojavljanju stabilnih izotopov v naravi. Na primer, pojavnost  $^{12}\text{C}$  v naravi znaša 98,89 %,  $^{14}\text{N}$  pa 99,64 %. Poleg tega so tudi fizikalne lastnosti molekule, ki vsebuje težji izotop drugačne v primerjavi z fizikalnimi lastnosti molekule z lažjim izotopom, kar ima za posledico tako imenovano ravnotežno izotopsko frakcionacijo. Do nje pride zaradi različne vezne energije izotopov v spojini (Ghidini in sod., 2006).

### **2.11.1 Frakcionacija ogljikovega izotopa**

V procesu fotosinteze rastline vežejo atmosferski  $\text{CO}_2$ , ki predstavlja edini vir ogljika za rastline. Med fotosintezo prihaja do encimskih in difuznih procesov frakcionacije in posledično različne porazdelitve  $^{13}\text{C}$  med  $\text{C}_3$ ,  $\text{C}_4$  in CAM rastlinami (Badeck in sod., 2005). V metabolizmu  $\text{C}_3$  rastlin encim rubisco, ki je odgovoren za fiksacijo  $\text{CO}_2$  med fotosintezo, močno diskriminira težji izotop  $^{13}\text{C}$  (Boyer, 2005), zato izotopska sestava variira med -35 in -21 ‰ (Badeck in sod., 2005).  $\text{C}_4$  rastline imajo alternativni encim, fosfoenolpiruvat karboksilazo, ki je odgovoren za fiksacijo ogljika. Izotopski efekt, ki je povezan s tem encimom je manjši od izotopskega efekta povezanega z rubisco encimom (Engel in Macko, 1993). Zato imajo  $\text{C}_4$  rastline bolj pozitivno izotopsko sestavo, in sicer v obsegu od -20 in -9 ‰ (Badeck in sod., 2005).

### **2.11.2 Frakcionacija dušikovega izotopa**

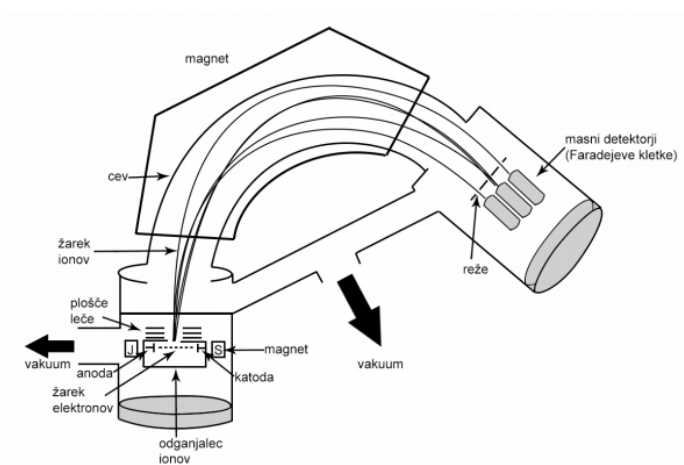
Izotopska frakcionacija, ki poteka v fotosintetskih organizmih v privzemu določenega vira dušika ( $\text{N}_2$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ) povzroči izotopsko diskriminacijo med anorganskim in organskim virom dušika. Med fotosintezo poteka fiksacija anorganskega dušika preko različnih encimskih poti, vendar je razumevanje izotopskih pojavov v zvezi s privzemu dušika še precej v povojih v primerjavi z meritvami encimov, ki fiksirajo ogljikov dioksid. Poleg kinetičnega encimskega efekta ima velik vpliv na frakcionacijo izotopov tudi ravnovesje med  $\text{NH}_4^+$  in  $\text{NH}_3$ . V glutamat se amoniak vključi s pomočjo encima glutamat dehidrogenaze. Glutamin sintetaza je drugi ključni encim pri privzemu amoniaka in je odgovoren za ta proces pri bakterijah in fitoplanktonu.  $\text{NO}_2^-$  in  $\text{NO}_3^-$  sta najprej reducirana z nitrat in nitrit reduktazama do  $\text{NH}_3$ , ki se nato lahko fiksira v organsko snov. Vendar kompleksni reakcijski mehanizmi z vidika izotopske frakcionacije teh dveh encimov niso še povsem pojasnjeni. Podobno velja tudi za fiksacijo atmosferskega dušika, ki poteka s pomočjo encima nitrogenaze (Engel in Macko, 1993).

## **2.12 ANALITIKA STABILNIH IZOTOPOV Z METODO IRMS**

Ker so razlike v razmerju izotopov istega elementa zelo majhne, je za merjenje tako majhnih odstopanj potrebno imeti zelo občutljiv inštrument. Izotopsko sestavo elementov merimo z masnim spektrometrom za analitiko stabilnih izotopov lahkih elementov (IRMS-

angl. Isotope Ratio Mass Spectrometry). Ta naprava najprej ionizira delce (atome, molekule ali fragmente molekul), nato pa snop takih delcev v električnem polju pospeši proti magnetnemu polju, kjer se delci odklonijo. Odklon je odvisen od deleža med maso delca in nabojem ( $m/z$ ). Merjen odklon nam pomaga pri sklepanju za katero zvrst delca ali na masno število izotopa gre. S primerjanjem vzorca s standardom, ki ima natančno znano izotopsko sestavo se natančnost meritve še izboljša (Kelly, 2003).

Poznamo dva tipa IRMS, in sicer z dvojnimi uvajalnimi sistemom in s kontinuirnim pretokom nosilnega plina. V primeru spektrometra z dvojnimi uvajalnimi sistemom vzorec merimo relativno glede na standard, ki ga simultano analiziramo. Medtem ko v primeru spektrometra s kontinuirnim pretokom vzorec uvajamo v masni spektrometer s He. Natančnost je največja prednost spektrometra z dvojnimi uvajalnimi sistemom, medtem ko je prednost spektrometra z dvojnimi pretokom v lažji predpripravi vzorca in številu analiziranih vzorcev (Epstein in Mayeda, 1953).



**Slika 8: Shematični prikaz IRMS (Kelly, 2003: 163)**

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 VZORCI

Špinačo smo gojili med 4. aprilom 2011 in 1. junijem 2011 in pri tem uporabljali različne vrste gnojil. Za gojenje špinače smo uporabili šest litrov zemlje, ki pred tem ni bila gnojena najmanj 5 let. Za poskus smo uporabili 54 loncev, zemljo pa smo pred tem presejali, posušili in ji dodali različna gnojila. Preskušali smo pet različnih gnojil, zato smo zemljo s posameznim gnojilom dodali v devet loncev, ki so predstavljali tri vzorce s tremi paralelkami. Preostalih devet loncev ni vsebovalo gnojila ter so služili kot kontrolni vzorci.

##### 3.1.1 Opis gnojil

###### 3.1.1.1 Entec perfect

Entec perfect (v nadaljevanju Entec) je mineralno gnojilo, kjer je razmerje mineralov dušika, fosforja in kalija (NPK razmerje) 14:7:17 (+2Mg + 11S) in je primerno za gojenje vseh vrst kultur. Za razliko od konvencionalnih mineralnih gnojil, Entec perfect vsebuje stabilizator amonijske oblike dušika, ki se imenuje Entec. Omenjeni stabilizator upočasnjuje delovanje nitrifikacijskih bakterij in omogoča prehod amonijske oblike dušika v nitratno. Gnojilo se uporablja zgodaj spomladi, ko so tla še dovolj vlažna. Podatke o gnojilu smo pridobili na etiketi in v brošuri proizvajalca.

###### 3.1.1.2 Fertildung Stallatico umificato pellettato

Fertildung Stallatico umificato pellettato (v nadaljevanju Stallatico) je organsko gnojilo v obliki pelet, kjer je razmerje mineralov dušika, fosforja in kalija 3:3:3. Sestavljen je iz biološko aktivnega hlevskega gnoja perutnine in goveda. Počasen proces naravnega zorenja zagotavlja visok delež humifikacije. Gnojilo ni termično obdelano, kar zagotavlja pestro mikrofloro. Podatke o gnojilu smo pridobili na etiketi in v brošuri proizvajalca.

###### 3.1.1.3 Kristalon modri (Yara, Norveška)

Kristalon modri (v nadaljevanju Wsf) je vodotopno gnojilo (angl- Water soluble fertiliser) v obliki drobnih kristalov, kjer je razmerje mineralov dušika, fosforja in kalija 19:6:20 (+3Mg +3S). Gnojilo stimulira razvoj listov, zato je namenjeno rastlinam v vegetativni fazi rasti. Podatke o gnojilu smo pridobili na etiketi in v brošuri proizvajalca.

###### 3.1.1.4 Plantella Organik Unichem

Plantella Organik Unichem (v nadaljevanju Organik) je 100 % organsko gnojilo, kjer je razmerje mineralov dušika, fosforja in kalija 3:3:2. Proizvajalec zagotavlja aktivno delovanje več kot pol leta, izboljšanje zračnosti in zadrževanje vode tal ter do 30 % večji pridelek. Gnojilo je oblikovano kot mikropelleta, kar zagotavlja počasno sproščanje hranil,

s tem pa ne pride do spiranja le- teh v podtalnico. Je toplotno obdelano, kar preprečuje prenos bolezni in vnos semen plevelov. Podatke o gnojilu smo pridobili na etiketi in spletni strani proizvajalca.

#### 3.1.1.5 Kombinacija gnojenja z organskim in mineralnim gnojilom

Špinačo smo gnojili tudi z mešanico organskega gnojila Stallatico in mineralnega gnojila Wsf (v nadaljevanju Org + min) v razmerju 1:2, ki sta opisana pod točkama 3.1.1.2 in 3.1.1.3.

### 3.1.2 Gojenje špinače

Za poskus smo uporabili 54 loncev, katere smo razdelili v 6 skupin, tako da je vsaka skupina vsebovala 9 loncev. Ker smo preizkušali 5 različnih gnojil, smo tako za vsako posamezno gnojilo lahko uporabili tri lonce v treh paralelkah. Gnojila Entec, Stallatico in Organik smo pred uporabo zmelili. V vsak posamezni lonec (skupno 54) smo dodali šest kg prehodno presejane in posušene zemlje. V tri skupine po devet loncev smo dodali zatehte gnojil in jih dobro pomešali z zemljo. Gnojilo Wsf smo rastlinam dodajali v obliki vodne raztopine z zalivanjem. Kontrolni skupini vzorcev pa gnojila nismo dodajali. Natančno količino posameznega gnojila smo izračunali glede na Smernice za strokovno utemeljeno gnojenje (Mihelič in sod., 2010), ki navajajo, da je odvoz na 25 ton pridelka špinače 180 kg/ha N, 60 kg/ha P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> in 225 kg/ha K<sub>2</sub>O. Zatehto posamezne vrste gnojila, ki je bila potrebna za gojenje špinače, smo izračunali glede na vsebnost K<sub>2</sub>O v uporabljenih gnojilih, ki je bil glede na postavljen gnojilni odmerek, mejno hranilo v izbranih gnojilih.

Natančne zatehte posameznih gnojil so bile:

- Entec: 0,665 g/(kg zemlje) → 4,0 g/(6 kg zemlje v loncu);
- Stallatico: 3,77 g/(kg zemlje) → 22,6 g/(6 kg zemlje v loncu);
- Org + min: 1,25 g gnojila Stallatico/(kg zemlje) → 7,5 g gnojila Stallatico/(6 kg zemlje v loncu)
- Organik: 5,65 g/(kg zemlje) → 33,9 g/(6 kg zemlje v loncu).

Ko smo pripravili lonce z zemljo in gnojili, smo v vsakega izmed loncev na 12 različnih mest posejali po tri semena špinače. Lonce smo postavili v rastlinjak in jih razporedili tako, da so bile paralelke rastlin (skupine rastlin, gnojene z enako vrsto gnojila), med seboj enakomerno oddaljene v smeri jug – sever. Po postavitvi poskusa smo začeli z zalivanjem. Prvo zalivanje, ki smo ga izvedli na dan postavitve poskusa je bilo obilnejše (1 liter vode na lonec), saj je bila zemlja osušena. Nadaljnjih nekaj tednov smo rastline zalivali s pol litra vode. Zalivanje špinače smo prilagajali glede na klimatske razmere in rast rastline. Zaradi naraščanja temperature in padanja relativne zračne vlažnosti je špinača potrebovala več vode, ki smo jo zagotovili z uporabo večjih količin le-te ter pogostejšim zalivanjem. Sproti smo odstranjevali tudi plevel, da bi rastlinam omogočili nemoten izkoristek gnojila.

Za zalivanje rastlin smo uporabili vodovodno vodo. Vzorce z Wsf gnojilom smo zalivali samo z vodno raztopino z dodatkom Wsf gnojila. Izračunali smo, da rastline potrebujejo 0,565 g Wsf gnojila/kg zemlje, kar ustreza 3,4 g Wsf gnojila/6 kg zemlje. Ker je Wsf vodotopno gnojilo, smo pripravili vodno raztopino s koncentracijo 0,57 g gnojila/l. Ta nam je omogočila, da so rastline v svoji rastni dobi (8 tednov) dobile 12 fertigacij po 0,5 l vodne raztopine in s tem prejele potrebno količino gnojila. Po 21 dneh smo tudi v primeru gnojenja Stallatico + Wsf začeli z dognojevanjem rastlin z vodno raztopino Wsf gnojila z 0,5 l s koncentracijo 0,57 g/l dvakrat tedensko. Do spravila so rastline prejele 8 fertigacij po 0,5 l vodne raztopine Wsf gnojila.



**Slika 9: Špinača gnojena z gnojilom Organik (levo) in špinača gnojena z gnojilom Stallatico (desno) tik pred pobiranjem na dan 31.5.2011 (foto: Slak M.)**

Poskus je potekal brez večjih težav, manjši problem je predstavljal plevel, ki je nekoliko porabljal gnojilo, vendar smo ga sproti uspešno odstranjevali. V osmem tednu (31.5.2011) rasti špinače smo se odločili, da rastline pobereмо, jih čez noč shranimo v hladilnico in naslednji dan nadaljujemo s pripravo vzorcev za fizikalno-kemijske analize. Določali smo antioksidativni potencial, vsebnost skupnih fenolov, vsebnost nitratnega, nitritnega in amonijskega dušika ter določili izotopsko sestavo C in N.

### 3.2 PRIPRAVA VZORCEV ZA ANALIZE

Na dan spravila špinače smo vse rastline iz posameznega lonca prešteli in stehtali. Rastline špinače smo do analiz hranili na hladnem v hladilnici.



**Slika 10: Štetje rastlin špinače gnojene z gnojilom Wsf (levo) in štetje špinače gnojene z gnojilom Stallatico (foto: Slak M.)**

Rastline istega vzorca smo narezali, dali v terilnico, prelili s tekočim dušikom, počakali da so zmrznile in jih strli na majhne koščke. Zamrznjene rastline smo ustrezno označili in jih do analiz hranili v zamrzovalniku.



**Slika 11: Vzorec špinače v terilnici prelit s tekočim dušikom (foto: Slak M.)**

### 3.3 FIZIKALNO-KEMIJSKE METODE

#### 3.3.1 Določanje antioksidativnega potenciala v špinači z radikalom DPPH<sup>•</sup>

##### Princip metode:

Antioksidativni potencial merimo s pomočjo prostega radikala 2,2-difenil-1-pikril-hidrazil (DPPH<sup>•</sup>), ki svetlobo absorbira pri valovni dolžini 517 nm. Ker pride v reakciji med antioksidanti in prostim radikalom DPPH<sup>•</sup> do redukcije slednjega (enačba 5), se absorbanca zmanjša (Brand-Williams in sod., 1995). Z večjo vsebnostjo antioksidantov v preiskovanem vzorcu špinače se proporcionalno zmanjša absorpcija svetlobe pri dani valovni dolžini.



##### Material in oprema:

- reagent DPPH (Sigma, Nemčija)
- metanol (Merck, Nemčija)
- spektrofotometer UV-VIS (Shimadzu, UV-160A)
- ependorfke
- pipete
- kivete

##### Priprava raztopine reagenta:

Pred vsako analizo smo reagentno mešanico pripravili sproti, saj raztopina DPPH ni stabilna. V 100 ml bučko smo zatehtali 4 mg DPPH ter dodali 20 ml metanola. Tako pripravljeni raztopini smo dodajali metanol dokler ni bila izmerjena absorbanca raztopine 1.

##### Potek analize:

V centrifugirke smo zatehtali 5 g predhodno zmrznjene in zdrobljene špinače in vzorec prelili z 10 g raztopine metafosforne kisline. Vzorce špinače smo nato centrifugirali 5 minut (3000 obratov/min), supernatant odlili v tri ependorfke in ponovno centrifugirali 5 minut (14000 obratov/min). Na ta način smo iz vsakega vzorca špinače pripravili 3 paralelke. Končno smo iz posamezne ependorfke odpipetirali 120 µl raztopine in jo v novi ependorfki dodali k 1,5 ml raztopine DPPH. Dobljeno mešanico smo prelili v kiveto, počakali 15 minut in nato izmerili absorbanco pri 517 nm.

##### Referenčna vrednost:

V ependorfko smo dodali 1,5 ml raztopine DPPH in jo zmešali z 120 µl metanola. Tako pripravljeni mešanici smo izmerili absorbanco pri 517 nm.

Slepi vzorec:

V ependorfko smo dodali 1,5 ml metanola in ga zmešali z 120 µl vzorca. Tako pripravljeni mešanici smo izmerili absorbanco pri 517 nm.

Izračun:

$$\Delta A = A(\text{referenčna vrednost}) - A(\text{vzorca}) + A(\text{slepi vzorec}) \quad \dots(6)$$

$$n_{DPPH2}(\text{mol}) = \frac{\Delta A}{\epsilon_{DPPH} \left( \frac{l}{\text{mol} \times \text{cm}} \right) \times L(\text{cm})} \times V_{\text{reak.zmesi}}(l) \quad \dots(7)$$

$$AOP \left( \frac{\text{mmol}}{100\text{g}} \right) = \frac{n \times 1000(\text{mmol})}{V_{\text{pipeta}}(\text{ml}) \times \frac{m_{\text{špinacea}}(\text{g})}{V_{\text{špinacea+mešj.}}(\text{ml})}} \times 100 \quad \dots(8)$$

$$\epsilon_{DPPH} = 12000 \frac{l}{\text{mol} \times \text{cm}} \quad \dots \text{molarna absorptivnost DPPH}$$

L = 1 cm ...dolžina poti žarka

A ...absorbanca

### 3.3.2 Določanje vsebnosti skupnih fenolov

Princip metode:

Ker fenolne spojine absorbirajo svetlobo UV in vidnega spektra, lahko absorbanco, ki jo izmerimo pri določeni valovni dolžini, uporabimo za oceno koncentracije skupnih fenolov. Poleg tega nam odčitana absorbanca služi tudi za oceno vsebnosti nekaterih drugih kemijskih parametrov, kot so skupni fenoli, skupni antocijani, skupne hidroksicimetne kisline itd. (Košmerl in Kač, 2007).

Koncentracijo skupnih fenolov določamo tako, da v vzorec špinacije dodamo Folin-Ciocalteujev reagent, ki v alkalni raztopini oksidira fenolne snovi. Z dodatkom natrijevega karbonata ustvarimo alkalne pogoje za normalen potek oksidacije. Reagent Folin-Ciocalteu je vodna raztopina natrijevega molibdata (VI), natrijevega volframata (VI) in litijevega sulfata (VI); slednji prepreči nastanek oborine reagenta. Natrijev volframat (VI) in natrijev molibdat (VI) sta spojini zaradi katerih poteče oksidacija fenolnih snovi v vzorcu. Za redukcijo teh dveh spojin je nujna prisotnost fenolatnega aniona. Raztopina, ki vsebuje reducirani volframat (VI) in/ali molibdat (VI) je modre barve, raztopina nereducirane oblike pa je rumene barve. Reakcijski mešanici pomerimo absorbanco pri valovni dolžini 765 nm, masno koncentracijo skupnih fenolnih spojin odčitamo iz umeritvene krivulje in rezultat izrazimo kot mg galne kisline/l. Galna kislina služi kot standardna referenčna spojina za določanje skupnih fenolnih spojin (Košmerl in Kač, 2007).

**Materiali in oprema:**

- Folin – Ciocalteujev reagent zmešamo z deionizirano vodo po navodilih proizvajalca (Merck), in sicer v razmerju 1:2
- 20 % raztopina natrijevega karbonata
- Osnovna raztopina galne kisline: 7,8 mg galne kisline raztopimo v 50 ml absolutnega alkohola, odpipetiramo 1 ml te raztopine v 15 ml centrifugirko in dodamo 9 ml deionizirane vode
- Deionizirana voda
- Kivete (10 mm)
- Merilne bučke (100 ml)
- Polnilne pipete (1 ml, 2 ml, 3 ml, 5 ml in 10 ml)
- Puhalka z deionizirano vodo
- UV-VIS spektrofotometer (Shimadzu, UV-160A)

**Umeritvena krivulja:**

V 2 ml centrifugirke smo odpipetirali različne volumne raztopine galne kisline in vode. V vsako posamezno centrifugirko smo nato dodali 300  $\mu$ l Folin- Ciocalteujevega reagenta, jih premešali ter počakali 5 minut. Nato smo dodali še 300  $\mu$ l 20 % raztopine natrijevega karbonata in ponovno premešali. Po 90 minutah smo izmerili absorbanco pri 765 nm. Za slepi vzorec smo uporabili vodo.

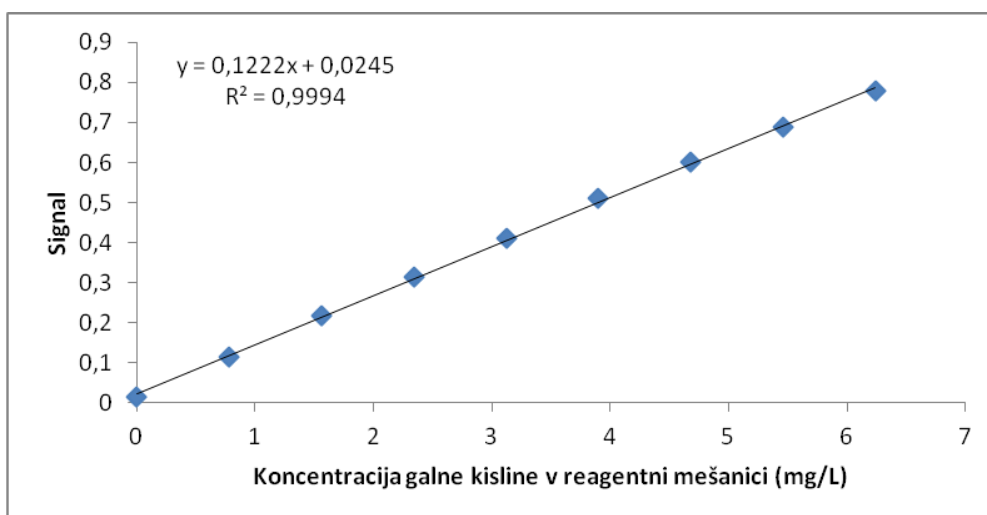
**Preglednica 5: Sestava reagentnih mešanic za umeritveno krivuljo**

| Točka umeritvene krivulje | Raztopina galne kisline ( $\mu$ l) | Deionizirana voda ( $\mu$ l) | Folin-Ciocalteujev reagent ( $\mu$ l) | 20 % raztopina natrijevega karbonata ( $\mu$ l) | Koncentracija galne kisline v reagentni mešanici (mg/l) |
|---------------------------|------------------------------------|------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| 1.                        | 0                                  | 1400                         | 300                                   | 300                                             | 0,00                                                    |
| 2.                        | 100                                | 1300                         | 300                                   | 300                                             | 0,78                                                    |
| 3.                        | 200                                | 1200                         | 300                                   | 300                                             | 1,56                                                    |
| 4.                        | 300                                | 1100                         | 300                                   | 300                                             | 2,34                                                    |
| 5.                        | 400                                | 1000                         | 300                                   | 300                                             | 3,12                                                    |
| 6.                        | 500                                | 900                          | 300                                   | 300                                             | 3,90                                                    |
| 7.                        | 600                                | 800                          | 300                                   | 300                                             | 4,68                                                    |
| 8.                        | 700                                | 700                          | 300                                   | 300                                             | 5,46                                                    |
| 9.                        | 800                                | 600                          | 300                                   | 300                                             | 6,24                                                    |

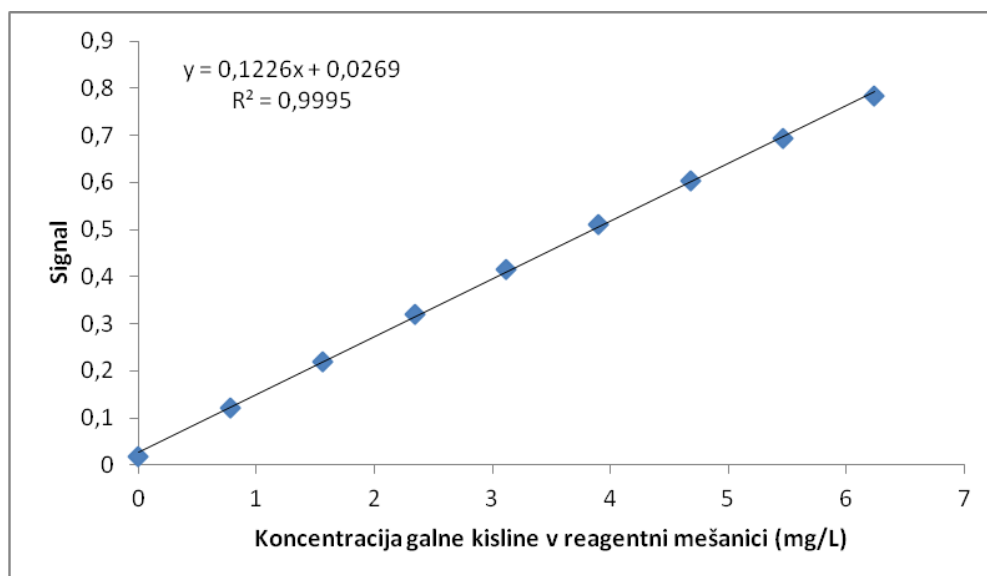
Ker smo analize delali dva dni in reagentna mešanica ni stabilna, smo uporabili dve umeritveni krivulji za določitev vsebnosti skupnih fenolov v vzorcih špinače.

Enačba premice umeritvene krivulje:

$$y = kx + n \quad \dots(9)$$



Slika 12: Prva umeritvena krivulja za določanje vsebnosti skupnih fenolov v špinači



Slika 13: Druga umeritvena krivulja za določanje vsebnosti skupnih fenolov v špinači

Potek analize:

Za določanje vsebnosti skupnih fenolov v špinači smo uporabili enake vzorce kot za analizo antioksidativnega potenciala, in sicer smo v 10 g raztopine metafosforne kisline dodali 5 g vzorca. V 2 ml centrifugirko smo odpipetirali 100  $\mu$ l vzorca, nato 1300  $\mu$ l deionizirane vode in 300  $\mu$ l Folin- Ciocalteujevega reagenta in dobro premešali. Po 5 minutah smo dodali še 300  $\mu$ l 20 % raztopine natrijevega karbonata in ponovno dobro premešali. Po 90 minutah smo izmerili absorbanco pri 765 nm (Košmerl in Kač, 2007).

Izračun:

$$C_{g.k.reagentne\ mešanice} \left( \frac{mg}{L} \right) = \frac{A \cdot n}{k} \quad \dots(10)$$

$$C_{g.k.vzorec} = \frac{C_{g.k.reagentne\ mešanice} \left( \frac{mg}{L} \right) \times V_{reagentne\ mešanice} (\mu L)}{V_{vzorca} (\mu L) \times \left( \frac{m_{spinača} (g)}{V_{spinača+metaf.k.} (L)} \right)} \quad \dots(11)$$

$c_{g.k.}$  ...koncentracija galne kisline (mg/ml)

### 3.3.3 Določanje vsebnosti nitratnega in nitritnega dušika ter amonijevega dušika

Princip metode:

Vsebnost nitratnega, nitritnega in amonijevega dušika smo določali s kolorimetrično metodo na vodnih ekstraktih rastlin špinače z napravo Technicon Autoanalyser II.

Materiali in oprema:

- Centrifugirke (V=20 ml)
- Filtrirni papir (pore premera 100-125  $\mu$ m)
- IKA Ultra- Turax
- Merilne bučke (V= 100 ml)
- Reagenta Carrez 1 in Carrez 2
- Steklene čaše (V= 100 ml)
- Technicon Autoanalyser II
- Termostat za vodno kopel

Potek analize:

Za potek analize smo potrebovali 5 g zmletga vzorca. V 20 ml centrifugirkah smo vzorcem špinače dodali 5 ml destilirane vode in jih zmleli z napravo Ultra- Turax. Dobljeno raztopino smo kvantitativno prenesli v 100 ml steklene čaše. Dobljeni raztopini smo nato dodali približno 60 ml 2x destilirane vode, ki smo jo predhodno segreli na 70 °C, in jih 15 minut inkubirali v vodni kopeli pri 70 °C. Nato smo čaše pustili, da so se ohladile na sobno temperaturo in vsebino kvantitativno prenesli v 100 ml merilne bučke in jih dopolnili do oznake z 2x destilirano vodo. Dobljeni vzorci so bili motni, zato smo jih

morali tretirati še z reagentoma Carrez 1 in Carrez 2. Sledila je filtracija skozi filtrni papir (R-Biopharm AG, 2013). Vzorce smo shranili v 20 ml centrifugirkah, jih zamrznili in poslali na Oddelek za biologijo, kjer so po metodi G-016-91 analizirali vsebnost nitratnega in nitritnega dušika.

Pri metoda G-016-91 s pomočjo hidrazinijevega sulfata poteka redukcija nitrata do nitrita, slednjega se določi fotometrično. V kislem mediju, ob prisotnosti nitritnih ionov se aminske skupine sulfonilamina diazotirajo. Na ta način nastane diazonijeva sol, ta pa se veže na N naftiletilen diamin klorid. Posledica tega je nastanek rdeče azo-barve. Intenziteto te barve pa s principom CFA (angl. Continuous flow analysis) izmeri aparat Technicon Autoanalyser II in določi skupno koncentracijo nitratnega in nitritnega dušika v vzorcu. Kolorimetrično merjenje poteka pri valovni dolžini 520 nm (Kmecl in sod., 2005).

Tudi amonijev dušik se prav tako lahko določi z aparatom Technicon Autoanalyser II, in sicer z metodo IPB (indophenol-blue method) z uporabo reagentov: natrijev salicilat, trinatrijev citrat, natrijev nitroprusid, natrijev hidrosid, dikloroizocianurna kislina in Triton X- 100. Hipoklorit nastane iz dikloroizocianurne kisline in reagira z amoniakom. Produkt nastale reakcije je monokloramin, ki naprej po reakciji s salicilatom tvori indofenol (Aminot in sod., 1997). Nastali produkt je indigo modre barve, katerega koncentracijo ugotovimo z merjenjem absorbance pri valovni dolžini 640 nm.

### **3.3.1 Določanje $\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{15}\text{N}$ vrednosti v vzorcih špinače z metodo IRMS (AOAC 998.12, 1999)**

#### Princip metode:

Metoda temelji na merjenju izotopskega razmerja med težjim in lažjim izotopom ogljika oz. dušika z masnim spektrometrom za analitiko stabilnih izotopov lahkih elementov (IRMS). Izotopska razmerja navajamo z vrednostjo  $\delta^{13}\text{C}$  oz.  $\delta^{15}\text{N}$  v ‰ in je definirana z enačbo (4).

#### Materiali in oprema:

- Kositrove kapsule dimenzij 4/6 mm (PDZ Europa Ltd)
- Masni spektrometer Europa Scientific 20-20 z ANCA-SL modulom za trdne in tekoče vzorce
- Pinceta z zvito konico za zatesnitev kositrovih kapsul
- Plastična stojala za kositrove kapsule
- Interni, laboratorijski standard: ureaC in europaN (( $\text{NH}_4$ ) $_2\text{SO}_4$ )
- Referenčni standardi IAEA-NBS (oil), IAEA-CH-7 in IAEA-CH-6 za C in IAEA-N-1, IAEA-N-2 za N
- Sušilna omara

Potek analize:

Vzorec špinače smo v sušilni omari pri 50 °C sušili do konstantne teže. Po sušenju smo približno 2 mg suhega vzorca s pinceto prenesli v kositrove kapsule in jih s pinceto tudi dobro zaprli. Pazili smo, da se vzorcev in kapsul nismo dotikali z rokami. Tako pripravljene kapsule smo prenesli v označena plastična stojala in jih poslali v analizo na Institut »Jožef Stefan« v Ljubljani.

### **3.3.2 Določanje $\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{15}\text{N}$ vrednosti v gnojilih z metodo IRMS (AOAC 998.12, 1999)**

Princip metode:

Metoda temelji na merjenju izotopskega razmerja med odstotkom težjega in lažjega izotopa ogljika oz. dušika z masnim spektrometrom za analitiko stabilnih izotopov lahkih elementov. Izotopska razmerja navajamo z vrednostjo  $\delta^{13}\text{C}$  oz.  $\delta^{15}\text{N}$  v ‰.

Materiali in oprema:

- Kositrove kapsule dimenzij 4/6 mm (PDZ Europa Ltd)
- Masni spektrometer Europa Scientific 20-20 z ANCA-SL modulom za trdne in tekoče vzorce
- Pinceta z zvito konico, za zatesnitev kositrovih kapsul
- Plastična stojala za kositrove kapsule
- Interni, laboratorijski standard: ureaC in europaN ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)
- Referenčni standardi IAEA-NBS (oil), IAEA-CH-7 in IAEA-CH-6 za C in IAEA-N-1, IAEA-N-2 za N
- Sušilna omara

Potek analize:

Fino zmleta gnojila smo zapakirali v vrečke, jih označili ter poslali v analizo na Institut »Jožef Stefan« v Ljubljani.

## **3.4 STATISTIČNA ANALIZA**

Podatke dobljene med poskusom smo zbrali, uredili in obdelali z računalniškim programom Microsoft Excel 2007. Tako urejene podatke smo še dodatno obdelali z računalniškim programom SAS (Software Version 8) s proceduro GLM (angl. General Linear Models). Izračunali smo še različne parametre opisne statistike: povprečje, maksimum, minimum, standardni odklon in koeficient variabilnosti.

## 4 REZULTATI

### 4.1 REZULTATI MERITEV ŠTEVILA RASTLIN, SKUPNE TEŽE RASTLIN IN POVPREČNE TEŽE RASTLIN ŠPINAČE

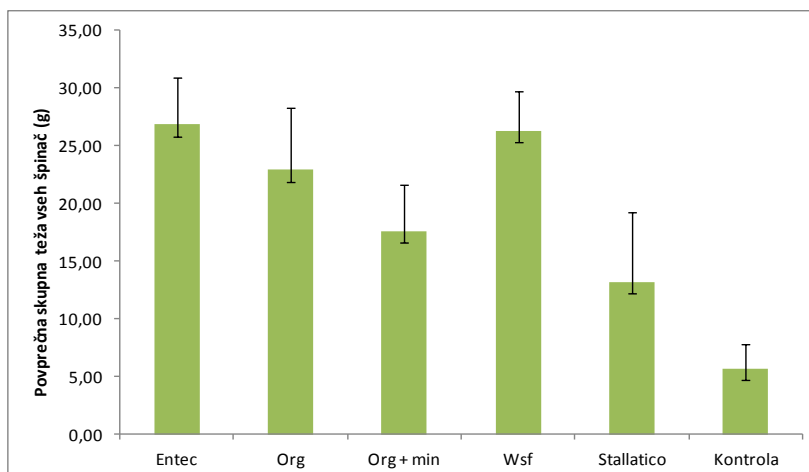
V preglednici 6 so prikazani rezultati osnovnih meritev vzorcev špinače glede na uporabljeno gnojilo. Špinača gnojena z različnimi tipi gnojil, med sabo razlikuje po povprečni skupni teži vseh rastlin, povprečni teži posamezne rastline in po številu rastlin.

**Preglednica 6: Povprečne vrednosti in standardni odkloni pri rastlinah špinače gnojene z različnimi gnojili za skupno težo rastlin, število rastlin in povprečno težo špinače**

|                                             | Entec      | Org        | Org + min  | Wsf        | Stallatico | Kontrola   |
|---------------------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| <b>Skupna masa vseh špinač (g)</b>          | 26,9 ± 4,6 | 22,9 ± 5,4 | 17,6 ± 4,1 | 26,3 ± 3,4 | 13,2 ± 6,1 | 5,7 ± 2,1  |
| <b>Število zatehtanih špinač*</b>           | 8,6 ± 1,7  | 9,2 ± 1,9  | 16,6 ± 7,2 | 8,8 ± 2,0  | 15,8 ± 7,1 | 25,1 ± 5,3 |
| <b>Povprečna masa posamezne špinače (g)</b> | 3,3 ± 0,9  | 2,6 ± 0,8  | 1,2 ± 0,4  | 3,1 ± 0,7  | 1,1 ± 0,8  | 0,2 ± 0,1  |

\*število zatehtanih špinač predstavlja skupno število rastlin špinače ne glede na njihovo velikost

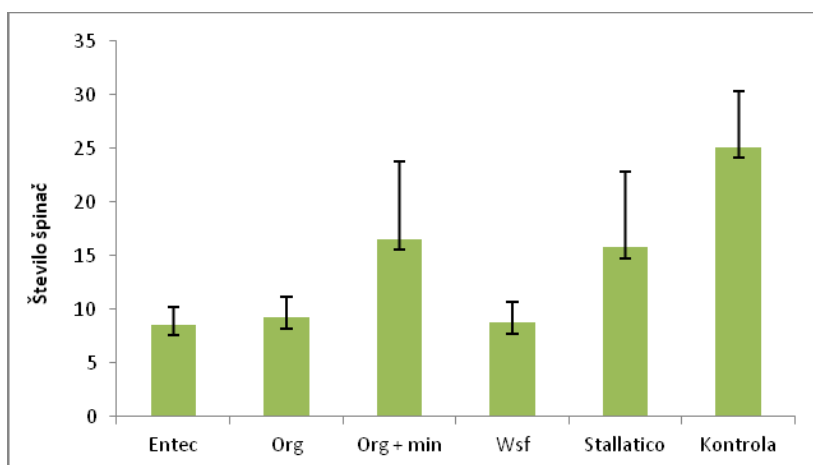
Rezultati skupne teže špinače, števila rastlin ter povprečne mase posamezne rastline so prikazani grafično, na slikah 14, 15 in 16.



**Slika 14: Povprečne skupne teže in standardni odkloni teže špinače, gnojene z različnimi gnojili, izražene v gramih**

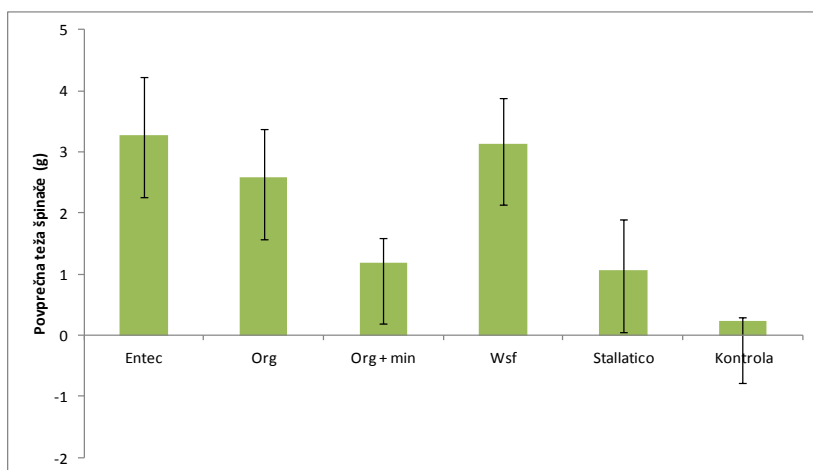
Iz preglednice 6 je razvidno, da so največjo povprečno skupno težo dosegle rastline špinače gnojene z mineralnima gnojiloma Entec in Wsf, in sicer 26,9 g ter 26,3 g. Najmanjšo povprečno skupno težo pa so dosegle rastline špinače, ki niso bile gnojene.

Špinača, gnojena z gnojilom Organic je imela povprečno skupno maso 22,9 g, medtem ko je špinača, gnojena z Org + min dosegla manjšo skupno težo, in sicer 17,6 g. Špinača, gnojena z gnojilom Stallatico je dosegla povprečno skupno težo 13,2 g.



**Slika 15: Povprečne vrednosti števila vzgojenih rastlin po 8 tednih in standardni odkloni špinače, gnojene z različnimi gnojili**

Kontrolni vzorci špinače so povprečno dosegli največje število vzgojenih rastlin. Najmanjše število rastlin so dosegli vzorci špinače gnojeni z mineralnima gnojiloma Entec ter Wsf, in sicer 8,6 in 8,8. Špinača gnojena z gnojilom Organic je dosegla povprečno število rastlin 9,2, medtem ko je špinača gnojena z mešanico gnojil dosegla povprečno število rastlin 16,6. Špinača, gnojena s Stallaticom, je dosegla povprečno število rastlin 15,8.



**Slika 16: Povprečne teže rastlin in standardni odkloni špinače, gnojene z različnimi gnojili, izražene v gramih**

Najmanjša povprečna teža posamezne rastline je dosegla špinača v kontrolnem vzorcu, in sicer 0,2 g. Največjo povprečno težo posamezne rastline je dosegla špinača gnojena z mineralnima gnojiloma, in sicer 3,3 in 3,1 g. Povprečna teža posamezne rastline gnojene z Org je znašala 2,6 g. Posamezna rastlina špinače gnojena z mešanico gnojil je dosegla povprečno težo 1,2 g, medtem ko je špinača gnojena s Stallaticom dosegla povprečno težo posamezne rastline 1,1 g.

Pri gnojilu Stallatico so vidni veliki standardni odkloni, kar je posledica manjše mase rastlin iz dveh loncev od skupno devetih. Kontrolni vzorci so pričakovano dosegli občutno nižjo maso in se po tem parametru najbolj razlikujejo od vseh ostalih.

## 4.2 REZULTATI POSAMEZNIH FIZIKALNO-KEMIJSKIH ANALIZ

### 4.2.1 Skupni fenoli in antioksidativni potencial

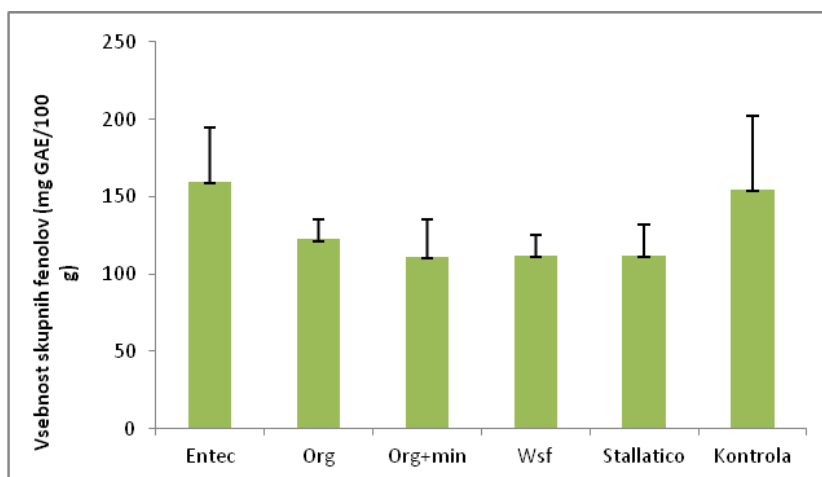
V preglednici 7 so zbrani rezultati vsebnosti skupnih fenolov in antioksidativni potencial za vzorce špinače.

**Preglednica 7: Povprečne vrednosti in standardni odkloni rastlin špinače gnojene z različnimi tipi gnojil za skupne fenole in antioksidativni potencial**

|                                                                 | Entec                     | Org                      | Org + min                | Wsf                      | Stallatico                | Kontrola                  |
|-----------------------------------------------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| <b>Skupni fenoli<br/>(mg galne<br/>kisline/100 g)</b>           | 159±35,7 <sup>a</sup>     | 122±12,7 <sup>b</sup>    | 111±23,6 <sup>b</sup>    | 112±13,7 <sup>b</sup>    | 112±20,3 <sup>b</sup>     | 154±48,0 <sup>a</sup>     |
| <b>Antioksidati<br/>vni potencial<br/>(mmol<br/>DPPH/100 g)</b> | 0,018±0,009 <sup>ab</sup> | 0,022±0,006 <sup>a</sup> | 0,016±0,008 <sup>b</sup> | 0,016±0,006 <sup>b</sup> | 0,019±0,007 <sup>ab</sup> | 0,018±0,007 <sup>ab</sup> |

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

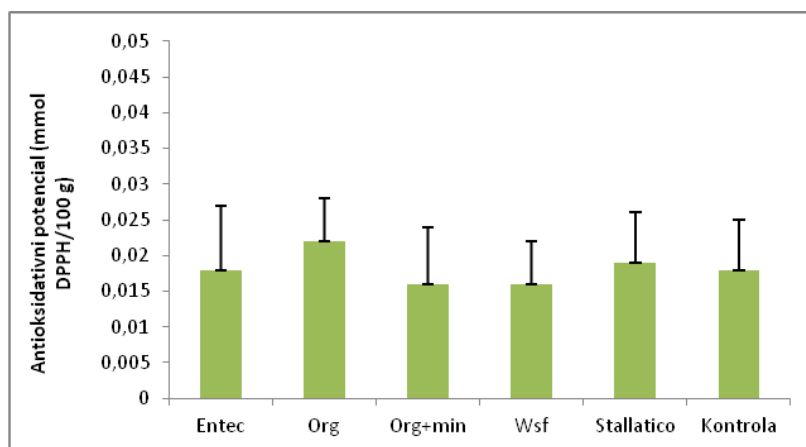
Iz preglednice 7 in slike 17 lahko razberemo, da imata kontrolni vzorec in vzorec gnojen z umetnim gnojilom Entec največjo vsebnost skupnih fenolnih spojin, čeprav smo največjo vsebnost skupnih polifenolov pričakovali v vzorcu špinače gnojene z organskim gnojilom. Najmanjšo vsebnost skupnih fenolnih spojin je imela špinača gnojena z mešanico gnojil (Org + min).



**Slika 17:** Povprečne vrednosti in standardni odkloni koncentracije skupnih fenolov v rastlinah špinače, gnojene z različnimi tipi gnojil, izražene v mg ekvivalentov galne kisline na 100 g

Vsebnost fenolnih spojin se med kontrolnimi vzorci in vzorci špinače gnojene z Entec gnojilom statistično značilno ne razlikujejo. Glede na dobljene rezultate zato ne moremo trditi, da kontrolni vzorci vsebujejo več fenolnih spojin.

Vrednosti antioksidativnega potenciala špinače, gnojene z različnimi tipi gnojil, so prikazane grafično na sliki 18. Vzorec gnojen z organskim gnojilom je kljub temu, da vsebnost polifenolov ni bila največja, dosegel najvišjo vrednost antioksidativnega potenciala. Glede na vsebnost skupnih polifenolov v kontrolnem vzorcu, je nizka vrednost antioksidativnega potenciala presenetljiv rezultat. Vrednosti antioksidativnega potenciala v vzorcih gnojenih z Wsf, Stallatico, Entec in Org + min so zelo podobne in se statistično značilno ne razlikujejo med seboj. Posledično ne moremo trditi, da imajo vzorci gnojeni z mešanico Org + min večji antioksidativni potencial v primerjavi z vzorci gnojenimi z umetnimi gnojili.



**Slika 18:** Povprečne vrednosti in standardni odkloni antioksidativnega potenciala rastlin špinače, gnojene z različnimi tipi gnojil, izražene v mmol DPPH/100 g

#### 4.2.2 Nitratni, nitritni in amonijev dušik v špinači

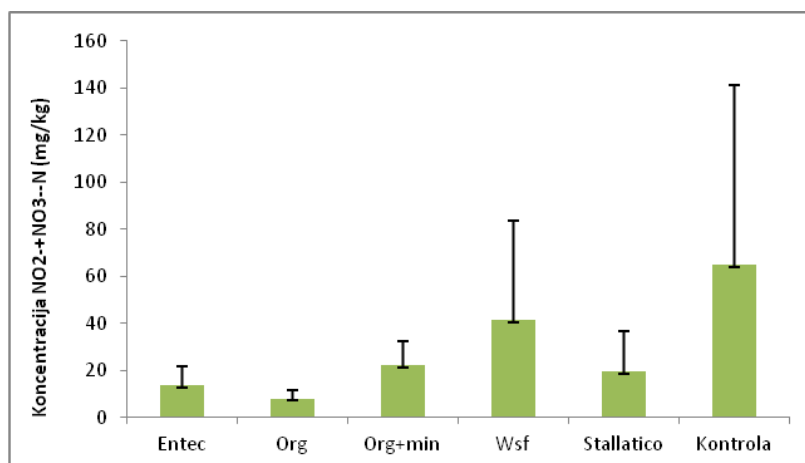
V preglednici 8 so podane povprečne vrednosti in standardni odkloni v vzorcih špinače glede na tip uporabljenega gnojila.

**Preglednica 8: Povprečne vrednosti in standardni odkloni v rastlinah špinače gnojene z različnimi tipi gnojil za nitratni in nitritni dušik ter amonijev dušik, izražene v (mg/kg)**

|                                                                          | Entec                 | Org                  | Org + min              | Wsf                     | Stallatico             | Kontrola               |
|--------------------------------------------------------------------------|-----------------------|----------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|
| <b>(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>+NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-N (mg/kg)</b> | 13,8±8,0 <sup>b</sup> | 8,1±3,7 <sup>b</sup> | 22,0±10,2 <sup>b</sup> | 41,3±42,4 <sup>ab</sup> | 19,5±17,1 <sup>b</sup> | 64,7±76,6 <sup>a</sup> |
| <b>NH<sub>4</sub><sup>-</sup>-N (mg/kg)</b>                              | 12,8±2,9 <sup>b</sup> | 9,7±3,1 <sup>b</sup> | 12,7±2,6 <sup>b</sup>  | 15,9±4,8 <sup>b</sup>   | 22,8±23,7 <sup>b</sup> | 54,8±36,5 <sup>a</sup> |

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

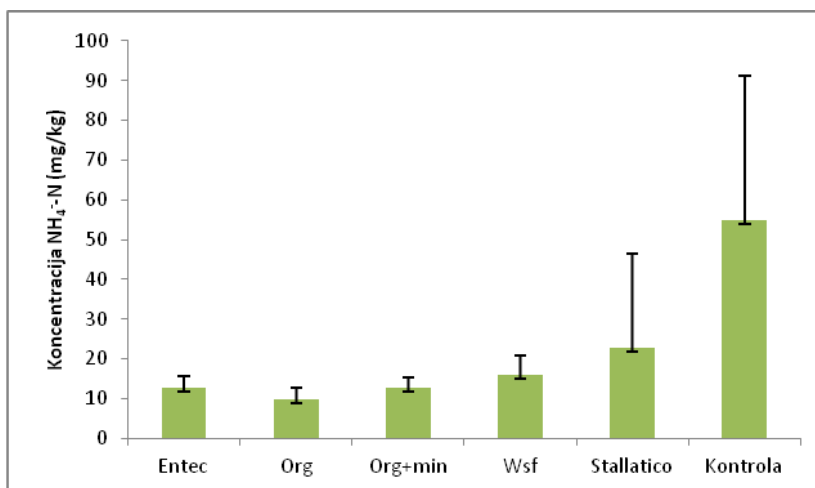
Iz preglednice 8 in slike 19 je razvidno, da špinača gnojena z organskim gnojilom Org vsebuje najmanj nitratnega in nitritnega dušika. Največjo vrednost nitratnega in nitritnega dušika so dosegli kontrolni vzorci špinače, sledijo vzorci špinače gnojene z Wsf gnojilom, nato vzorci špinače gnojene s kombinacijo Org + min ter špinača gnojena z Stallaticom in špinača gnojena z Entec gnojilom. Rezultati vrednosti nitratnega in nitritnega dušika se v vzorcih špinače gnojene z Entec, Org, Org + min ter Stallatico gnojilom statistično značilno razlikujejo v primerjavi z rezultati kontrolnih vzorcev.



**Slika 19: Povprečne vrednosti in standardni odkloni vsote koncentracij nitritnega in nitratnega dušika v rastlinah špinače, gnojene z različnimi tipi gnojil, izražene v mg/kg**

Iz preglednice 8 in slike 20 je razvidno, da je špinača gnojena z organskim gnojilom Org vsebovala najmanj amonijevega dušika. Presenetljivo nizko vrednost amonijevega dušika smo zabeležili tudi v vzorcih špinače gnojene z Entec in Wsf. Največ amonijevega dušika so vsebovali kontrolni vzorci, in sicer 54,8 mg/kg. Prav tako je špinača gnojena s Stallaticom vsebovala veliko amonijevega dušika, in sicer 22,8 mg/kg. Vsebnost

amonijevega dušika se v kontrolnih vzorcih špinače statistično značilno razlikuje od vsebnosti v vseh ostalih vzorcih. Medtem ko se vsebnosti amonijevega dušika v gnojni špinači med različnimi tipi gnojil med seboj statistično značilno ne razlikujejo.



Slika 20: Povprečne vrednosti in standardni odkloni koncentracije amonijevega dušika v rastlinah špinače, gnojene z različnimi tipi gnojil, izražene v mg/kg

#### 4.2.3 Vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{15}\text{N}$ v rastlinah špinače

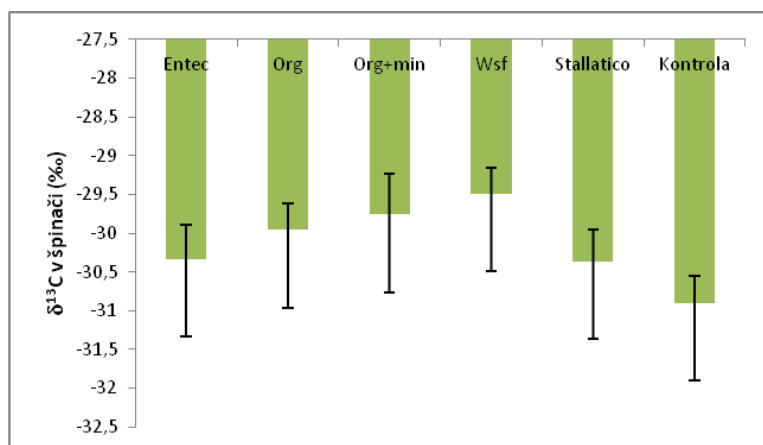
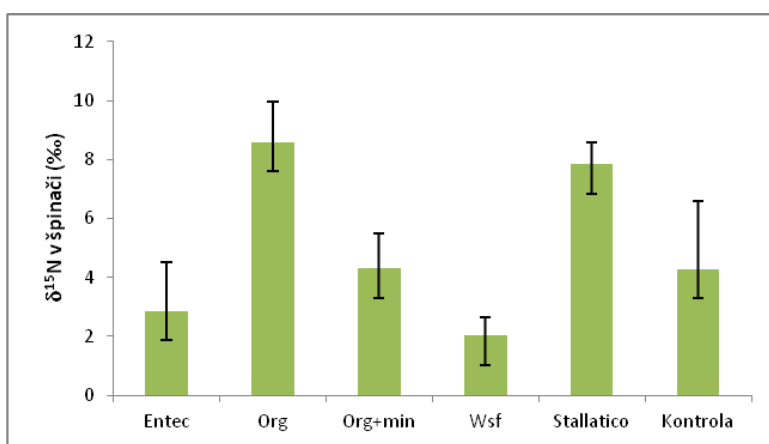
V preglednici 9 so zbrane povprečne vrednosti  $\delta^{13}\text{C}$  in  $\delta^{15}\text{N}$  v vzorcih špinače glede na različen tip gnojenja.

Preglednica 9: Povprečne vrednosti  $\delta^{13}\text{C}$  in  $\delta^{15}\text{N}$  ter standardni odkloni v rastlinah špinače, gnojene z različnimi tipi gnojil, izražene v ‰

|                           | Entec                   | Org                      | Org + min                | Wsf                     | Stallatico              | Kontrola                |
|---------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| $\delta^{13}\text{C}$ (‰) | -30,3±0,45 <sup>c</sup> | -30,0±0,35 <sup>bc</sup> | -29,8±0,52 <sup>ab</sup> | -29,5±0,34 <sup>a</sup> | -30,4±0,40 <sup>c</sup> | -30,9±0,35 <sup>d</sup> |
| $\delta^{15}\text{N}$ (‰) | 2,9±1,65 <sup>c</sup>   | 8,6±1,35 <sup>a</sup>    | 4,3±1,18 <sup>b</sup>    | 2,0±0,62 <sup>c</sup>   | 7,8±0,76 <sup>a</sup>   | 4,3±2,31 <sup>b</sup>   |

Skupine špinače, 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 preglednice 9 in slike 21 je razvidno, da so najvišjo povprečno vrednost  $\delta^{13}\text{C}$  dosegli vzorci špinače gnojene z Wsf. Najnižjo povprečno vrednost  $\delta^{13}\text{C}$  pa so dosegli kontrolni vzorci špinače, ki se je tudi statistično značilno razlikovala od vseh ostalih vrednosti tega parametra. Vzorci špinače gnojene z gnojiloma Entec in Stallatico so dosegli zelo podobne povprečne vrednosti  $\delta^{13}\text{C}$ , in sicer -30,3 ter -30,4 ‰, in se med seboj niso statistično značilno razlikovale. Med seboj zelo podobne vrednosti  $\delta^{13}\text{C}$  so dosegli tudi vzorci špinače, gnojene z Org ter mešanico Org + min, in sicer -30,0 in -29,8 ‰.

Slika 21: Vrednost  $\delta^{13}\text{C}$  v vzorcih špinače, gnojene z različnimi gnojiliSlika 22: Vrednost  $\delta^{15}\text{N}$  v vzorcih špinače, gnojene z različnimi gnojili

Iz preglednice 9 in slike 22 je razvidno, da so najvišjo povprečno vrednost  $\delta^{15}\text{N}$  dosegli vzorci špinače gnojene z organskim gnojilom Org, in sicer 8,6 ‰. Sledijo vrednosti vzorcev gnojenih s Stallaticom, in sicer je bila povprečna vrednost  $\delta^{15}\text{N}$  7,8 ‰. Omenjene vrednosti se statistično značilno razlikujejo od vrednosti ostalih vzorcev. Najnižjo povprečno vrednost  $\delta^{15}\text{N}$  so imeli vzorci špinače gnojene z Wsf, in sicer 2,0 ‰, medtem ko so vzorci špinače gnojene z Entec gnojilom dosegli višjo vrednost, in sicer 2,9 ‰. Povprečne vrednosti  $\delta^{15}\text{N}$  v vzorcih gnojenih z mineralnima gnojiloma se statistično značilno razlikujeta od vseh ostalih. Presenetljivo so kontrolni vzorci dosegli podobne vrednosti  $\delta^{15}\text{N}$  v primerjavi z vzorci, gnojenimi z mešanico Org + min in se med seboj niso statistično značilno razlikovali. Vrednosti dušikovih izotopov v vzorcih špinače gnojene z mineralnimi gnojili se od vzorcev špinače gnojene z organskimi gnojili statistično značilno razlikujejo.

#### 4.2.1 Vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{15}\text{N}$ v gnojilih

Iz preglednice 10 lahko razberemo, da organska gnojila kot sta Organik in Stallatico vsebujeta večji delež težjega izotopa dušika, medtem ko sta vrednosti pri mineralnih gnojilih Entec in Wsf občutno nižji. Vrednosti deleža težjega izotopa ogljika sta prav tako višji pri organskih gnojilih.

**Preglednica 10: Vrednosti  $\delta^{13}\text{C}$  in  $\delta^{15}\text{N}$  v gnojilih**

| 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                      |

### 4.3 REZULTATI STATISTIČNE ANALIZE

#### 4.3.1 Korelacije med posameznimi parametri

Preglednica 11 prikazuje korelacije med posameznimi analiziranimi parametri.

**Preglednica 11: Pearsonovi koeficienti korelacije med posameznimi parametri**

|                                      | AOP | SF      | $\text{NH}_4\text{-N}$ | $(\text{NO}_2+\text{NO}_3)\text{-N}$ | $\delta^{13}\text{C}$ | $\delta^{15}\text{N}$ |
|--------------------------------------|-----|---------|------------------------|--------------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| AOP                                  | 1   | 0,11961 | -0,3233                | -0,2803                              | 0,5953                | 0,20686               |
| SF                                   |     | 1       | 0,16496                | 0,42558*                             | -0,32987              | -0,20934              |
| $\text{NH}_4\text{-N}$               |     |         | 1                      | 0,56358*                             | -0,37396              | -0,06903              |
| $(\text{NO}_2+\text{NO}_3)\text{-N}$ |     |         |                        | 1                                    | -0,09804              | -0,31364*             |
| $\delta^{13}\text{C}$                |     |         |                        |                                      | 1                     | -0,08381              |
| $\delta^{15}\text{N}$                |     |         |                        |                                      |                       | 1                     |

\*statistično značilne povezavi pri stopnji tveganja 0,05

Vsebnost fenolnih snovi je v pozitivni korelaciji z vsebnostjo nitratnega in nitritnega dušika, in sicer znaša koeficient korelacije 0,43. Dokaj velik koeficient korelacije je tudi med vsebnostjo nitratnega in nitritnega dušika ter vsebnostjo amonijevega dušika, in sicer znaša 0,56. Poleg tega je vsebnost nitratnega in nitritnega dušika negativno povezana tudi z izotopsko sestavo dušika, in sicer znaša koeficient korelacije -0,31. Omenjene korelacije so statistično značilne pri 0,05 stopnji tveganja. Presenetljivo je med vsebnostjo skupnih polifenolov in antioksidativnim potencialom majhen koeficient korelacije, in sicer znaša le 0,12.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

#### 5.1.1 Vpliv gnojenja na doseženo maso rastlin

Gnojenje in tip gnojila pomembno vplivata na doseženo končno maso rastlin. Najmanjšo povprečno maso so dosegle kontrolne rastline špinače, katerih povprečna skupna masa vseh rastlin špinače je znašala 5,7 g oziroma povprečno 0,2 g na posamezno rastlino. Čeprav so kontrolne rastline dosegle najmanjšo povprečno skupno maso, je bilo število rastlin največje, in sicer smo našli povprečno 25,1 rastlin. Na velikost in število rastlin vpliva prostor, ki ga ima rastlina na voljo za svojo rast (Rubatzky in Yamaguchi, 1997). Ker kontrolni vzorci špinače niso bili gnojeni, rast rastlin ni bila tako bujna, zato je rastlina za svoj razvoj porabila manj prostora. Posledično se je v kontrolni loncih razvilo več rastlin z manjšo povprečno skupno maso.

Kljub temu, da so vsa gnojila vsebovala enako količino kalija, ki je bil definiran kot mejno hranilo, smo pri različnem načinu gnojenja opazili različno intenziteto rasti, ki ni bila posledica uporabe gnojil (mineralno/organsko). Povprečne skupne mase vzorcev špinače, ki smo jo gnojili, so variirale med 13,2 in 26,9 g. Vzorci gnojeni z mineralnima gnojiloma Entec in Wsf so dosegali najvišje vrednosti povprečne skupne mase, in sicer 26,9 in 26,3 g. Pri omenjenih vzorcih smo zabeležili najmanjše število rastlin, kljub temu je bila povprečna teža posamezne rastline večja v primerjavi s povprečno težo posameznih rastlin v vzorcih gnojenih z ostalimi tipi gnojil. Rastline gnojene z gnojiloma Entec in Wsf so imele zelo bujno rast, zato so med rastjo zavzele veliko prostora. Ostali načini gnojenja so se izkazali kot manj učinkoviti. Rastline gnojene z Org so dosegle povprečno skupno maso rastlin 22,9 g. Rastline, gnojene z Org + min gnojilom pa so presenetljivo dosegle manjšo skupno maso v primerjavi z rastlinami gnojenimi z Org, in sicer 17,6 g.

#### 5.1.2 Vpliv gnojenja na izotopsko sestavo ogljika

Najnižjo vrednost  $\delta^{13}\text{C}$  so pričakovano dosegli kontrolni vzorci špinače, in sicer -30,9 ‰, medtem ko so najvišjo vrednost  $\delta^{13}\text{C}$  dosegli vzorci špinače gnojene z mineralnim gnojilom Wsf, in sicer -29,5 ‰. Določanje izotopske sestave ogljika v vzorcih špinače se ni izkazala kot uporabna metoda za razlikovanje ekološko pridelane in konvencionalno pridelane špinače. Vrednosti izotopske sestave ogljika so se le pri vzorcih gnojenih z Wsf statistično značilno razlikovale v primerjavi z ostalimi vrednostmi, z izjemo vrednosti  $\delta^{13}\text{C}$  v vzorcih špinače gnojene z Org + min. Organsko pridelana špinača, gnojena z organskima gnojiloma Org in Stallatico se glede na izotopsko sestavo ogljika ni razlikovala v primerjavi s konvencionalno pridelano špinačo gnojeno z gnojilom Entec ter špinačo gnojeno s kombinacijo Org + min. Izmed vseh gnojenih vzorcev, so vzorci špinače gnojene

z gnojilom Stallatico dosegli najnižje vrednosti  $\delta^{13}\text{C}$ . Na nižjo vrednost  $\delta^{13}\text{C}$  lahko vpliva večja mikrobna aktivnost v omenjenem gnojilu (Hogberg in sod., 1995).

### 5.1.3 Vpliv gnojenja na izotopsko sestavo dušika

Pri organskem načinu kmetovanja uporabljamo naravna gnojila, kot sta živalski gnoj ali kompost, medtem ko pri konvencionalnem načinu pridelave uporabljamo sintetična gnojila. V živalskem gnoju vrednosti  $\delta^{15}\text{N}$  variirajo med +2 in +10 ‰ in so občutno višje od tipičnih vrednosti  $\delta^{15}\text{N}$  v sintetičnih gnojilih, katere variirajo med -2 in 2 ‰ (Rogers, 2008). Zato smo pričakovali, da bo delež izotopa  $^{15}\text{N}$  manjši v konvencionalno pridelani špinači. Analiza stabilnih izotopov dušika se je že izkazala za dobro metodo pri razlikovanju ekološko in konvencionalno pridelane zelenjave (Rogers, 2008). Šturm in Lojen (2011) sta v svoji raziskavi pokazali, da ima zelenjava gnojena z organskimi gnojili višje vrednosti  $\delta^{15}\text{N}$ . Tudi rezultati naše analize stabilnih izotopov dušika so pokazali, da špinača gnojena z organskimi gnojili resnično vsebuje večji delež izotopa  $^{15}\text{N}$  v primerjavi s konvencionalno pridelano špinačo. Vrednosti  $\delta^{15}\text{N}$  so se med vzorci špinače statistično značilno razlikovale glede na uporabljeno gnojilo (organsko oz. mineralno). Največji delež težjega izotopa dušika so dosegle rastline gnojene z gnojilom Organik (8,6 ‰), sledile so jim rastline gnojene z gnojilom Stallatico (7,8 ‰). Vrednosti  $\delta^{15}\text{N}$  v kontrolnih vzorcih špinače so se po pričakovanjih bolj nagibale k vrednostim, ki so jih dosegli vzorci špinače gnojene z organskima gnojiloma. Rastline gnojene z mešanico organskega in mineralnega gnojila pa so dosegle vrednosti med ekološkim in konvencionalnim načinom pridelave, in sicer so povprečne vrednosti  $\delta^{15}\text{N}$  znašale 4,3 ‰.

### 5.1.4 Skupni fenoli

Organsko pridelana hrana velja za bolj zdravo v primerjavi s hrano pridelano na konvencionalni način. Posledično je ekološko kmetijstvo vse bolj razširjena tehnika pridelave živil, saj so potrošniki pripravljeni plačati več za živila, ki veljajo za varnejša, bolj zdrava in prehransko bogatejša. Ekološka hrana je hrana, ki naj bi bila pridelana brez pesticidov ter drugih škodljivih kemikalij zato naj bi vsebovala več biološko aktivnih snovi, med katere sodijo tudi fenolne spojine (Dasgupta in Klein, 2014). Organsko pridelana hrana naj bi povprečno vsebovala 5,7 % več hranilnih snovi (Hunter in sod., 2011). Kljub temu pa je kakovost živil odvisna tudi od klimatskih dejavnikov, kmetijskih dejavnikov ter kakovosti semen. Nekatere raziskave so pokazale, da ekološko pridelana živila vsebujejo več mikroelementov, druge raziskave kažejo, da se takšna živila v prehranski vrednosti ne razlikujejo od živil pridelanih na konvencionalni način (Dasgupta in Klein, 2014). Raigon in sod. (2010) so na primer v svoji raziskavi pokazali, da jajčevci pridelani na ekološki način vsebuje več polifenolov, medtem ko Briviba in sod. (2007) niso našli razlik v vsebnosti fenolnih spojin med ekološko in konvencionalno pridelanimi jabolki.

Pričakovali smo, da bo ekološko pridelana špinača vsebovala več fenolnih spojin. Rezultati analize vsebnosti skupnih fenolov pa so v nasprotju z našo hipotezo pokazali, da je največ skupnih fenolov (104,1 mg/g) vsebovala špinača gnojena z mineralnim gnojilom Entec. Podobne rezultate so dosegli tudi kontrolni vzorci, in sicer je bila povprečna vsebnost skupnih fenolov 101 mg/100 g. Rezultati obeh omenjenih skupin so se statistično značilno razlikovali od rezultatov vseh ostalih skupin špinače.

### 5.1.5 Antioksidativni potencial

Ker naj bi ekološko pridelana hrana vsebovala več biološko aktivnih snovi, lahko sklepamo, da imajo takšna živila tudi večji antioksidativni potencial. Poleg tega na vsebnost antioksidantov vplivajo različni faktorji, med njimi tudi tip gnojila (Gazzani in sod., 1998). Pričakovali smo torej, da bodo vzorci špinače gnojene z organskimi gnojili dosegali višje vrednosti antioksidativnega potenciala. Najvišjo vrednost so dosegli vzorci špinače gnojene z organskim gnojilom Organik, in sicer 0,071 mmol DPPH/100 g. Vendar se omenjeni rezultati statistično niso razlikovali od rezultatov ostalih skupin špinače. Vzorci špinače gnojene z gnojilom Entec in vzorci špinače gnojene z gnojilom Stallatico so dosegli zelo podobne vrednosti antioksidativnega potenciala, in sicer 0,055 mmol DPPH/100 g ter 0,054 mmol DPPH/100 g. Rezultati omenjenih skupin se med seboj statistično niso razlikovali, prav tako jih nismo mogli razlikovati od rezultatov ostalih skupin špinače. Vzorci špinače gnojene z gnojilom Wsf ter mešanico Org + min so dosegli identične vrednosti, in sicer je povprečna vrednost antioksidativnega potenciala znašala 0,050 mmol DPPH/100 g. Glede na rezultate naših analiz ne moremo trditi, da organsko pridelana špinača vsebuje več antioksidativnih snovi, saj med vzorci glede na tip gnojila ni bilo statistično značilnih razlik. Presenetljivo smo najmanjšo vrednost zabeležili pri kontrolnih vzorcih.

Tuberosa in sod. (2010) so v svoji raziskavi na mirti (*Myrtus communis* L.) pokazali, da obstaja pozitivna korelacija med vsebnostjo skupnih fenolov in antioksidativno aktivnostjo. Tudi v naši raziskavi smo pokazali pozitivno korelacijo med omenjenima parametrima, vendar je ta znašala le 0,12 in ni bila statistično značilna.

### 5.1.6 Vsebnost nitratnega in nitritnega dušika

Vse več dušikovih gnojil se uporablja v proizvodnji zelenjave, saj igrajo pomembno vlogo pri pridelavi pridelka in njegovi kakovosti (Sisson in sod., 1991; Gastal in sod. 2002; Wang in sod., 2003). Nitrat je pogosto glavni vir dušika za višje rastline, še posebno za zelenjavo (Marschner, 1995). Le ta se ob prepočasni redukciji akumulira v rastlinah in v velikih količinah lahko predstavlja nevarnost obolenja človeškega organizma (Van der Boon, 1990; Cárdenas-Navarro, 1999). Ekološko pridelana zelenjava naj bi vsebovala manj nitratov (González in sod., 2010), zato smo tudi mi pričakovali, da bo vsebnost nitratov in nitritov v konvencionalno pridelani špinaci večja.

Rezultati analiz nitratnega in nitritnega dušika v rastlinah špinače so deloma potrdile našo hipotezo. Vzorci špinače gnojeni z gnojilom Wsf so dosegli najvišje povprečne vrednosti, sledili so jim vzorci špinače gnojene z Org + min ter vzorci špinače gnojene s Stallaticom. Špinača gnojena z organskim gnojilom Org je povprečno vsebovala najmanj nitratov in nitritov. Presenetljivo nizko povprečno vsebnost omenjenih dušikovih spojin pa so dosegli vzorci špinače gnojene z gnojilom Entec, predvidoma zaradi počasnega sproščanja dušika iz tega gnojila. Vsebnost nitratov in nitritov se med posameznimi skupinami rastlin glede na tip gnojila statistično značilno ni razlikovala, z izjemo vsebnosti v kontrolnih vzorcih špinače. V slednjih je bila vsebnost nitratov in nitritov nadpovprečno visoka (64,7 mg/kg). Zaradi velike standardne napake ( $\pm 76,6$ ) sklepamo, da je pri analizi prišlo do napak meritev, ki so lahko posledica majhne količine uporabljenega vzorca. Na podlagi dobljenih rezultatov tako ne moremo trditi, da različen tip gnojenja značilno vpliva na vsebnost nitratov in nitritov.

#### **5.1.7 Vsebnost amonijevega dušika**

Amoniak in amonij sta za rastline toksična, zato ju rastline ne shranjujejo v vakuolah, temveč ju že v koreninah asimilirajo v organske molekule, kot so aminokisline, amini, ipd. (Marschner, 1995).

Vsebnost amonijevega dušika je bila najvišja v vzorcih špinače gnojene s Stallaticom, sledijo vzorci špinače gnojene z Wsf. Najmanj amonijevega dušika je vsebovala špinača gnojena z gnojilom Org, medtem ko je bila vsebnost amonijevega dušika v špinači gnojeni z Entec in Org + min zelo podobna. Presenetljivo so kontrolni vzorci dosegli najvišjo vsebnost amonijevega dušika. Zaradi velikih standardnih odklonov ne moremo z gotovostjo trditi, da so razlike v vsebnosti amonijevega dušika posledica uporabe različnih tipov gnojil. Statistično značilno se od ostalih vzorcev razlikujejo le kontrolni vzorci, vendar je to najverjetneje posledica napak med analizo.

## 5.2 SKLEPI

- Najvišje povprečne vrednosti špinače so dosegle rastline gnojene z mineralnim gnojilom Entec in vodotopnim gnojilom Wsf. Najnižje vrednosti pa so po pričakovanjih dosegli kontrolni vzorci špinače.
- Špinača pridelana z uporabo organskega gnojila ima višji antioksidativni potencial. Izmerjena vrednost organsko pridelane špinače je bila 0,071 mmol DPPH/100 g, medtem ko je konvencionalno pridelana špinača dosegla vrednosti med 0,050 in 0,055 mmol DPPH/100 g. Kontrolni vzorci so dosegli najnižje vrednosti, in sicer 0,043 mmol DPPH/100 g.
- Vsebnost skupnih polifenolov je bila najvišja v špinači gnojene z mineralnim gnojilom Entec in kontrolnih vzorcih. Kombinirano gnojenje je prineslo najnižjo vsebnost skupnih polifenolov.
- Določitev vrednosti  $\delta^{13}\text{C}$  se ni pokazala za uporabno metodo za ločevanje med ekološko in konvencionalno pridelavo, saj so vrednosti  $\delta^{13}\text{C}$  zelo podobne, in sicer med -29,5 in -30,9 ‰.
- Določitev vrednosti  $\delta^{15}\text{N}$  se je izkazala za dobro metodo razlikovanja ekološko in konvencionalne pridelane zelenjave, saj potrjuje zastavljeno hipotezo, da organsko pridelane rastline vsebujejo višje  $\delta^{15}\text{N}$  vrednosti. Naše izmerjene vrednosti za organsko pridelavo se gibljejo med 8,6 in 7,8 ‰, medtem ko se vrednosti pri konvencionalnem načinu pridelave gibljejo med 2,9 in 4,3 ‰.
- Vsebnost nitritnega in nitratnega ter amonijevega dušika je najnižja v organsko pridelani špinači, vendar na podlagi dobljenih rezultatov ne moremo trditi, da različen tip gnojenja značilno vpliva na vsebnost anorganskih specij N v špinači.

## 6 VIRI

- Abram V., Simčič M. 1997. Fenolne spojine kot antioksidanti. *Farmacevtski vestnik*, 48: 573-589
- Allegre A., Silvestre J., Morard P., Kallerhof J., Pinelli E. 2004. Nitrate reductase regulation in tomato roots by exogenous nitrate: a possible role in tolerance to long-term root anoxia. *Journal of Experimental Botany*, 55: 2625-2634
- Aminot A., Kirkwood D.S., K  rouel R. 1997. Determination of ammonia in seawater by the idophenol-blue method: Evaluation of the ICES NUTS I/C 5 questionnaire. *Marine Chemistry*, 56: 59-75
- AOAC Official Method 998.12. c-4 plant sugars in honey. 1999. V: Official methods of analysis of AOAC International. Vol. 2. Cunniff P. (ed.). 16<sup>th</sup> ed. Gaithersburg, AOAC International, Chapter 44: 27-30
- Arnon D.I., Stout P.R. 1939. The essentiality of certain elements in minute quantity for plants with special reference to copper. *Plant Physiology*, 14, 3: 371-375
- Azizova O.A. 2002. Role of free radical processes in the development of atherosclerosis. *Biologicheskie Maembrany*, 19: 451-471
- Badeck F-W., Tcherkez G., Nogu  s S., Piel C., Ghashghaie J. 2005. Post-photosynthetic fractionation of stable carbon isotopes between plant organs—a widespread phenomenon. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19: 1381-1391
- Bavec F., Bavec M. 2007. Organic production and use of alternative crops. Boca Raton, Taylor & Francis Group: 241 str.
- Bavec M., Nagli   M., Bavec F., Repi   P., Flisar Novak Z., Po  trak N., Bantan I., Pevec T., Maljevi   J., Matis G., Miklavc J., P  aker P., Darovic A.,   tabuc-Star  evi   D., Ambro  i   I., Zupan  i   M., Slabe A., Tkal  i   E., Ore  sek E. 2001. Ekolo  sko kmetijstvo. Ljubljana, Kme  ki glas: 20-24
- Black C.C., Osmond C.B. 2003. Crassulacean acid metabolism photosynthesis: »working the night shift«. *Photosynthesis Research*, 76: 329-341
- Boyer R. 2005. Temelji biokemije. Ljubljana,   tudentska zalo  ba: 405-405, 478-480
- Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28: 25-30

- Briviba K., Stracke B.A., Rüfer C.E., Watzl B., Weibel F.P., Bub A. 2007. Effect of consumption of organically and conventionally produced apples on antioxidative activity and DNA damage in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 7716-7721
- Cao G.H., Sofic E., Prior R.L. 1996 Antioxidant capacity of tea and vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 3426-3431
- Cárdenas-Navarro R., Adamowicz S., Robin P. 1999. Nitrate accumulation in plants: a role for water. *Journal of Experimental Botany*, 334: 613-624
- Cook N.C., Samman S. 1996 Flavonoids chemistry, metabolism, cardioprotective effect and dietary sources. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 7: 66-76
- Coplein T.B. 1996. New guidelines for reporting stable hydrogen, carbon and oxygen isotope-ratio data. *Geochemica et Cosmochemica Acta*, 60: 3359-3360
- Craig H. 1953. The geochemistry of stable carbon isotopes. *Geochemica et Cosmochemica Acta*, 3: 53-92
- Černe M. 1998. Zelenjadarstvo 1. 1. natis. Železniki, Pami: 175 str.
- Dasgupta A., Klein K. 2014. Antioxidants in food, vitamins and supplements: Prevention and treatment of disease. Amsterdam, Elsevier Science: 344 str.
- Dermastia M. 2007. Pogled v rastline. Ljubljana, Nacionalni inštitut za biologijo: 130-130
- Eichholzer M., Gutzwiller F. 1998. Dietary nitrates, nitrites, and N-nitroso compounds and cancer risk: a review of the epidemiologic evidence. *Nutrition Reviews*, 56: 95-105
- Engel M.H., Macko S.A. 1993 Organic geochemistry: Principles and applications. New York, Plenum Press: 861 str.
- Epstein E., Bloom J.A. 2004. Mineral nutrition of plants: principles and perspectives. 2<sup>nd</sup> ed. Sunderland, Sinauer Associates: 380 str.
- Epstein S., Mayeda T.K. 1953. Variation of <sup>18</sup>O content of water from natural sources. *Geochemica et Cosmochemica Acta*, 4: 213-224
- Fageira N.K., Baligar V.C., Clark R.B. 2002. Micronutrients in crop production. *Advances in Agronomy*, 77: 185-268
- Fageria N.K., Baligar V.C., Jones C.A. 2010. Growth and mineral nutrition of field crops. 3<sup>rd</sup> ed. Boca Raton, CRC Press: 560 str.

- Gastal F., Lemaire G. 2002. N uptake and distribution in crop: an agronomical and ecophysiological perspective. *Journal of Experimental Botany*, 53: 789-799
- Gazzani G., Papetti A., Massolini D., Daglia M. 1998. Anti and prooxidant activity of water soluble components of some common diet vegetables and the effect of thermal treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 4118-4122
- Ghidini S., Ianieri A., Zanardi E., Conter M., Boschetti T., Iacumin P., Bracchi P.G. 2006. Stable isotopes determination in food authentication: A review. *Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria di Parma*, 26: 193-204
- Goldberg D.T. 2010. AP biology. 2<sup>nd</sup> ed. New York, Baron's Educational Series, Inc: 562 str.
- González, M. C. M., M. J. Martínez-Tomé, M. E. T. Isasa. 2010. Nitrate and nitrite content in organically cultivated vegetables. *Food Additives & Contaminants*, 3: 19–29
- Goodwin T.W., Mercer E.I. 1983. Introduction to plant biochemistry. 2<sup>nd</sup> ed. Oxford, Pergamon Press: 528-563
- Gülçin I. 2012. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, 86: 345-391
- Hedges L.J., Lister C.E. 2007. Nutritional attributes of spinach, silver beet and eggplant. Crop Food Research Confidential Report, No. 1928. Christchurch, New Zealand: 29 str.
- Heldt H.W., Piechulla B. 2011. Plant biochemistry. 4<sup>th</sup> ed. London, Academic Press: 656 str.
- Hernandez-Ramirez R.U., Galvan-Portillo M.V., Ward M.H., Agudo A., Gonzalez C.A., Onate-Ocana L.F., Herrera-Geopfert R., Palma-Coca O., Lopez-Carrillo L. 2009. Dietary intake of polyphenols, nitrate and nitrite and gastric cancer risk in Mexico city. *International Journal of Cancer*, 125: 1242-1430
- Hill M.J. 1999. Nitrate toxicity: myth or reality? *British Journal of Nutrition*, 81: 343-344
- Hofman G., van Cleemput O. 2004. Soil and plant nitrogen. Paris, International Fertilizer Industry Association: 48 str.
- Hogberg P., Johannison C., Hogberg M., Hogbom L., Nasholm T., Hallgren J.E. 1995. Measurment of abundances of N-15 and C-13 as a tools in retrospective studies of N

- balances and water-stress in forests: a discussion of preliminary results. *Plant Soil*, 168-169, 1: 125-133
- Horchani F., Aschi-Smiti S., Brouquisse R. 2010. Involvement of nitrate reduction in the tolerance of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) to prolonged root hypoxia, *Acta Physiologiae Plantarum*, 32: 1113-1123
- Hunter D., Foster M., McArthur J.O., Ojha R., Petocz P., Samman S. 2011. Evaluation of micronutrient composition of plant foods produced by organic and conventional agricultural methods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51:571-582
- Kähkönen M.P., Hopia A.I., Rauha J.P., Pihlaja K., Kujala T.S., Heinonen M. 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 3954- 3962
- Kelly S.D. 2003. Using stable isotope ratio mass spectroscopy (IRMS) in food authentication and traceability. V: *Food authenticity and traceability*. Less M. (ed.). Cambridge, Woodhead Publishing Limited: 156-183
- 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. Osnove kemijske analize mošta in vina: laboratorijske vaje za predmet Tehnologija vina. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 97-101
- Kötschau A., Büchel G., Einax J.W., Fischer C., Von Tümping W., Merten D. 2013. Mapping of macro and micro elements in the leaves of sunflower (*Helianthus annuus*) by Laser Ablation-ICP-MS. *Microchemical Journal*, 110: 783-789
- Kukovec K. 2006. Frakcionacija stabilnih izotopov ogljika in dušika v fitoplanktonu Tržaškega zaliva. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 57 str.
- Leegood R.C. 2004. Photosynthesis. V: *Encyclopedia of biological chemistry*. Vol. 3. Leegood R.C., Sharkey T.D., von Caemmerer S. (eds.). Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 330-335
- Loliger J. 1991. The use of antioxidants in foods. V: *Free radicals and food additives*. In Aruoma O.I., Halliwell B. (eds.). London, Taylor Francis: 121-150
- Marschner H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. 2<sup>nd</sup> ed. London, Academic Press: 889 str.

- Mengel K., Kirkby E.A., Kosegarten H., Appel T. 2001. Principles of plant nutrition. 5<sup>th</sup> ed. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 849 str.
- Mihelič R., Čop J., Jakše M., Štampar F., Majer D., Tojnko S., Vršič S. 2010. Smernice za strokovno utemeljeno gnojenje. Ljubljana, Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano: 124-126
- MKGP. 2014. Ekološko kmetovanje. Ljubljana, Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano: 4 str.  
[www.mkgp.gov.si](http://www.mkgp.gov.si) (julij, 2014)
- Miller A.J., Fan X., Orsel M., Smith S.J., Wells D.M. 2007. Nitrate transport and signalling, *Journal of Experimental Botany*, 58: 2297-2306
- Namiki M. 1990. Antioxidant/antimutagens in food. *CRC Critical Review Food Science and Nutrition*, 29: 273-300
- Nijveldt R.J., van Nood E., van Hoorn D.E.C., Boelens P.G., van Norsen K., van Leeuwen P.A.M. 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of actions and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition*, 74: 418-425
- Nonnecke L.I. 1989. Vegetable production. New York, Van Nostrand Reinhold: 657 str.
- Nordberg J., Arner E.S.J. 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine*, 31: 1287-1312
- Osvald J., Kogoj Osvald M. 2005. Vrtnarstvo: splošno vrtnarstvo in zelenjadarstvo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 591 str.
- Raigon M.D., Rodriguez-Burrueozo A., Prohens J. 2010. Effects of organic and conventional cultivation methods on composition of eggplant fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 6833-6840
- Ramaratham N., Ochi H., Takeuchi M. 1996. Antioxidant defense in vegetable extracts. V: Natural antioxidants chemistry, health effects and applications. Shahidi F. (ed.). Illinois, American Oil Chemists' Society: 76-78
- Reinink K., Eenink A. 1988. Genotypical differences in nitrate accumulation in shoots and roots of lettuce. *Scientia Horticulturae*, 37: 13-24
- Rogers K.M. 2008. Nitrogen isotopes as a screening tool to determine the growing regimen of some organic and nonorganic supermarket produce from New Zealand. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 4078-4083

- Rubatzky E.V., Yamaguchi M. 1997. World vegetables: Principles, production and nutritive values. 2<sup>nd</sup> ed. New York, Chapman & Hall: 843 str.
- Shahidi F. 1996. Natural antioxidants. V: Natural antioxidants: Chemistry, health effects and applications. Shahidi F. (ed.). Illinois, American Oil Chemists Society: 1-11
- Sisson V.A., Rufty T.W., Williamson R.E. 1991. Nitrogen-use efficiency among flue-cured tobacco genotypes. *Crop Science*, 31: 1615-1620
- Šturm M., Lojen S. 2011. Nitrogen isotopic signature of vegetables from the Slovenian market and its suitability as an indicator of organic production. *Isotopes in Environmental and Health Studies*, 47, 2: 214-220
- Thomas A.I., Sodek L. 2005. Development of nodulated soybean plant after flooding of the root system with different sources of nitrogen. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17: 291-297
- Trought M.C.T., Drew M.C. 1981. Alleviation of injury to young wheat plants in anaerobic solution cultures in relation to the supply of nitrate and other inorganic nutrients, *Journal of Experimental Botany*, 32: 509-522
- Tuberoso C.I.G., Rosa A., Bifulco E., Melis M.P., Atzeri A., Pirisi F.M., Dessi M.A. 2010. Chemical composition and antioxidant activity of *Myrtus communis* L. berries extracts. *Food Chemistry*, 4: 1242-1251
- Uno G., Storey R., Moore R. 2001. Principles of botany. New York, The McGraw Hill Companies: 240-249
- Van der Boon J., Steenhuizen J.W., Steingröver E.G. 1990. Growth and nitrate concentration of lettuce as affected by total nitrogen and chloride concentration,  $\text{NH}_4/\text{NO}_3$  ratio and temperature of the recirculating nutrient solution. *Journal of Horticultural Science* 65: 309-321
- Von Wirén N., Gazzarrini S., Frommer W.B. 1997. Regulation of mineral nitrogen uptake in plants. *Plant and Soil*, 196: 191-199
- Velioglu Y.S., Mazza G., Gao Y.L., Oomah B.D. 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 4113-4117
- Wang C., Guo L., Li Y., Wang Z. 2012. Systematic comparison of C3 and C4 plants based on metabolic network analysis. *BMC Systems Biology*, 6, Suppl. 2: S9, doi: 10.1186/1752-0509-6-S2-S9: 14 str.

Wang Z.-H., Li S.-X. 2003. Effects of N forms and rates on vegetable growth and nitrate accumulation. *Pedosphere*, 13: 309-316

Young I.S., Woodside J.V. 2001. Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, 54: 176-186

## **ZAHVALA**

Mentorju prof. dr. Rajku Vidrihu in somentorici izr. prof. dr. Nives Ogrinc se zahvaljujem za pomoč in usmerjanje pri izvedbi diplomskega dela, prof. dr. Tatjani Košmerl hvala za hitro in natančno recenzijo.

Lini Burkan Makivić se zahvaljujem za natančen in hiter pregled diplomskega dela.

Posebno se zahvaljujem staršem za vso pomoč in podporo pri študiju.

Posebna hvala gre tudi tebi Tjaša, ker verjameš vame in me vseskozi nesebično podpiraš.

Seanu Čebroonu hvala za pomoč v rastlinjaku in laboratoriju.

Vsem sošolcem in sošolkam hvala za nepozabne trenutke v času študija, še posebno Urošu Zalarju in Matiji Keteju.