

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Damjana ŠPELIČ

**VPLIV GNOJENJA NA KEMIJSKO IN IZOTOPSKO  
SESTAVO JABOLK SORTE GALA**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Damjana ŠPELIČ

**VPLIV GNOJENJA NA KEMIJSKO IN IZOTOPSKO SESTAVO  
JABOLK SORTE GALA**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**INFLUENCE OF FERTILIZATION ON CHEMICAL AND ISOTOPIC  
COMPOSITION OF GALA APPLES**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2013

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je bilo na Odseku za znanosti o okolju Instituta »Jožefa Stefana« v Podgorici in v laboratoriju Katedre za tehnologije, prehrano in vino Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

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

Mentor: prof. dr. Rajko Vidrih

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

Damjana Špelič

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn  
DK UDK 634.11:641.1:631.8:543.51(043)=163.6  
KG jabolka/ekološka pridelava/konvencionalna pridelava/izotopi/izotopska sestava/  
antioksidativni potencial/skupne fenolne spojine/nitrati/zrelostni faktorji/  
spektrofotometrične metode/IRMS  
AV ŠPELIČ, Damjana  
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 2013  
IN VPLIV GNOJENJA NA KEMIJSKO IN IZOTOPSKO SESTAVO JABOLK  
SORTE GALA  
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)  
OP IX, 57 str., 12 pregl., 12 sl., 84 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI Namen naloge je bil ugotoviti, kakšne so razlike v kemijski in izotopski sestavi  
jabolk sorte Gala, gnojenih z organskimi ali mineralnimi gnojili. V raziskavo je bilo  
vključenih šest vzorcev jabolk, gnojenih z mineralnimi dušikovimi gnojili, štiri  
vzorca jabolk, gnojena z organskimi gnojili in en vzorec negnojenih jabolk, ki je  
služil kot kontrola. Gnojila so bila dodana v dveh odmerkih, in sicer 60 kg N/ha in  
120 kg N/ha. Analitični del je obsegal določanje zrelostnih faktorjev (trdote jabolk,  
določanje vsebnosti škroba in suhe snovi), določanje vsebnosti amonijevih ionov  
ter skupne vsebnosti nitratov in nitritov, vsebnosti skupnih fenolnih spojin ter  
merjenje antioksidativnega potenciala. Z metodo IRMS (Isotope Ratio Mass  
Spectrometry) smo izmerili vrednosti  $\delta^{15}\text{N}$  v pulpi jabolk ter vrednosti  $\delta^{13}\text{C}$  v pulpi  
in sladkorjih jabolk. Gnojenje ne vpliva na trdoto plodov in vsebnost škroba. Pri  
jabolkah, gnojenih z organskimi gnojili, smo določili nekoliko večjo vsebnost suhe  
snovi. Vsebnost skupnih fenolnih spojin in antioksidativni potencial se nista  
razlikovala med organsko in mineralno gnojenimi jabolki. Pri manjšem odmerku  
gnojila smo določili manjšo vsebnost amonijevih ionov in skupne vsebnosti  
nitratov in nitritov, vendar ne moremo z gotovostjo potrditi, da vrsta gnojila in  
odmerek značilno vplivata na vsebnost dušika v obliki amonijevih ionov ter  
skupnih vsebnosti nitratov in nitritov v rastlini. Vrsta in odmerek gnojila ne  
vplivata na  $\delta^{13}\text{C}$  vrednosti. Jabolka, gnojena z organskimi gnojili, imajo višje  $\delta^{15}\text{N}$   
vrednosti kot tista, gnojena z mineralnimi gnojili, kar potrjuje domnevo, da  
predstavljajo  $\delta^{15}\text{N}$  vrednosti pomemben parameter pri razlikovanju med  
konvencionalno in ekološko pridelavo.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC UDK 634.11:641.1:631.8:543.51(043)=163.6  
CX apples/organic production/conventional production/isotopes/isotopic composition/antioxidant activity/total phenolics/nitrates/maturity factors/ spectrophotometric methods/IRMS  
AU ŠPELIČ, Damjana  
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 2013  
TI INFLUENCE OF FERTILIZATION ON CHEMICAL AND ISOTOPIC COMPOSITION OF GALA APPLES  
DT Graduation thesis (University studies)  
NO IX, 57 p., 12 tab., 12 fig., 84 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB The aim of the present study was to determine the differences in the chemical and isotopic composition of apple cultivar Gala, fertilized with either organic or mineral fertilizers. The study included 6 samples of apples, fertilized with mineral nitrogen fertilizers, 4 samples of apples, fertilized with organic manure and 1 sample of unfertilized apples used as a control. The amounts of fertilizers added were calculated depending on the content of nitrogen in fertilizers (according to producer's certificate data sheet) in a way that provided 60 and 120 kg of nitrogen per hectare. Analytical part included the determination of the maturity factors (firmness of apples, the determination of starch and soluble solids), the determination of the concentrations of ammonium ions and total concentrations of nitrate and nitrite, the total phenolic compounds and the measurements of antioxidative activity.  $\delta^{15}\text{N}$  values in pulp and  $\delta^{13}\text{C}$  values in pulp and sugars isolated from apple juice were obtained using the isotope ratio mass spectrometry (IRMS - Isotope Ratio Mass Spectrometry). Fertilization did not affect the firmness of the fruit and starch content. Higher soluble solids content was found in apples fertilized with organic fertilizers. There was no significant difference in the content of total phenolic compounds and antioxidant potential between organically and minerally fertilized apples. Lower content of ammonium ions and total content of nitrates and nitrites was determined in samples where lower amount of fertilizer was applied, nevertheless, we can not confirm that the type and dose of fertilizer significantly affect the amount of nitrogen determined as ammonium ions or total amount of nitrates and nitrites in the plant. In addition the type and dose of fertilizers did not affect the  $\delta^{13}\text{C}$  values. On the other hand organically fertilized apples exhibit higher  $\delta^{15}\text{N}$  values than those fertilized with mineral fertilizers indicating that  $\delta^{15}\text{N}$  value is an important parameter for distinguishing apples produced by organic and conventional production practice.

## KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION .....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO SLIK.....	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....	IX
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN DELA.....	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE .....	2
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 JABLANA ( <i>Malus domestica</i> Borkh).....	3
2.2 NAČINI PRIDELAVE SADJA.....	4
<b>2.2.1 Ekološka pridelava sadja .....</b>	<b>4</b>
<b>2.2.2 Integrirana pridelava sadja .....</b>	<b>6</b>
<b>2.2.3 Konvencionalna pridelava sadja .....</b>	<b>6</b>
<b>2.2.4 Vpliv načina pridelave na kakovost sadja.....</b>	<b>7</b>
2.3 PREHRANA RASTLIN V EKOLOŠKI IN KONVENCIONALNI PRIDELAVI ...	8
<b>2.3.1 Gnojenje jablan .....</b>	<b>9</b>
<b>2.3.2 Najpogostejša organska gnojila.....</b>	<b>11</b>
2.4 IZOTOPI.....	12
<b>2.4.1 Stabilni izotopi .....</b>	<b>12</b>
<b>2.4.2 Stabilni izotopi dušika in vplivi na njihovo porazdelitev .....</b>	<b>14</b>
2.4.2.1 Kroženje dušika in spreminjanje izotopske sestave dušika.....	16
2.4.2.2 Uporaba $\delta^{15}\text{N}$ za razlikovanje med ekološko in konvencionalno pridelavo	17
<b>2.4.3 Vplivi na porazdelitev stabilnih izotopov <math>^{12}\text{C}</math> in <math>^{13}\text{C}</math>.....</b>	<b>19</b>
2.4.3.1 Kroženje ogljika .....	19
<b>2.4.4 Določanje izotopskega razmerja z metodo IRMS .....</b>	<b>21</b>
2.5 VSEBNOST NITRATOV V ŽIVILIH EKOLOŠKE IN KONVENCIONALNE PRIDELAVE .....	23
<b>2.5.1 Vpliv nitratov in nitritov na zdravje.....</b>	<b>24</b>
2.6 ANTIOKSIDANTI.....	24
<b>2.6.1 Prosti radikali in oksidativni stres .....</b>	<b>24</b>
<b>2.6.2 Antioksidanti.....</b>	<b>24</b>
<b>2.6.3 Antioksidativni potencial .....</b>	<b>25</b>
<b>2.6.4 Določanje antioksidativnega potenciala s kolorimetričnim določanjem vsebnosti standardnega radikala.....</b>	<b>26</b>
2.7 FENOLNE SNOVI.....	26

2.7.1 Funkcija fenolnih snovi.....	26
2.7.2 Delitev fenolnih snovi .....	26
2.7.3 Pomen fenolnih snovi za zdravje ljudi.....	27
2.7.4 Fenolne snovi v jabolkih .....	27
2.8 ZRELOSTNI FAKTORJI .....	28
2.8.1 Določanje trdote jabolčk.....	28
2.8.2 Škrobni test .....	29
2.8.3 Določanje suhe snovi .....	29
<b>3 MATERIALI IN METODE</b> .....	<b>31</b>
3.1 MATERIALI .....	31
3.1.1 Jabolčka.....	31
3.1.2 Priprava vzorcev jabolčnega soka za nadaljnje meritve .....	31
3.2 METODE DELA .....	32
3.2.1 Določanje vsebnosti dušikovih in ogljikovih izotopov v iztisnjem jabolčnem soku .....	32
3.2.1.1 Določanje $\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{15}\text{N}$ vrednosti v pulpi jabolčnega soka z metodo IRMS .....	32
3.2.1.2 Določanje $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti sladkorjev v jabolčnem soku z metodo IRMS ...	33
3.2.2 Določanje amonijevih ionov ter skupne koncentracije nitratov in nitritov v jabolčnem soku .....	34
3.2.3 Določanje antioksidativnega potenciala v jabolčnem soku s prostim radikalom DPPH' .....	35
3.2.4 Določanje skupnih fenolnih spojin.....	36
3.2.5 Zrelostni faktorji .....	38
3.2.5.1 Določanje trdote mesa jabolčk .....	38
3.2.5.2 Določanje vsebnosti škroba .....	38
3.2.5.3 Določanje vsebnosti suhe snovi.....	38
<b>4 REZULTATI IN RAZPRAVA</b> .....	<b>39</b>
4.1 REZULTATI MERJENJA $\delta^{13}\text{C}$ VREDNOSTI V JABOLČNEM SOKU .....	40
4.2 REZULTATI MERJENJA $\delta^{15}\text{N}$ VREDNOSTI V JABOLČNI PULPI.....	41
4.3 AMONIJEVI IONI TER SKUPNA KONCENTRACIJA NITRATOV IN NITRITOV V JABOLČNEM SOKU .....	42
4.4 VREDNOSTI AOP V JABOLČNEM SOKU.....	44
4.5 REZULTATI DOLOČANJA SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN.....	45
4.6 REZULTATI DOLOČANJA ZRELOSTNIH FAKTORJEV.....	46
<b>5 SKLEPI</b> .....	<b>47</b>
<b>6 POVZETEK</b> .....	<b>49</b>
<b>7 VIRI</b> .....	<b>51</b>
ZAHVALA	

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Prednosti in pomanjkljivosti ekološkega kmetijstva (Bavec, 2001: 23) .....	5
Preglednica 2: Prednosti in pomanjkljivosti konvencionalnega kmetijstva (Bavec, 2001: 23) .....	6
Preglednica 3: Osnovne razlike med ekološkim in konvencionalnim kmetijstvom (Bavec, 2001: 22) .....	7
Preglednica 4: Učinek fertilizacije na vsebnost mineralov v jabolkah (Kriškovič, 1989: 150) .....	9
Preglednica 5: Primerjalni pregled gnojenja oz. prehrane rastlin (Kriškovič, 1989: 57) .....	9
Preglednica 6: Znaki pomanjkanja in presežka elementov (hranil) v rastlini (Štampar in sod., 2009: 116) ...	10
Preglednica 7: Gnojilna vrednost za 10 ton oz. 10 m <sup>3</sup> organskih gnojil v kilogramih (kg) (Štampar in sod., 2009: 117) .....	11
Preglednica 8: Izmerjene vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ v gnojilih, ki smo jih uporabili v poskusu .....	18
Preglednica 9: Priporočene vrednosti za škrobni indeks, trdoto, vsebnost sladkorja in organskih kislin pri nekaterih sortah jablan (vrednosti veljajo za tehnološko zrelost) (Štampar in sod., 2009: 208) .....	30
Preglednica 10: Oznake vzorcev, pomen oznak in tip uporabljenega gnojila (organsko/mineralno) .....	31
Preglednica 11: Rezultati povprečnih vrednosti in standardnih odklonov meritev suhe snovi, trdote, škrobnega indeksa, koncentracije amonijevih ionov in skupne koncentracije nitratnih in nitritnih ionov v vzorcih jabolk .....	39
Preglednica 12: Rezultati povprečnih vrednosti in standardnih odklonov meritev $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti v sladkorjih in jabolčni pulpi, $\delta^{15}\text{N}$ v pulpi, koncentracija skupnih fenolnih spojin ter AOP v vzorcih jabolk .....	39



## KAZALO SLIK

Slika 1: Jabolka sorte Gala (Viršček Marn in Stopar, 1998: 77) .....	3
Slika 2: Območje $\delta^{15}\text{N}$ (‰) v naravnih spojinah (SAHRA, 2005).....	15
Slika 3: Značilne vrednosti izotopske sestave dušika in kisika v različnih okoljih (Pezdič, 1999: 109).....	15
Slika 4: Dušikov cikel v naravi (Pezdič, 1999: 37) .....	16
Slika 5: Kroženje dušika v naravi (SAHRA, 2005).....	17
Slika 6: Pomembnejši rezervoarji ogljika ( $\delta^{13}\text{C}$ ) (Pezdič, 1999: 34).....	20
Slika 7: Princip delovanja sistema IRMS (Clark, 2000).....	22
Slika 8: Merjenje trdote mesa jabolk z mehanskim penetrometrom (Evaluating fruit..., 2009).....	29
Slika 9: Določanje vsebnosti škroba z jodovico (Evaluating fruit..., 2009).....	38
Slika 10: Povprečne $\delta^{15}\text{N}$ vrednosti v pulpi jabolk, gnojenih z organskimi in mineralnimi gnojili .....	41
Slika 11: $\delta^{15}\text{N}$ vrednosti organskih in mineralnih gnojil .....	42
Slika 12: Vrednosti AOP v jabolkih, gnojenih z organskimi in mineralnimi gnojili.....	44

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AD - gnojilo Apneni dušik

AOP – antioksidativni potencial

BS - gnojilo Biosol

C<sub>3</sub> - rastline: skupina rastlin, ki za pridobivanje sladkorjev uporablja C3 ali Calvinov cikel

C<sub>4</sub> - rastline: skupina rastlin, ki za pridobivanje sladkorjev uporablja C4 ali Hatch-Slackov cikel

CAM - rastline: skupina rastlin, ki za pridobivanje sladkorjev uporablja CAM (ang. Crassulacean Acid Metabolism) cikel

DPPH<sup>\*</sup> - stabilni prosti radikal 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil

δ<sup>13</sup>C - izotopska sestava ogljika, izražena v ‰

δ<sup>15</sup>N - izotopska sestava dušika, izražena v ‰

F.C. - Folin-Ciocalteujev reagent

GŽI - gnojilo živalskega izvora (Plantella organic)

IRMS - masna spektrometrija za merjenje izotopskih razmerij lahkih izotopov (angl. Isotope Ratio Mass Spectrometry)

NH<sub>4</sub><sup>+</sup> - amonijev ion

NO<sub>2</sub><sup>-</sup> - nitritni ion

NO<sub>3</sub><sup>-</sup> - nitratni ion

ROS - reaktivne kisikove spojine

SFS - skupne fenolne spojine

SS - vsebnost suhe snovi, izražena v %

UR - mineralno gnojilo Urea

## 1 UVOD

Slovenija je tradicionalna sadjarska dežela, kjer se že vrsto let prideluje sadje za domačo uporabo in tudi za prodajo. V današnjem hitrem in vse bolj stresnem tempu življenja ima za ohranjanje človekovega zdravja vse večji pomen zdrava prehrana. Uživanje sadja in zelenjave lahko bistveno pripomore k boljšemu zdravju. Sadje in vrtnine predstavljajo skoraj idealno hrano za človeka v vseh starostnih obdobjih, ker vsebujejo številne vitamine, antioksidativne in mineralne snovi, prehranske vlaknine, aktivne encimske komplekse in ne prispevajo veliko k energijski vrednosti obrokov.

Spremembe v načinu življenja narekujejo spremenjen način prehranjevanja ter uživanje bolj kakovostne hrane. Najpomembnejše pri pridelovanju je, da je sadje zdravo in kakovostno. Na to namreč vse prevečkrat pozabljamo. Nikoli prej se ni toliko govorilo o kakovosti sadja, kot se govori danes.

Pri pridelavi hrane je pomembno tudi ohranjanje okolja. Hrano pridelujemo na ekološki, integriran ali konvencionalni način. Pri konvencionalnem načinu pridelovanja se poslužujemo intenzivne rabe tal, agresivne uporabe kmetijskih tehnik, uporablja se veliko kemičnih sredstev s širokim spektrom delovanja, kar močno obremenjuje okolje. Pri konvencionalni prehrani rastlin imajo posebno mesto dušikova, fosforjeva in kalijeve gnojila v obliki mineralnih gnojil. Temelj ekološke pridelave je dolgoročno ohranjanje zdravega okolja. Pri uporabi pomožnih snovi smo omejeni, saj ekološki način pridelave prepoveduje uporabo lahko topnih mineralnih gnojil, kemično-sintetičnih sredstev za zatiranje bolezni in škodljivcev. Za gnojenje se uporabljajo le naravna, organska gnojila, kar zahteva več delovnih izkušenj in znanja.

Ozaveščenost ljudi o zdravi prehrani se povečuje, kar vodi v večje povpraševanje po živilih ekološke pridelave. Posledično je cena teh živil v primerjavi s konvencionalno pridelanimi višja. Znano je, da imajo organsko pridelana živila boljše senzorične lastnosti, vsebujejo manj pesticidov, več hranil in zaščitnih snovi, ter manj nitratov kot konvencionalno pridelana živila.

### 1.1 NAMEN DELA

Namen diplomskega dela je bil ugotoviti, kakšne so razlike med jabolki sorte Gala, gnojenimi z organskimi in mineralnimi gnojili.

Od kemijskih lastnosti smo določali vsebnost skupnih fenolnih spojin, izmerili antioksidativni potencial jabolk, vsebnost amonijevih ionov ter skupno koncentracijo nitratov in nitritov. Določili smo tudi zrelostne faktorje (vsebnost suhe snovi, vsebnost škroba in trdoto jabolk).

Za določitev vsebnosti dušikovih in ogljikovih izotopov v iztisnjem jabolčnem soku smo uporabili metodo IRMS. Izmerili smo vrednosti  $\delta^{13}\text{C}$  v sladkorjih in pulpi jabolk ter vrednosti  $\delta^{15}\text{N}$  v jabolčni pulpi.

## 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Predvidevamo, da obstajajo razlike v kemijski in izotopski sestavi jabolk glede na način pridelave oz. način gnojenja.

Gnojenje z industrijskimi gnojili daje večje plodove s povečano vsebnostjo vode, vsebnost suhe snovi pa se ne razlikuje veliko od suhe snovi v plodovih, gnojenih z organskimi gnojili. Plodovi sadnih dreves, gnojenih z organskimi gnojili, so precej bolj kakovostni glede vsebnosti sladkorja in rudninskih snovi, vsebovali naj bi več fenolnih spojin in vitaminov, večji naj bi bil tudi antioksidativni potencial v primerjavi s konvencionalno pridelanimi. Konvencionalno pridelana jabolka naj bi vsebovala več amonijevih ionov ter nitratov in nitritov kot jabolka, gnojena z organskimi gnojili, zaradi uporabe NPK gnojil in boljšega izkoristka dodanih hranil.

Glede vsebnosti dušikovih in ogljikovih izotopov (razmerje  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  in  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) lahko ločujemo plodove ekološke in konvencionalne pridelave. Jabolka, gnojena z organskimi gnojili, imajo bistveno večje vrednosti  $\delta^{15}\text{N}$  ter nekoliko nižje  $\delta^{13}\text{C}$  vrednosti kot konvencionalno pridelana jabolka (uporaba mineralnih gnojil).

## 2 PREGLED OBJAV

V začetku 20. stoletja so nas poznali po goriških češnjah, pozneje, med obema vojnama, po jabolkih, ki smo jih uspešno prodajali po vsej Evropi. Podnebje in tla sta tista dejavnika, ki omogočata gojenje širokega spektra sadnih vrst, npr. jablan, hrušk, breskev, češenj, sliv, marelic.

Trenutno v Sloveniji intenzivno pridelujemo sadje na 5276 ha. Prevladujejo jablane, oljke, breskve, hruške in še drugo sadje. V zadnjih letih delež jablan in oljk raste, delež hrušk pa se izrazito zmanjšuje. Pri sortah jablane prevladuje Idared z 27,9 %, v mladih nasadih pa prevladujejo sorte Gala, Fuji in Breaburn (Štampar in sod., 2009).

### 2.1 JABLANA (*Malus domestica* Borkh)

Žlahtna jablana, ki jo gojimo za namizna jabolka ali predelavo, spada v družino rožnic (*Rosaceae*), poddružino *Pomoideae* oz. po novem *Maloideae* in v rod *Malus* (Viršček Marn in Stopar, 1998).

Jablana najbolj uspeva na zmerno kislih (pH 5,5-6,5) in zmerno vlažnih tleh, ki so bogata s hranili in humusom (2-4 %), predvsem ji ustrezajo globoka, peščeno-ilovnata tla. Velike razlike med dnevnimi in nočnimi temperaturami v jeseni pomembno vplivajo na ustrezno obarvanje plodov. Tople noči ne vplivajo ugodno na obarvanje sadežev (Štampar in sod., 2009).

Sorta Gala je križanec sort Kidds orange red in Zlati delišes (Janković, 1990). Vzgojil jo je J.H. Kidd v Greytownu na Novi Zelandiji. V pridelavo so jo uvedli leta 1965. V slovenskem sadnem izboru je uvrščena med postranske sorte (Viršček Marn in Stopar, 1998). Sorta Gala je diploid, cveti srednje pozno. Gala je zelo rodna, zato je redčenje neizogibno (Janković, 1990). Zori konec avgusta, začetek septembra, plodovi so užiti takoj po obiranju. V navadnem skladišču zdrži do decembra. V hladilnici jo pri 0 do 1 °C lahko skladiščimo do januarja ali februarja, v kontrolirani atmosferi pri 1 do 2 °C, 3 do 4 % CO<sub>2</sub> in 1 do 3 % O<sub>2</sub> pa do marca ali aprila (Viršček Marn in Stopar, 1998).



Slika 1: Jabolka sorte Gala (Viršček Marn in Stopar, 1998: 77)

Plodovi so srednje debeli do majhni z gladko kožo z osnovno zlatorumeno barvo in krovno svetlečo rdečo barvo, ki pokriva od 1/2 do 2/3 plodu. Okus Gale je sladek in aromatičen, meso pa rumeno, čvrsto, sočno, s specifično aromo z malo kislinami (Janković, 1990).

## 2.2 NAČINI PRIDELAVE SADJA

Obdelovanje tal in reja živali sta vedno povezana z vplivanjem na kulturno krajino in naravo, torej na življenjski prostor ljudi in živali. Kmetijsko izkoriščanje naravnega okolja mora dolgoročno ohranjati okolje zdravo in s tem omogočati najnujnejše za zdravo življenje (Lind in sod., 2001).

Sadje v razvitih državah sveta pridelujejo na integriran in konvencionalen način, vse več se ga pridelava tudi na ekološki način. Temeljna načela pri integrirani in ekološki pridelavi so podobna. Razlikujejo se le v izbiri metod za doseganje ciljev. Pri obeh načinih pridelave dolgoročno stremimo k izboljšanju in ohranjanju rodovitnosti tal, povečanju odpornosti sadnih rastlin proti škodljivim organizmom, iščemo mehanizme za naravni nadzor škodljivcev in bolezni (koristni organizmi). Težimo k zmanjšani uporabi sredstev za varstvo rastlin, gnojil, sredstev za uravnavanje rasti in podobnih pripomočkov (Štampar in sod., 2009).

### 2.2.1 Ekološka pridelava sadja

Ekološko kmetijstvo – sadjarstvo temelji na dolgoročnem ohranjanju zdravega okolja in zagotavljanju ustreznih razmer za življenje koristnih organizmov v nasadih. Ekološko kmetijstvo je način trajnostnega kmetijstva, ki v pridelavi hrane temelji na ravnovesju v sistemu tla-rastline-živali-človek (Repič in sod., 2005; Bavec, 2001).

Ekološka pridelava sadja v Sloveniji naj bi se začela leta 1997 s projektom ekološke pridelave na škrlup odporne sorte topaz v Sadjarski zadrugi Posavje. Projekt je združeval pridelavo sadik, tehnološko svetovanje in prodajo jabolok. Ta sorta je v zelo kratkem času dosegla prepoznavnost na trgu in danes je ime topaz sinonim za ekološko pridelana jabolka (Caf in Brence, 2010). Z razvojem odpornih in robustnih sort jablan je varstvo pred nekaterimi boleznimi nepotrebno, kar je dalo zagon ekološkemu sadjarstvu (Štampar in sod., 2009).

V ekološki pridelavi smo pri uporabi pomožnih snovi omejeni, saj ta način pridelave prepoveduje uporabo lahko topnih mineralnih gnojil, kemično-sintetičnih sredstev za zatiranje bolezni in škodljivcev, herbicidov ter regulatorjev rasti, razkuženega semena (Repič in sod., 2005; Štampar in sod., 2009; Bavec, 2001). V ospredju je obdelovanje v skladu z naravnimi zakonitostmi, gospodarjenje v sožitju z naravo (Lind in sod., 2001; Caf in Brence, 2010).

Z natančnim upoštevanjem različnih preprečevalnih ukrepov, kot so izbira primerne lege za nasad, izbira bolj odpornih sort, ustrezna obdelava tal, gnojenje z organskimi gnojili in rez, lahko zmanjšamo uporabo sredstev v ekološki pridelavi (Štampar in sod., 2009; Bavec, 2001). Dopolnilna uporaba ustreznih mineralnih ali organskih gnojil je dovoljena le v primeru, če ustrezne prehrane rastlin v trajnih nasadih v okviru kolobarjenja ali izboljševanja tal z mehaničnimi ukrepi, organskim gnojenjem, ozelenitvijo ni mogoče zagotoviti (Repič in sod., 2005; Bavec, 2001).

Ekološko sadjarstvo je strokovno najbolj zahtevna in delovno intenzivna vrsta sadjarstva, kjer moramo dosledno spoštovati in povezati vsa do sedaj uveljavljena strokovna znanja, naravne danosti prostora in zahteve posameznih sadnih vrst in sort (Caf in Brence, 2010). Potrebno je tudi poiskati ustrezno tržišče za svoje ekološke pridelke (Štampar in sod., 2009).

Preglednica 1: Prednosti in pomanjkljivosti ekološkega kmetijstva (Bavec, 2001: 23)

EKOLOŠKO KMETIJSTVO	
Prednosti/možnosti/pozitivni učinki	Pomanjkljivosti/nevarnosti/šibke točke
boljša kakovost - višje cene	manjši pridelki
varstvo okolja, ni onesnaževanja okolja s pesticidi	višji pridelovalni stroški
kontrolne službe nadzirajo pridelavo	neozaveščenost kmetov in kupcev, pomanjkanje kupcev
zmanjšana odvisnost od industrije gnojil in pesticidov	v prvih letih po preusmeritvi velik pritisk plevelov, bolezni in škodljivcev
osebna ozaveščenost kmeta	potrebna sprememba v načinu razmišljanja
način mišljenja in življenja	potrebna so nova/drugačna znanja o pridelavi
ob primerni skrbi za organska gnojila ni onesnaževanja z nitrati	preusmeritveno obdobje traja dve leti ali dlje, da so pridelki priznani kot ekološki - v tem času je problem prodaje
pridelki z najvišjo notranjo vrednostjo; zdrava živila brez ostankov pesticidov	nujne investicije v stroje za mehanično zatiranje plevelov in prilagoditev hlevov
zadovoljitev povpraševanja na trgu	potrebno je spremeniti način prodaje (neposredno trženje), čim višjo dodano vrednost (pakiranje, dodelava...) doseči že na kmetiji
ohranitev stika z naravo, zdravo življenje na kmetiji	
višje podpore na hektar	

Ne glede na razloge za preusmeritev v ekološko kmetovanje je najpomembnejša motivacija, saj se kmet odpove uporabi sintetičnih sredstev za varstvo rastlin, lahko topnih mineralnih gnojil in dokupu večjih količin krme za živali. To kmetijstvo ohranja primerno razmerje med velikostjo posestva in kmetijsko tehniko, omogoča ohranitev stika z naravo, ki je raznovrstna, brez množične reje živali, brez uporabe pesticidov,... Pri takem načinu kmetovanja moramo dosti več razmišljati, sprejemati novosti, eksperimentirati, uvajati nove načine trženja... (Bavec, 2001).

## 2.2.2 Integrirana pridelava sadja

V Sloveniji smo uvedli integrirano pridelavo leta 1991. Integrirana pridelava pomeni uravnoteženo uporabo agrotehničnih ukrepov ob skladnem upoštevanju gospodarskih, okoljskih in toksikoloških dejavnikov. Ob tem imajo pri enakem gospodarskem učinku naravni ukrepi prednost pred fitofarmaceutskimi in biotehnološkimi ukrepi.

Integrirano varstvo rastlin je najbolj primerna kombinacija biotičnih, tehnoloških in kemijskih ukrepov pri pridelavi sadja. Uporaba kemijskih sredstev za varstvo rastlin je pri tem omejena na najnujnejšo količino.

Integriran način pridelave zahteva od sadjarja več znanja. Obenem predstavlja večje tveganje in povečajo se stroški pridelave. Sadjarji, ki se odločijo za integrirano pridelavo sadja, se morajo dodatno izobraževati in biti opremljeni s posebnimi aparaturami za ugotavljanje primernega časa škropljenja. Tudi sredstva za varstvo rastlin, ki so dovoljena v integrirani pridelavi, so dražja od drugih (Štampar in sod., 2009).

## 2.2.3 Konvencionalna pridelava sadja

Temelj konvencionalne pridelave je s čim manj stroški pridelati čim več na enoto površine. Pri konvencionalnem kmetovanju poslabšano kakovost tal delno nadomestijo s povečanim vnosom sintetičnih snovi in energije (Bavec, 2001). Dodana industrijska gnojila porušijo biološko ravnotežje v tleh in posledično se poveča populacija patogenih mikroorganizmov (Krišković, 1989).

Preglednica 2: Prednosti in pomanjkljivosti konvencionalnega kmetijstva (Bavec, 2001: 23)

KONVENCIONALNO KMETIJSTVO	
Prednosti/možnosti/pozitivni učinki	Pomanjkljivosti/nevarnosti/šibke točke
veliki pridelki	sprememba krajine, osiromašenje narave
pridelki prikupnega videza	degeneracija tal, ekološka nestabilnost
velika delovna storilnost	onesnaževanje okolja (pesticidi in nitrati v pitni vodi)
lažje delo	razsipna poraba surovin, odvisnost od drugih
prihranek časa	obtoževanje kmetov zaradi odnosa do okolja
	zniževanje odkupnih cen pridelkov na svetovnem trgu

Posledice konvencionalnega načina pridelave hrane so onesnaževanje voda in podtalnice, slabšanje rodovitnosti tal, slabšanje strukture prsti, zmanjševanje biotske raznolikosti, porast škodljivcev in porušeno ravnotežje (Bavec, 2001; Krišković, 1989).

Osnovne razlike med ekološkim in konvencionalnim načinom kmetovanja so prikazane v preglednici 3.



Preglednica 3: Osnovne razlike med ekološkim in konvencionalnim kmetijstvom (Bavec, 2001: 22)

Razlika	Ekološko	Konvencionalno
izboljšanje rodovitnosti tal	s pravilnimi postopki obdelave, organskim gnojenjem, kolobarjenjem ...	z uporabo mineralnih gnojil
prehrana rastlin	posredna (sproščanje hranil iz tal)	direktna (z uporabo lahkotopnih mineralnih gnojil)
varstvo rastlin	odprava vzrokov, preprečevanje nastanka bolezni in škodljivcev, rasti plevelov	odprava znamenj z uporabo sintetičnih fitofarmaceutskih sredstev
živinoreja	živalim primerna reja (izpusti, prostor, svetloba...)	baterijska reja perutnine, privezana reja brez izpustov...
prehrana živali	optimalna kakovost doma pridelane krme	optimalno dopolnilno krmljenje (beljakovinski in drugi dokupljeni dodatki)
zdravljenje živali	povečevanje odpornosti	zdravljenje bolezenskih znamenj

Rastlina, ki je pridelana z umetnimi gnojili, lahko izgubi naravno obrambno sposobnost, kar se kaže kot zmanjšana odpornost proti boleznim, oslabljena vsebnost mineralov, vitaminov in za človeka zdravju koristnih sekundarnih metabolitov rastline (Vallverdu-Queralt in sod., 2012). Opaziti je mogoče, da postanejo rastline, ki so gnojene z industrijskimi gnojili, manj odporne proti zajedavcem, in kolikor večji so odmerki dušikovih gnojil, toliko dovzetnejše postanejo za napad raznih glivičnih bolezni in škodljivcev (Krišković, 1989).

## 2.2.4 Vpliv načina pridelave na kakovost sadja

Vse bolj je iskano sadje lepega videza, na primer jabolka enake velikosti, čim večja, brez poškodb. Sodobno pridelovanje sadja je doseglo zavidanja vredne uspehe. Toda kar zadeva okus sadja in kakovost, zadeva ni tako jasna (Krišković, 1989).

Poleg zunanje kakovosti (barva, oblika) vse bolj spoznavamo tudi notranjo kakovost sadja (vsebnost mineralov in vitaminov, balastnih snovi). Splošna pridelovalna tehnologija, katere del so tudi ukrepi za varstvo rastlin, precej vpliva na notranjo kakovost sadja (Štampar in sod., 2009).

Znanstveniki kljub številnim raziskavam še niso uspeli dokazati, ali ima sadje, pridelano z uporabo gnojil in kemičnimi sredstvi za varstvo rastlin, slabšo kakovost, fiziološki učinek in učinek na zdravje ljudi kot sadje iz ekološke pridelave ali divji sadeži iz narave. Vsebnost snovi, zaradi katerih je sadje pomemben del prehrane, je zelo spremenljiva lastnost, saj nanjo vplivajo številni dejavniki (Štampar in sod., 2009).

Gnojenje sadnih dreves z industrijskimi gnojili spodbuja rast samih dreves in hkrati povečuje pridelek. Plodovi so večji, vsebujejo več vode, količina suhe snovi pa je primerljiva s suho snovjo v pridelku, gnojenem z organskimi gnojili. Očitne razlike se kažejo pri shranjevanju plodov po obiranju in v kakovosti plodov. Plodovi sadnih dreves, gnojenih z organskimi gnojili, vsebujejo več sladkorja in rudninskih snovi, v skladišču pa jih lahko hranimo dlje časa kakor plodove, gnojene z mineralnimi gnojili, tako v normalnih razmerah kot v hladilnicah. Vrsta gnojila in uporabljena sredstva izrazito ne vplivajo na

velikost plodov, saj lahko v ekološki pridelavi dosegamo primerljive velikosti plodov kot v konvencionalni (Krišković, 1989).

Opravljenih je zelo malo znanstvenih raziskav, ki bi primerjale kakovost pridelkov konvencionalnega kmetijstva s pridelki ekološkega kmetijstva. Raziskave, opravljene v ZDA, kjer so preučevali učinke različnih načinov gnojenja na pridelovanje jabolk, kažejo, da so pridelki iz ekološke pridelave boljši (Krišković, 1989).

Zanimiva so sodobna odkritja, ki kažejo, da imajo sadeži z rastlin, zmerno napadenih z boleznimi in škodljivci, večje vsebnosti nekaterih želenih snovi (npr. fenolov in antioksidantov) kot sadeži na popolnoma zdravih rastlinah (Štampar in sod., 2009).

### 2.3 PREHRANA RASTLIN V EKOLOŠKI IN KONVENCIONALNI PRIDELAVI

Rodovitna tla so osnova za uspešno pridelovanje hrane in krme, zato jim v kmetijstvu namenimo veliko pozornosti (Repič in sod., 2005). Ustrezno prehrano rastlin zagotavlja naravno kroženje hranil v tleh. Rodovitnost tal je tako odvisna od vsebnosti humusa in organskih substanc - shranjevalnikov hranil v tleh ter od biološke aktivnosti tal. Poleg dostopnih hranil v tleh vplivajo na rodovitnost tudi druge talne lastnosti, kot so kislost tal, vsebnost bazičnih kationov, tekstura in struktura tal (Repič in sod., 2005; Mihelič in sod., 2010).

Elementi, ki sodelujejo v prehrani rastlin, se delijo glede na pridelovanje s kemičnimi sredstvi na bio-, makro- in mikroelemente. Pri prehrani rastlin imajo glede na takšno delitev posebno mesto trije elementi: dušik, fosfor in kalij (t.i. NPK gnojila).

V biološkem pridelovanju pa ni posebej izpostavljen niti eden od treh elementov. Poleg tega se elementi ne delijo na makro- in mikroelemente, za pravilno prehrano so namreč vsi enako pomembni. Četudi sodelujejo nekateri elementi pri prehrani rastlin v večjih, drugi pa v manjših količinah, daje biološko kmetovanje poseben pomen mikroelementom (Krišković, 1989). Biološko pridelovanje temelji na medsebojnem antagonizmu živih bitij v tleh, ki razkrajajo različne organske in rudninske snovi. Prehranjevanje rastlin poteka posredno; mikroorganizmi hranijo tla, obenem pa s svojo dejavnostjo tudi biološko pripomorejo k razkrajanju organske snovi. Tako z izmenjavo snovi preko koreninskega sistema hranijo rastline (Krišković, 1989).

Klasično prehranjevanje rastlin temelji na industrijskih gnojilih – v fiziološko aktivni obliki, topni v vodi – potrebe pa se ugotavljajo z analizo tal (Krišković, 1989). V takšni prehrani se vse več uporabljajo tako imenovana NPK gnojila v različnih kombinacijah, kot kompleksna gnojila v različnih razmerjih, na primer NPK 7-14-21, NPK 12-12-12 itn.

V mineralnih gnojilih, to so večinoma različne soli, je rastlinska hrana večinoma že pripravljena. Takšna hranila se v večini najprej močno vežejo na delce zemlje - glino in humus, nato pa hranila prehajajo postopoma v talno raztopino (vodo), od koder jih vsrkavajo rastlinske korenine (Leskošek, 1993).

Zaradi enostranskega načina gnojenja z dodajanjem zlasti NPK gnojil se je spremenila količina hranilnih elementov v sadju, kar je dobro razvidno iz preglednice 4. Tla se obogatijo z nitrati (dušikom), kalijem, vsebnost magnezija pa se zmanjša (Krišković, 1989).

Preglednica 4: Učinek fertilizacije na vsebnost mineralov v jabolkah (Krišković, 1989: 150)

Mineral	Tla, gnojena samo z industrijskimi gnojili (mg)	Tla, gnojena samo z organskimi gnojili (mg)
dušik	1,380	0,211
fosforjeva kislina	0,229	0,179
kalij	1,613	0,998
kalcij	0,172	0,060
magnezij	0,026	0,139

Razlike med tradicionalno prehrano rastlin z mineralnimi gnojili in ekološko prehrano so prikazane v preglednici 5.

Preglednica 5: Primerjalni pregled gnojenja oz. prehrane rastlin (Krišković, 1989: 57)

Klasična prehrana s topnimi NPK gnojili	Prehrana rastlin po biološki metodi
<ul style="list-style-type: none"><li>• Optimalno odmerjanje NPK gnojil ni mogoče.</li><li>• Čezmerno odmerjanje in nepravilna prehrana sta običajna.</li><li>• Velike izgube zaradi izpiranja dušikovih gnojil.</li><li>• Postopno rušenje strukture tal je običajen pojav.</li><li>• Potreba po dodajanju NPK gnojil je vedno večja.</li><li>• Zadrževanje vlage v tleh je odvisno od količine padavin.</li><li>• Polagoma se vse bolj razmnožujejo boleznin in škodljivci.</li><li>• Postopno zmanjševanje biološke kakovosti.</li><li>• Polagoma se izgublja možnost shranjevanja plodov v skladišču.</li><li>• Zmanjševanje rodovitnosti tal je običajen pojav.</li><li>• Zvišujejo se izdatki za varstvo rastlin.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Optimalno odmerjanje hranil opravljajo talni organizmi.</li><li>• Napačno odmerjanje hranil sploh ni mogoče.</li><li>• Izgub zaradi izpiranja dušikovih gnojil ni.</li><li>• Gnojenje z organskimi gnojili strukturo tal nenehno izboljšuje.</li><li>• Potreba po organskih gnojilih se postopoma zmanjšuje.</li><li>• Rastline so optimalno preskrbljene z vlago.</li><li>• Kolikor se v tleh zvečuje količina humusa, toliko se zmanjšuje škoda zaradi boleznin in škodljivcev.</li><li>• Biološka kakovost tal se nenehno zvečuje.</li><li>• Izgube zaradi skladiščenja plodov se gibljejo v dovoljenih mejah.</li><li>• Rodovitnost tal se nenehno zvečuje.</li><li>• Izdatki za varstvo rastlin se nenehno zmanjšujejo.</li></ul>

### 2.3.1 Gnojenje jablan

Vsaka sadna rastlina ima svoje potrebe po posameznih hranilih. Jablana je zelo občutljiva na pomanjkanje fosforja, kalija, kalcija, bora in mangana, občutljiva na pomanjkanje dušika, magnezija, železa, cinka in bakra (Štampar in sod., 2009). Znaki, ki opozarjajo na presežek ali pomanjkanje določenih hranil v rastlini, so prikazani v preglednici 6.

Pred in med sajenjem jablane gnojimo na zalogo, v času oblikovanja krošnje dodajamo tlom le manjše količine fosfornih in kalijevih gnojil. Ob prehodu v rodnost potrebujejo jablane večje količine dušika, fosforja, kalcija in drugih mineralnih snovi. Pri gnojenju moramo paziti na določena sorazmerja med količinami dodanih gnojil, da rastlinam ne porušimo prehranskega fiziološkega razmerja. Gnojenje z organskimi gnojili je nujno v času rodnosti (hlevski, konjski gnoj, kompost, organski koncentracije). Glede na založenost tal s humusom jih dodajamo jeseni skupaj s fosfornimi in kalijevimi gnojili (Sancin, 1988).

V seznamu dovoljenih organskih gnojil in izboljševalcev tal so dovoljena gnojila razvrščena po naslednjih skupinah (Repič in sod., 2005):

- proizvodi in stranski proizvodi rastlinskega izvora za gnojenje (ostanki pri izdelavi slada, soja, različne oljne pogače, ki ostanejo pri stiskanju semen oljnic,...),
- gnojila živalskega izvora (hlevski gnoj, gnojevka, gnojnica, kompostirani živalski iztrebki,...),
- izboljševalci tal in dodatki h kompostu, gnoju, gnojevki,
- organska mineralna gnojila,
- mineralna težko topna gnojila - fosfatna, kalijeva, kalcijeva, magnezijeva gnojila (surovi fosfat, kalijev, magnezijev, kalcijev sulfat, kalijeva sol, apnenčeva moka,...),
- kamninske moke (bentonitna zemlja, kamena moka biotop,...),
- substrati in šote (bela šota, vermikulit,...) ter
- stimulatorji rasti (foliarna gnojila).

Preglednica 6: Znaki pomanjkanja in presežka elementov (hranil) v rastlini (Štampar in sod., 2009: 116)

Element (hranilo)	Stanje v rastlini	Vidni znaki
<b>dušik</b>	pomanjkanje	svetlo zeleni do rumeni listi (še posebno stari), zastajanje rasti, slab razvoj ploda
	presežek	temno zeleni listi, zelo občutljivi za sušo in napad boleznih ter škodljivcev, slaba rodnost, plodovi slabe kakovosti
<b>fosfor</b>	pomanjkanje	listi se obarvajo rdečkasto, zastajanje rasti, zastoj v delitvi celic in v razvoju ploda
	presežek	antagonizem z mikroelementi, posebno še z železom in cinkom
<b>kalij</b>	pomanjkanje	stari listi se obarvajo rumeno na listnem robu, ob hudem pomanjkanju se rob posuši, slaba kakovost plodov, nepravilen razvoj ploda
	presežek	antagonizem z magnezijem in s kalcijem
<b>kalcij</b>	pomanjkanje	zmanjšana rast in propad rastnih vršičkov, fiziološke motnje v razvoju ploda, slabša skladiščna sposobnost
	presežek	antagonizem z magnezijem in s kalijem
<b>magnezij</b>	pomanjkanje	rumenenje tkiva med listnimi žilami starejših listov, ki se širi na mlajše liste, moten razvoj plodov in majhni pridelki
	presežek	antagonizem s kalcijem in kalijem, ki zmanjšuje rast
<b>žveplo</b>	pomanjkanje	podobni znaki kot pri pomanjkanju dušika, le da najprej na mladih listih
	presežek	možno predčasno odpadanje listov
<b>železo</b>	pomanjkanje	začetno rumenenje ali bele lise med žilami mladih listov, ki pozneje odmrejo
	presežek	bronast sijaj listov z drobnimi rjavimi pikami
<b>mangan</b>	pomanjkanje	rumenenje med žilami mladih listov
	presežek	starejši listi imajo rjave pege, obkrožene s klorotičnim tkivom
<b>cink</b>	pomanjkanje	manjši listi in medžilno rumenenje mladih listov
	presežek	možno pomanjkanje železa pri nekaterih sadnih vrstah
<b>bor</b>	pomanjkanje	odmiranje rastnih vršičkov, iznakaženja listov s klorotičnimi območji
	presežek	rastni vršički rumenijo, pozneje lahko odmrejo, listi izredno majhni in rozetno razporejeni, pozneje odpadejo

Presežek dušika v tleh oziroma v rastlini podaljšuje obdobje rasti, zavira razvoj in diferenciacijo cvetnega brsta, jablana pa postane bolj občutljiva na bolezni in nizke temperature (Sancin, 1988). Posledica večletnega pretiranega gnojenja so lahko motnje v prehrani rastlin ali t.i. fiziološke ali abiotične bolezni. V večini primerov je N odločilen tako za količino pridelkov kot za njihovo kakovost (Leskošek, 1993).

### 2.3.2 Najpogostejša organska gnojila

V nasadih lahko uporabljamo večje količine organskih hranil, vendar moramo v celoti hranil, ki smo jih dodali tlem, upoštevati vsebnost hranil v različnih organskih gnojilih (Štampar in sod., 2009). Za ohranitev dobre rodovitnosti zemlje je potrebno dodati tlem najmanj toliko organske snovi, kot se je na leto porabi (razpade v tleh) (Leskošek, 1993). Gnojilna vrednost se razlikuje med posameznimi organskimi gnojili, kar je prikazano v preglednici 7.

Preglednica 7: Gnojilna vrednost za 10 ton oz. 10 m<sup>3</sup> organskih gnojil v kilogramih (kg) (Štampar in sod., 2009: 117)

vrsta organskega gnojila	N			P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	K <sub>2</sub> O
	skupaj (kg)	večletni izkoristek	v letu porabe		
goveji hlevski gnoj – dober	50	30-40	20	25	60
prašičji hlevski gnoj – kmečki	55	30-45	25	30	50
konjski hlevski gnoj	65	35-50	30	30	60
kurjeki (posušeni)	220	120-160	100	250	150
kompostni kurjeki	200	150-170	100	500	230

V svežem hlevskem gnoju potekajo med zorenjem hkrati procesi razkroja, presnove organske snovi in nastajanja novih organskih spojin. Hlevski gnoj izboljšuje zračnost težkih in mrzlih tal (Leskošek, 1993).

Gnojnica je seč živali, pogosto pomešana z vodo, ki odteka iz hleva. Gnojnica je predvsem kalijevo in dušično gnojilo, fosforja ne vsebuje skoraj nič. Dušik je v seču v kemični spojini, ki ji pravimo sečnina ali urea. Vsa hranila iz gnojnice hitro delujejo (tako kot iz mineralnih gnojil) (Leskošek, 1993).

Gnojevka je mešanica živalskih izločkov - blata in seča. Natančno doziranje hranil z gnojevko je mnogo težje kot z mineralnimi gnojili ali hlevskim gnojem. Zlasti ker ne vemo, koliko vode je iz raznih virov dodatno prišlo v gnojevko, ne moremo vedeti, koliko je razredčena in s tem koliko vsebuje hranil.

Organski deli rastlin, ki so v tleh (korenine, ostanki žetve idr.), ali tisti, ki se vnašajo v tla (hlevski gnoj, slama, zeleno gnojenje), se razkrajajo pod vplivom talnih organizmov in spreminjajo v različne organske snovi, ki jih imenujemo humus. Z mineralizacijo humusa se postopoma sproščajo hranilni elementi, potrebni za prehrano rastlin (Leskošek, 1993).

Koliko hranil vsebuje kompost, je težko reči. Na kompostni kup sodi vse, kar je rastlinskega in živalskega izvora, vse, kar se bo lahko razkrojilo. Dober kompost ima veliko humusa, zadosti hranil in obilo koristnih drobnoživk (Leskošek, 1993).

Raziskave so pokazale, da je na podlagi izotopske sestave N možno ugotoviti uporabo organskih oziroma anorganskih gnojil.

## 2.4 IZOTOPI

Izotopi so atomi istega kemijskega elementa, ki se razlikujejo po masi in imajo torej v jedru enako število protonov in različno število nevtronov. Ime "izotop" izhaja iz grščine (isto mesto) in pomeni, da izotopi določenega elementa zasedajo isto mesto v periodnem sistemu (Pezdič, 1999).

Poznamo naravne ali umetno pripravljene izotope ter nestabilne (radioaktivne) ali stabilne. Nestabilni izotopi razpadejo z enim od jedrskih razpadov, stabilni izotopi pa tekom procesov ne razpadejo (Ghidini in sod., 2006). Večina elementov ima več kot samo en stabilen izotop. Atomske mase, ki so navedene v periodnem sistemu, so povprečne vrednosti mas izotopov v naravi.

### 2.4.1 Stabilni izotopi

Najbolj pogosto je v literaturi omenjeno določanje razmerja vsebnosti ogljikovih stabilnih izotopov  $^{13}\text{C}$  in  $^{12}\text{C}$  ( $\delta^{13}\text{C}$ ) ter razmerje dušikovih izotopov  $^{15}\text{N}$  in  $^{14}\text{N}$  ( $\delta^{15}\text{N}$ ), sledi razmerje med devterijem in vodikom ( $^2\text{H}/^1\text{H} - \delta\text{D}$ ), razmerje med kisikovima izotopoma  $^{18}\text{O}$  in  $^{16}\text{O}$  ( $\delta^{18}\text{O}$ ) in razmerje med izotopi žvepla  $^{34}\text{S}$  in  $^{32}\text{S}$  ( $\delta^{34}\text{S}$ ) (Rapisarda in sod., 2010).

Izotopsko sestavo oziroma razmerje med težjim in lažjim izotopom v spojini izražamo z vrednostjo, ki predstavlja relativno razliko izotopske sestave raziskovanega vzorca (vz) glede na izbrani standard (st), in jo izražamo v promilih (‰):

$$\delta A = \frac{R_{vz} - R_{st}}{R_{st}} \cdot 1000 \quad \dots(1)$$

V enačbi 1 A pomeni težji izotop določenega elementa ( $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ ), vrednost R pa je razmerje med izotopi ( $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) in jo vedno podajamo kot razmerje redkejšega, težjega izotopa proti bolj pogostemu, lažjemu izotopu. Mednarodne standarde sta določila Mednarodna agencija za atomsko energijo na Dunaju (IAEA) in Nacionalni inštitut za standarde in tehnologijo iz ZDA (NIST) (Pezdič, 1999). Ti standardi so točno določene homogenizirane naravne spojine (Craig, 1957). Njihova izotopska razmerja so čim bolj podobna povprečni razširjenosti določenega izotopa v naravi (Engel in Macko, 1993). Delta ( $\delta$ ) vrednost vsakega standarda je definirana z vrednostjo 0 ‰. Pozitivne vrednosti pomenijo, da vsebuje vzorec več težkega izotopa kot standard, negativne pa, da ga je manj. Za prikazovanje ogljika je privzet standard V-PDB (Vienna Pee Dee Belemnite – kalcijev karbonat iz fosiliziranih lupin organizma *Belemnitella Americana*) z vrednostjo

$R_{st} = 0,0112372$  (Rapisarda in sod., 2010; Pezdič, 1999; Craig, 1957). Za dušik pa je privzet standard atmosferski zrak (AIR) in ima vrednost  $R_{st} = 0,0036765$  (Rapisarda in sod., 2010; Ghidini in sod., 2006).

Pogosto pri izotopskih vrednostih spojin zasledimo izraz »osiromašen« s  $^{13}\text{C}$  ali  $^{15}\text{N}$ . To pomeni, da določena (osiromašena) spojina vsebuje relativno manj težjega izotopa  $^{13}\text{C}$  ali  $^{15}\text{N}$ . Nasprotno pa za spojino, ki vsebuje relativno več težjega izotopa, rečemo, da je obogatena s težjim izotopom in ima višjo izotopsko sestavo. Vendar nobeden od izrazov (obogaten, osiromašen, lahek) ne daje podatkov o absolutni količini  $^{13}\text{C}$  ali  $^{15}\text{N}$  (Farquhar in sod., 1989; Pezdič, 1999).

Vsebnost naravnih stabilnih izotopov je določena z nastankom elementov oziroma s sestavo Zemlje ob njenem nastanku in je konstantna (zato tudi njihova razmerja). Vendar pa so v naravi opazna določena nihanja v vrednostih razmerij zaradi izotopske frakcionacije. Pojem frakcionacija izraža različno porazdelitev izotopov med reaktante in produkte, ki med reakcijo nastanejo. Do frakcionacije vodi izotopski efekt, ki je povezan z večino vseh bioloških, fizikalnih in kemijskih procesov, ki vključujejo stabilne izotope (Farquhar in sod., 1989).

Obstajata dve vrsti izotopskega efekta, ki vodita k frakcionaciji: fizikalen in kemijski izotopski efekt. Slednjega lahko naprej delimo na efekt, ki se zgodi med ravnotežjem (termodinamski efekt) ali pa med ireverzibilno kemijsko reakcijo (kinetični efekt). Fizikalna frakcionacija, ki se dogaja npr. med difuzijo, je posledica hitrejšega premika lažjega izotopa od težjega. Difuzija povzroča precej manjšo frakcionacijo izotopov kot kinetični in termodinamski efekti (Pezdič, 1999). Kemijska frakcionacija pa se zgodi zato, ker ima kemijska vez, ki vključuje težji izotop, nižjo vibracijsko frekvenco, oziroma je vez močnejša od ekvivalentne pri lažjem izotopu. Tako termodinamski efekt kot tudi nekateri kinetični so odvisni od temperature (Farquhar in sod., 1989; Košir, 2001).

Do frakcionacije izotopov prihaja v atmosferi in v tleh, najpomembnejše razlike pa nastanejo zaradi frakcionacije v samih organih rastline (Farquhar in sod., 1989). Z izotopskim efektom je povezanih veliko encimskih reakcij v fotosintezi in drugih biosintetskih poteh. Večina biokemijskih reakcij favorizira lažji izotop. Negativna izotopska frakcionacija se kaže kot osiromašenje s težjim izotopom v produktu v primerjavi s substratom (Farquhar in sod. 1989; Košir, 2001).

Martin (1990) navaja, da prihaja v vsaki kemijski, fizikalni, fiziološki in biokemijski transformaciji do izotopske frakcionacije. Na difuzijo izotopov, ki imajo različno težo, in difuzijo svetlobe v rastlino vpliva vrsta rastline in geoklimatske razmere. Rastlina proizvaja sok z izotopsko sestavo, ki je odvisna od okolja in leta nastanka (klimatološka frakcionacija), raznolikosti med posameznimi vrstami (fiziološka frakcionacija) in od vrste fotosinteze, ki jo rastlina uporablja za sintezo ogljikovih hidratov (biokemijska frakcionacija).

V primeru ravnotežnih reakcij med posameznimi fazami izražamo izotopske efekte s faktorjem izotopske frakcionacije,  $\alpha$ . Faktor izotopske frakcionacije  $\alpha$  za fazi R (reaktanti)  $\leftrightarrow$  P (produkti), ki je posledica ravnotežnih in/ali kinetičnih izotopskih procesov, je podan z enačbo:

$$\alpha = \frac{R_R}{R_P} \quad \dots(2)$$

pri čemer je  $R_R$  razmerje vsebnosti težjega izotopa in vsebnosti lažjega izotopa istega elementa v molekuli ali fazi R (reaktantov),  $R_P$  pa razmerje istih izotopov v molekuli ali fazi P (produktov).

Ob upoštevanju enačbe 1 lahko izrazimo frakcionacijski faktor  $\alpha$  z vrednostjo  $\delta$  in dobimo:

$$\alpha_{R-P} = \frac{1000 + \delta R}{1000 + \delta P} \quad \dots(3)$$

kjer sta vrednosti  $\delta R$  in  $\delta P$  izotopski sestavi R (reaktanta) in P (produkta) (Martin, 1990; Pezdič, 1999).

#### 2.4.2 Stabilni izotopi dušika in vplivi na njihovo porazdelitev

Največ dušika je v atmosferi. Vsebuje en težji stabilni izotop ( $^{15}\text{N}$ ) na 273 lažjih ( $^{14}\text{N}$ ). Tako v naravi nastopata oba izotopa v naslednjih povprečnih procentnih deležih:  $^{14}\text{N} = 99,64\%$ ,  $^{15}\text{N} = 0,36\%$ ;  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N} = 0,00367$  (Pezdič; 1999). Ker je količina  $^{15}\text{N}$  v zraku konstantna ( $^{15}\text{N}/^{14}\text{N} = 1/273$ ), se zrak uporablja kot standard za podajanje vrednosti  $\delta^{15}\text{N}$  (Kendall, 1998).

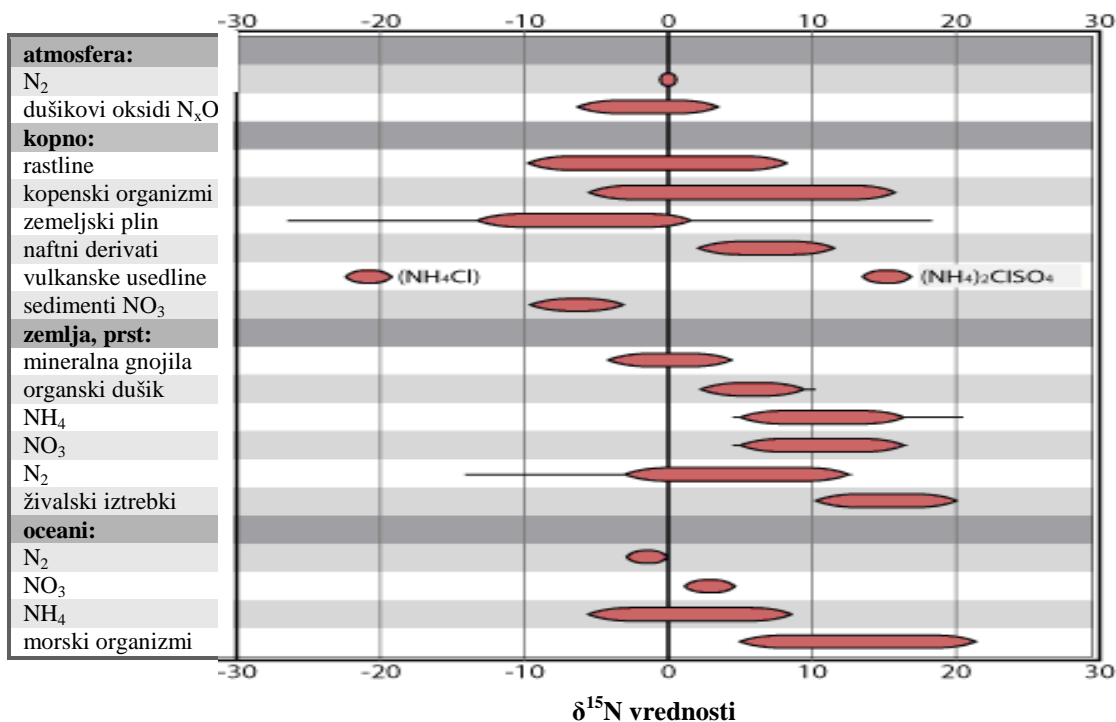
Vse dušikove spojine vsebujejo oba izotopa, vendar sta zaradi izotopske frakcionacije vključena v spojinah v različnih razmerjih glede na naravo reakcije nastajanja teh spojin. Na primer živali se prehranjujejo z rastlinami, katerih  $\delta^{15}\text{N}$  odraža  $\delta^{15}\text{N}$  v tleh, na katerih so uspevala (izjema so N-fiksatorske rastline (npr. stročnice), ki imajo zaradi vezave zračnega dušika  $\delta^{15}\text{N}$  vrednosti podobne zračnemu dušiku in znaša 0 ‰). Živali pri izločanju z urinom prednostno izločijo lažji izotop dušika ( $^{14}\text{N}$ ), trdni živalski izločki zato vsebujejo več težjega izotopa ( $^{15}\text{N}$ ). Poleg tega so zaradi delovanja amonija, denitrifikacije in bakterijskega delovanja podvrženi še dodatni obogatitvi s težjim dušikovim izotopom. To pa zato, ker se pri vseh procesih lažji izotop prednostno porablja, preostali trdni izločki pa posledično postanejo obogateni s težjim izotopom (Šturm in Lojen, 2010).

Živalski izločki z običajno vrednostjo  $\delta^{15}\text{N}$  okoli +5 ‰ imajo po oksidaciji vrednosti  $\delta^{15}\text{N}$  običajno v območju od +10 do +20 ‰ (Kendall, 1998; Rogers, 2008).

Na izotopsko sestavo dušika v zemlji in vodi imajo močan vpliv biološke reakcije, kot so asimilacija, nitrifikacija in denitrifikacija. Nitrifikacija je kemijski proces, kjer se proizvaja nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) z oksidacijo amoniaka ( $\text{NH}_4^+$ ). Nitrifikacija se pojavi v aerobnih razmerah, medtem ko poteka denitrifikacije v anaerobnih razmerah (SAHRA, 2005).

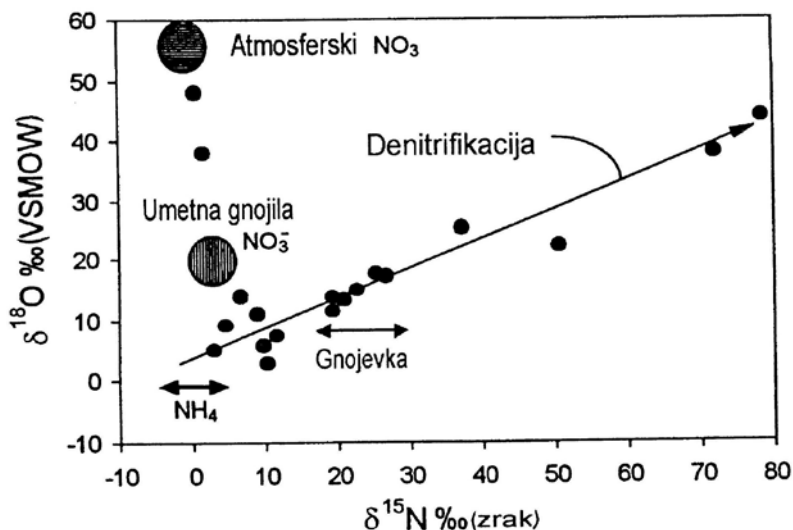


Na sliki 2 lahko vidimo široko območje vrednosti  $\delta^{15}\text{N}$ , ki jih najdemo v naravi.



Slika 2: Območje  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) v naravnih spojinah (SAHRA, 2005)

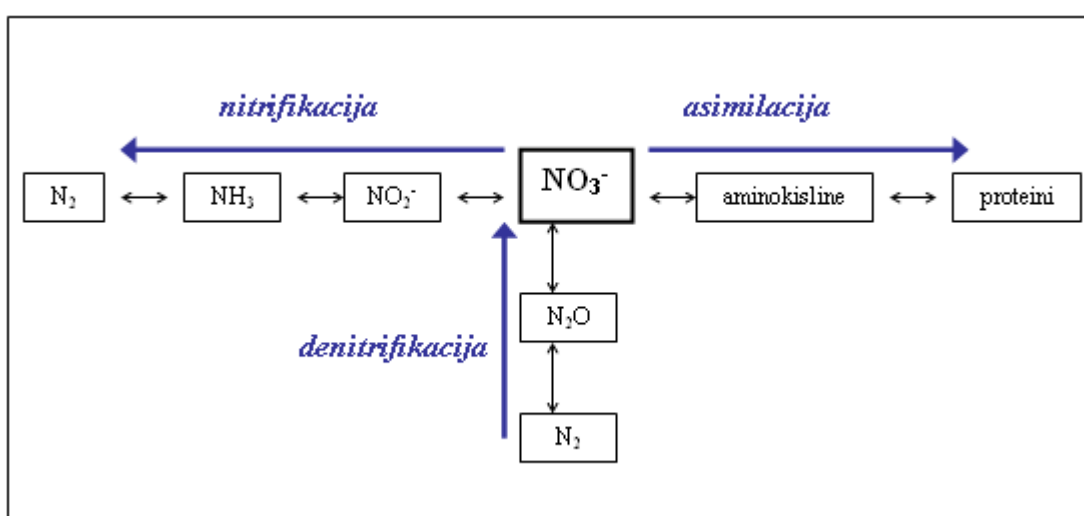
Slika 3 prikazuje  $\delta^{15}\text{N}$  vrednosti za različne vire dušika in vpliv bioloških procesov na izotopsko sestavo dušika. Največjo frakcionacijo povzroča denitrifikacija.



Slika 3: Značilne vrednosti izotopske sestave dušika in kisika v različnih okoljih (Pezdič, 1999: 109)

#### 2.4.2.1 Kroženje dušika in spreminjanje izotopske sestave dušika

Primaren rezervoar dušika v naravi je v atmosferi, kjer ima stalno izotopsko sestavo. Nekaj dušika je vezanega tudi v zemlji in tam so vrednosti  $\delta^{15}\text{N}$  večinoma pozitivne, kar pomeni, da je v zemlji več težjega dušika kot ga je v zraku. Večina dogajanj izotopske frakcionacije predstavljata nitrifikacija in denitrifikacija, ki ju lahko označimo za naravni razpad dušikovih spojin. Mineralizacija dušika v tleh zmanjšuje vsebnost težkih dušikovih izotopov, pri denitrifikaciji se preostali nitrat obogati s težjimi izotopi. Tudi izhajanje amonijevega in plinskega dušika ( $\text{N}_2$ ) iz sistema obogati ostanek nitrata s težjim izotopom.  $^{14}\text{N}$  se hitreje mineralizira kot  $^{15}\text{N}$ , zato ga rastline hitreje sprejemajo in v tleh se relativno poveča vsebnost  $^{15}\text{N}$  (Pezdič, 1999; Kaplan in Margaritz, 1986; Sutherland in sod., 1993).



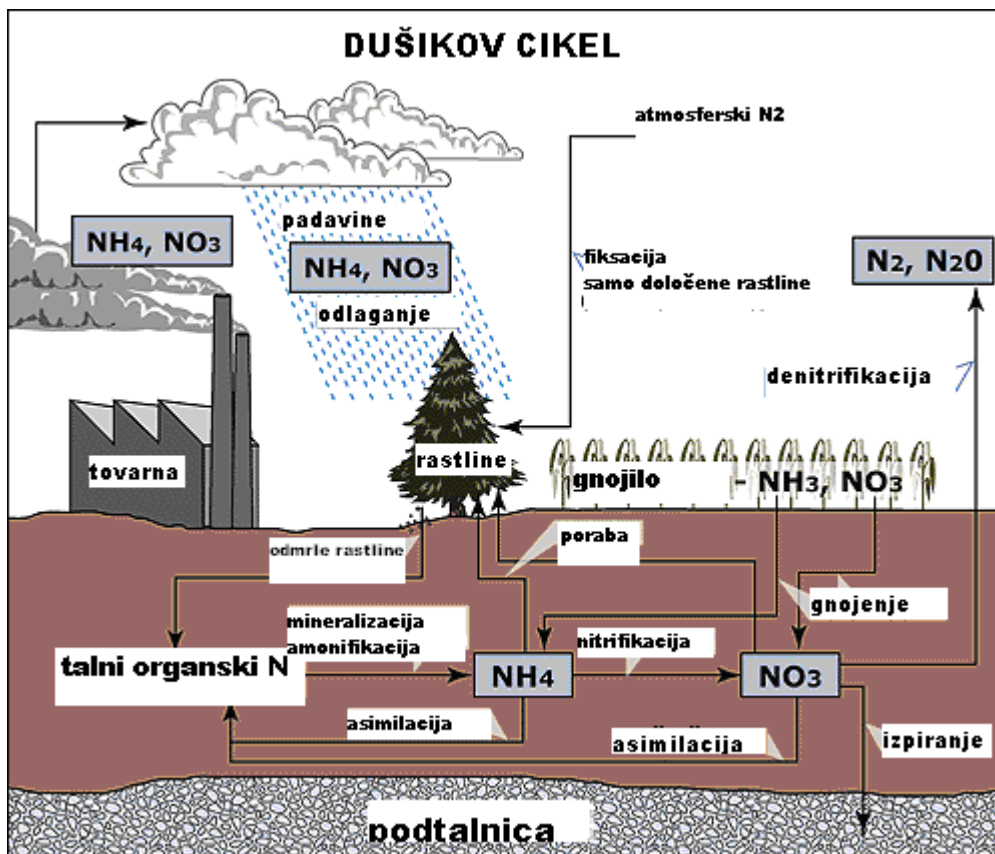
Slika 4: Dušikov cikel v naravi (Pezdič, 1999: 37)

Izotopsko razmerje dušika v rastlinah je povezano s tem, če rastline vežejo dušik iz zraka ali ga le črpajo iz zemlje. Rastline, ki nimajo sposobnosti vezave atmosferskega dušika, imajo večinoma pozitivne vrednosti  $\delta^{15}\text{N}$ , saj je v zemlji več izotopa  $^{15}\text{N}$  kot v zraku (Virginia in Delwiche, 1982).

Na splošno ima večina rastlin vrednosti  $\delta^{15}\text{N}$  v območju od -5 do +2 ‰.  $\delta^{15}\text{N}$  celotnega talnega dušika se giblje od -10 do +15 ‰, pri čemer ima večina tal vrednosti med +2 in +5 ‰ (Kendall, 1998). Relativna obogatitev nitratnega iona z lažjim izotopom (nižja vrednost  $\delta^{15}\text{N}$ ) pomeni mineralni oziroma anorganski vir dušika, več težjega vsebujejo organske spojine (bolj pozitivna vrednost  $\delta^{15}\text{N}$ ). Pri mineralnih gnojilih so vrednosti  $\delta^{15}\text{N}$  v povprečju -1 ‰, npr. pri organski gnojevki pa +28 ‰ (Pezdič, 1999).

V zadnjih tridesetih letih se je povečala uporaba stabilnih izotopov dušika v okoljskih in ekoloških študijah, v preučevanju rodovitnosti tal in prehrani rastlin. Preko izotopov dušika lahko spremljamo kroženje dušika v ekosistemu in ugotavljamo onesnaženost podtalnice in površinskih vod z organskimi in anorganskimi spojinami (Pezdič, 1999; SAHRA, 2005). Uporabljamo jih tudi za razlikovanje med ekološko in konvencionalno pridelavo, izjema so

N-fiksirajoče rastline (imajo vrednost  $\delta^{15}\text{N}$  blizu 0‰), pri katerih razlikovanje v načinu pridelave ni mogoče (Bateman in sod., 2007; Flores in sod., 2007; Rogers, 2008).



Slika 5: Kroženje dušika v naravi (SAHRA, 2005)

#### 2.4.2.2 Uporaba $\delta^{15}\text{N}$ za razlikovanje med ekološko in konvencionalno pridelavo

Metoda določanja vsebnosti izotopa dušika ( $\delta^{15}\text{N}$ ) se je izkazala za zelo učinkovito metodo za razlikovanje med ekološko in konvencionalno pridelavo. Zaradi različnih procesov izdelave gnojil imajo sintetična gnojila nižje  $\delta^{15}\text{N}$  vrednosti od organskih. Zato imajo rastline, gnojene z organskimi gnojili, višje  $\delta^{15}\text{N}$  vrednosti v primerjavi s konvencionalno pridelanimi rastlinami (Bateman in sod., 2007; Flores in sod., 2007; Rogers, 2008).

Uporaba dušik vsebujočih gnojil ima velik vpliv na pridelek, na vrednost  $\delta^{15}\text{N}$  rastlin ter na vsebnost dušika in vrednost  $\delta^{15}\text{N}$  v tleh. Prekomerna uporaba gnojil se odraža v visokih koncentracijah nitrata in velikih spremembah  $\delta^{15}\text{N}$  v tleh.

Sintetična (anorganska) gnojila se izdelujejo iz zračnega dušika ( $\delta^{15}\text{N}_{\text{atm}} = 0 \text{ ‰}$ ) z različnimi industrijskimi procesi (npr. z ekstrakcijo dušika iz zraka). Ker med procesom izdelave ne prihaja do večje frakcionacije, je njihova  $\delta^{15}\text{N}$  vrednost blizu 0 ‰, po navadi

med -2 in +2 ‰. Med sintetična gnojila spadajo urea, amonijev nitrat in kalijev nitrat itd. (Šturm in Lojen, 2010; Bateman in sod., 2007; Flores in sod., 2007; Rogers, 2008).

V procesu nastajanja komposta amoniak hitreje izhlapeva pri lažjem izotopu  $^{14}\text{N}$ , zato so  $\delta^{15}\text{N}$  vrednosti komposta in ostalih naravnih gnojil bistveno višje kot vrednosti  $\delta^{15}\text{N}$  v sintetičnih gnojilih (Flores in sod., 2007). V skladu s to hipotezo so Choi in sodelavci (2003) ugotovili značilno obogatitev zemlje in rastlin z  $^{15}\text{N}$  po dolgoročni uporabi komposta kot gnojila. Tudi Nakano in sodelavci (2003) so našli dobro korelacijo med vrednostjo  $\delta^{15}\text{N}$  in načinom gnojenja, ko so gojili paradižnik. Podobne raziskave so bile opravljene tudi na pomarančah in na špinaci in tudi tu so dobili podobne rezultate (Flores in sod., 2007). Organska gnojila imajo vrednosti  $\delta^{15}\text{N}$  po navadi od +2 do +10 ‰ (Rogers, 2008).

Večina teh raziskav se je osredotočila na popolnoma organska oziroma popolnoma sintetična gnojila. Vendar pa se v procesu nastajanja humusa (naravnega gnojila) v gnojilu lahko pojavijo patogeni mikroorganizmi, ki se jih ne da odstraniti drugače, kot z dodatkom anorganskih dopolnil, ki pa ostanejo v pridelku in v takih primerih dobimo pri merjenju izotopa dušika napačne rezultate (Flores in sod., 2007).

Preglednica 8: Izmerjene vrednosti  $\delta^{15}\text{N}$  v gnojilih, ki smo jih uporabili v poskusu

Gnojilo	$\delta^{15}\text{N}$ [‰]
KAN	-1,1
Urea (UR)	-0,8
Apneni dušik (AD)	0,6
Biosol (BS)	2,5
Plantella organic (GŽI)	6,9

Izotopska sestava dušika uporabljenega gnojila vpliva na izotopsko sestavo dušika v pridelku. V preglednici 8 so podane izmerjene vrednosti  $\delta^{15}\text{N}$  gnojil, ki smo jih uporabili v našem poskusu. Zato lahko to razliko v vrednostih  $\delta^{15}\text{N}$  uporabimo za razlikovanje med ekološko in konvencionalno pridelavo. Največ raziskav je bilo narejenih na zelenjavi, in sicer na paradižniku, solati in korenju (Bateman in sod., 2005; Bateman in sod., 2007), papriki (Flores in sod., 2007), čebuli in zelju (Georgi in sod., 2005) ter na citrusih (Rapisarda in sod., 2005; Rapisarda in sod., 2010), kjer so ugotovili povišane vrednosti  $\delta^{15}\text{N}$  v organsko pridelanih živilih v primerjavi s konvencionalno pridelavo. Dokazano je, da čas uporabe gnojila in kemijska sestava sintetičnega gnojila pomembno vplivata na  $\delta^{15}\text{N}$  v pridelku. Tudi vrsta prsti, predhodna uporaba zemlje, variabilnost v akumulaciji atmosferskega dušika in variacije v posameznih agrikulturnih postopkih vplivajo na  $\delta^{15}\text{N}$  v pridelku. Choi in sodelavci (2003) so ugotovili, da vlažnost zemlje pomembno vpliva na  $\delta^{15}\text{N}$  v zemeljskih nitratih, ki izvirajo iz različnih gnojil. Ugotovili so tudi, da stopnja zrelosti ne vpliva na izotopsko sestavo dušika in ogljika. Na izotopsko sestavo dušika v rastlini vplivajo tudi okoljski dejavniki (svetloba, temperatura in vlažnost). Zato so potrebne še nadaljnje raziskave, ki bodo upoštevale te dejavnike in tudi druge vplive na izotopsko sestavo dušika (Flores in sod., 2007).

### 2.4.3 Vplivi na porazdelitev stabilnih izotopov $^{12}\text{C}$ in $^{13}\text{C}$

Ogljik je v vesolju med najbolj razširjenimi elementi, zemeljsko maso pa zastopa le z nekaj stotinkami odstotkov. Kljub temu je osnova življenja na Zemlji.

Ogljik ima dva stabilna izotopa, ki sta v naravi v naslednjem relativnem razmerju (Pezdič, 1999):

$$^{12}\text{C} = 98,89 \%$$

$$^{13}\text{C} = 1,11 \%$$

$$^{13}\text{C}/^{12}\text{C} = 0,01123.$$

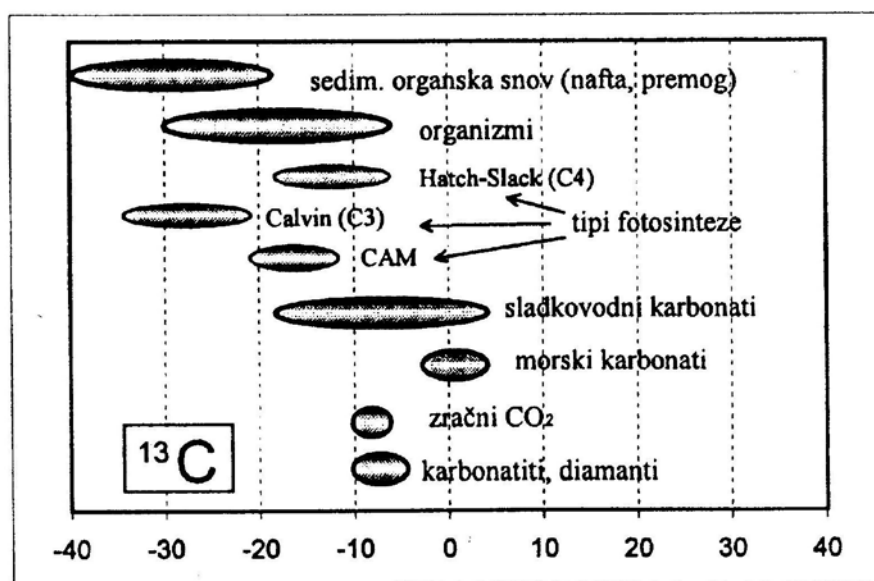
V naravi najdemo še radioaktivni ogljik ( $^{14}\text{C}$ ) (Pezdič, 1999).

Primarna rezervoarja ogljika v naravi sta  $\text{HCO}_3^-$  v hidrosferi in  $\text{CO}_2$  v atmosferi (Breas in sod., 1994). Razmerje  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  pri ogljikovem dioksidu, ki nastane iz organskih materialov, pa je lahko precej drugačno od razmerja pri mineralnih karbonatih in atmosferskem  $\text{CO}_2$ . Vzrok je izotopska frakcionacija med fotosintezo pri višjih rastlinah, kjer določeni encimi raje vežejo  $^{13}\text{C}$ . Produkti iz rastlin s  $\text{C}_4$  ciklom so praviloma znatno bogatejši s težjimi izotopi glede na produkte rastlin s  $\text{C}_3$  ciklom (O'Leary, 1988). Zaradi tega lahko določimo botanično poreklo omenjenih spojin, kar omogoča potrjevanje avtentičnosti končnih izdelkov. Stopnja frakcionacije je odvisna od dostopnosti ogljika, transporta anorganskega ogljika v celico ter specifične karboksilatne poti (Falkowski, 2003).

#### 2.4.3.1 Kroženje ogljika

Ogljik je v glavnem v kamninah, prevladujejo karbonati. Naslednje pomembne snovi so organske spojine. Karbonati, ki so glavna komponenta anorganskega rezervoarja ogljika, predstavljajo  $\frac{3}{4}$  vsega ogljika v zunanem, vrhnjem delu zemeljske skorje. Vse ostale oblike nahajanja ogljika v drugih rezervoarjih (atmosfera, kopenske rastline, humus, fosilna goriva, morska biomasa) ne predstavljajo skupaj 1 % celotne ogljikove mase. Kopenski rezervoar ustvarja izrazito frakcionacijo ob preperevanju, vendar reakcije niso kvantitativne. Pomembnejši je le biogeni ogljik, ki ga sintetizirajo živa bitja in ima povprečno vrednost  $\delta^{13}\text{C}$  okrog -25 ‰. Glavni anorganski rezervoar so karbonati (apnenec, dolomit), ki imajo povprečen  $\delta^{13}\text{C}$  okrog +2 ‰, medtem ko ima rezervoar organske snovi povprečje -26 ‰ (Pezdič, 1999).

Organski ogljik nastaja pri zapletenem procesu fotosinteze zelenih rastlin, ki v klorofilnih zrcnih iz vode, zračnega  $\text{CO}_2$  in z absorbirano sončno energijo gradijo organske snovi. Izotopska frakcionacija, ki se dogaja med transformacijo anorganske v organsko snov, je odvisna od encimskih ogljikovih sprejemnikov ribuloze-1,5-bisfosfata (RuBP) ali fosfoenolpiruvata (PEP). Vhodne snovi so predvsem  $\text{CO}_2$  in  $\text{HCO}_3^-$ . Glede na stopnjo frakcionacije, ki jo povzročajo različni encimski procesi v metabolizmu rastlin, kopenske rastline uvrščamo v tri glavne skupine glede na tri različne poti fotosinteze. Vse rastline vežejo  $\text{CO}_2$  in  $\text{H}_2\text{O}$  v organsko snov na enak način, razlikujejo se le po načinu prevzema  $\text{CO}_2$  iz zraka (Pezdič, 1999).



Slika 6: Pomembnejši rezervoarji ogljika ( $\delta^{13}\text{C}$ ) (Pezdič, 1999: 34)

### RASTLINE $\text{C}_3$

V Calvinovem ali  $\text{C}_3$  ciklu se atmosferski  $\text{CO}_2$  takoj po vstopu v kloroplast veže na akceptor (ribuloza-1,5-difosfat). Reakcijo katalizira encim ribuloza-1,5-difosfat karboksilaza / oksigenaza, bolj poznan kot rubisco. V omenjeni reakciji nastane vmesni produkt s šestimi C- atomi, ki hitro razpade v dve molekuli 3-fosfoglicerata. Ta spojina ima tri C-atome, zato se ta pot imenuje  $\text{C}_3$  cikel. Sem spada večina kmetijskih rastlin, tudi jablana (Boyer, 2005). Ker se ogljik fiksira v  $\text{C}_3$  rastline izključno preko fotosinteze, je večji del frakcionacije v tej skupini pripisan velikemu osiromašenju s težkim izotopom ( $^{13}\text{C}$ ), ki je značilen za RuBP karboksilacijo. Te rastline počasneje absorbirajo  $^{13}\text{C}$  kot  $^{12}\text{C}$ , njihove vrednosti  $\delta^{13}\text{C}$  so od -23 do -34 ‰, v povprečju okoli -27 ‰ (Pezdič, 1999).

### RASTLINE $\text{C}_4$

Hatch-Slackov cikel ali  $\text{C}_4$  cikel je posebna oblika fotosinteze, ki poteka v listih nekaterih tropskih rastlin, kot so sladkorni trs, koruza in sirek. Gre izključno za rastline, ki spadajo v družino kritosemenk (Dermastia, 2007).

Atmosferski  $\text{CO}_2$  prehaja v list skozi reže in se veže v mezofilnih celicah, v katerih ni rubisca.  $\text{CO}_2$  se veže na fosfoenolpiruvat (in ne na ribulozo-1,5-difosfat), nastane oksalocetna kislina, ki ima štiri C-atome. Zaradi tega se rastline, ki uporabljajo to pot, imenujejo  $\text{C}_4$  rastline. Encim, ki katalizira začetno vezavo atmosferskega  $\text{CO}_2$ , je fosfoenolpiruvat karboksilaza (PEP karboksilaza) in kaže preferenco k vezavi  $^{13}\text{CO}_2$  (Boyer, 2005). Te rastline imajo veliko selekcijsko prednost zaradi prilagoditve listov, saj fotosinteza v sušnih obdobjih poteka kljub temu, da so listne reže zaprte in ni fotorespiracije. V močni sončni pripeki lahko  $\text{C}_4$  rastline vežejo dvakrat več  $\text{CO}_2$  kot  $\text{C}_3$  rastline, ki v pripeki zaradi zmanjšanja fotorespiracije zaprejo listne reže in s tem ustavijo fotosintezo (Uno in sod., 2001).  $\text{C}_4$  rastline med fotosintezo absorbirajo  $^{13}\text{C}$  hitreje kot  $^{12}\text{C}$ , tako da je njihova izotopska sestava med -16 ‰ in -9 ‰ (Ehleringer in Epstein, 2001).

## RASTLINE CAM

CAM rastline so dobile ime po tako imenovani CAM poti (angl. Crassulacean Acid Metabolism). To redko obliko fotosinteze zasledimo pri kaktusih, ananasu, orhidejah itd. (Uno in sod., 2001). Ponavadi so te rastline mesnate, sočne in polne soka (Rogers, 2008).

CAM rastline imajo listne reže odprte le ponoči, ko so temperature nižje, zračna vlažnost pa večja. Tako znižajo izhlapevanje vode, razmerje med vnosom CO<sub>2</sub> in izgubo vode pa je bistveno nižje kot v C<sub>3</sub> in C<sub>4</sub> rastlinah. Za te rastline je značilno, da uporabljajo C<sub>3</sub> cikel in različico C<sub>4</sub> cikla, zato imajo vrednosti  $\delta^{13}\text{C}$ , ki so značilne za C<sub>3</sub> oziroma C<sub>4</sub> rastline (Uno in sod., 2001; Van der Merwe, 1982). Pri teh rastlinah karboksilacija ni ločena na dva dela kot pri C<sub>4</sub> rastlinah. Zaradi tega so našli širok spekter  $\delta^{13}\text{C}$  v razponu od -11 do -33 ‰, kar kaže na aktivnost obeh karboksilacijskih procesov (Pezdič, 1999).

$\delta^{13}\text{C}$  vrednosti nam služijo kot pokazatelji, kako je bila določena kultura pridelana. To ni v povezavi s tipi uporabljenih gnojil, saj imajo mineralna in organska gnojila enake  $\delta^{13}\text{C}$  vrednosti. Zaradi delovanja encima rubisco pride med fotosintezo do frakcionacije izotopa <sup>13</sup>C. Dejavniki, ki vplivajo na stomatalno prevodnost (hitrost, s katero vodne pare izhlapevajo iz listnih por), indirektno vplivajo na fotosintezo in s tem na vsebnost izotopa <sup>13</sup>C v rastlini. Gnojenje s sintetičnimi gnojili zagotavlja večjo preskrbo rastline z dušikom kot v primerih, kjer je gnojenje organsko, zato se lahko spremeni vsebnost izotopa ogljika. Raziskave so pokazale, da so v nekateri ekološko pridelani zelenjavi nižje  $\delta^{13}\text{C}$  vrednosti kot v konvencionalno pridelani (Flores in sod., 2007; Rapisarda in sod., 2010).

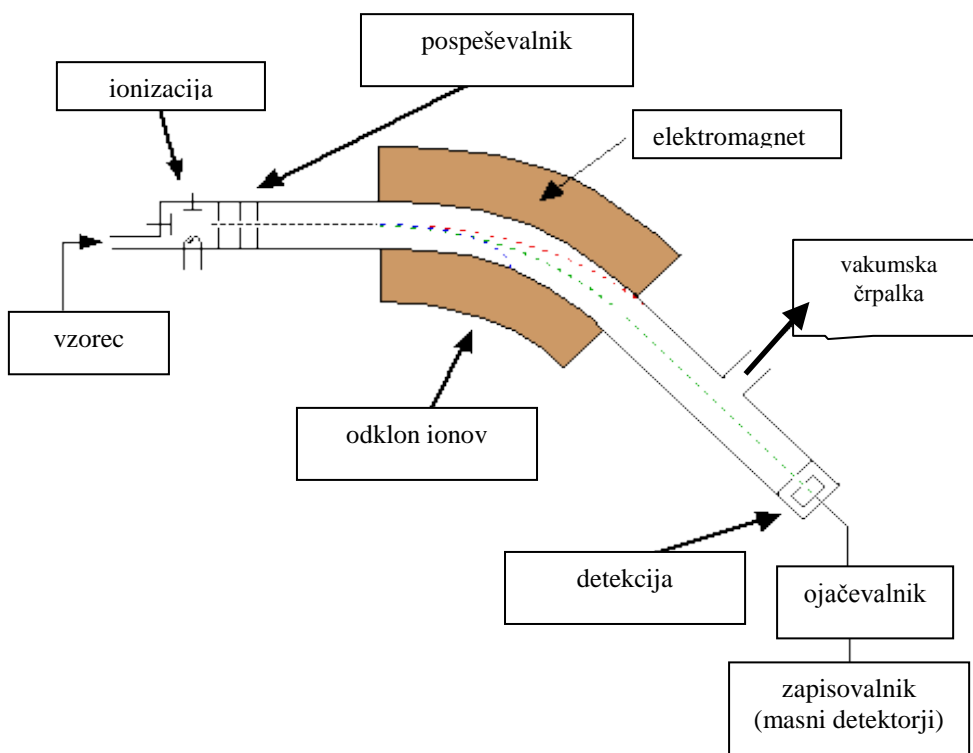
### 2.4.4 Določanje izotopskega razmerja z metodo IRMS

Nihanja v razmerju izotopov istega elementa so izredno majhna, zato je za merjenje odstopanj potrebno uporabiti zelo občutljiv instrument. Izotopsko sestavo lahkih elementov merimo z masnim spektrometrom za analitiko stabilnih izotopov (IRMS – angl. Isotope Ratio Mass Spectrometry). V masnem spektrometru sta osnovna procesa tvorba ionov v plinski fazi iz nevtralnih molekul in ločevanje ionov glede na maso in naboj (m/z). Določanje stabilnih izotopov z IRMS vsebuje naslednje stopnje: ionizacija delcev, pospeševanje, odklon delcev in detekcija. V tej napravi je potrebno najprej delce ionizirati (atome, molekule ali fragmente molekul). Sledi pospeševanje delcev v električnem polju, da imajo isto kinetično energijo, nato jih v magnetnem polju odklonimo. Odklon je odvisen od razmerja med maso delca in nabojem (m/z), lažji kot je, bolj se delec odkloni. Glede na odklon, ki ga merimo, sklepamo na zvrst delca ali na masno število izotopa. Vzorec primerjamo s standardom, ki ima natančno znano izotopsko sestavo, s tem se izboljša natančnost meritev (Žigon, 1994; Clark, 2000).

V masni spektrometer uvajamo vzorec vedno v obliki plina. Za določanje razmerja <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C in <sup>15</sup>N/<sup>14</sup>N v trdnih in tekočih vzorcih imamo tako različne preparacijske sisteme. V elementnem analizatorju, ki je povezan z masnim spektrometrom, vzorec v toku čistega kisika sežgemo, nastalo plinsko mešanico pa ločimo na kromatografski koloni. Plin CO<sub>2</sub> ali N<sub>2</sub> uvajamo z metodo, ki se izogne kakršnikoli izotopski frakcionaciji in omogoča zbiranje plina brez vsakršnih izgub. Pri določanju vrednosti  $\delta^{15}\text{N}$  moramo vse produkte dušika (NO,

NO<sub>2</sub> ...), ki so nastali v procesu izgorevanja, reducirati do N<sub>2</sub>, saj samo to obliko dušika uvajamo v ionski izvor (Rapisarda, 2005; Žigon, 1994).

Poznamo dva tipa IRMS – z dvojnimi uvajalnimi sistemom in s kontinuiranim pretokom nosilnega plina. V primeru spektrometra z dvojnimi uvajalnimi sistemom merimo vzorec relativno glede na standard, ki ga analiziramo simultano. V primeru spektrometra s kontinuiranim pretokom, pa vzorec uvajamo v masni spektrometer s He. Prednost IRMS z dvojnimi uvajalnimi sistemom je njegova natančnost, medtem ko nam spektrometer s kontinuiranim pretokom plina omogoča analizo večjega števila vzorcev (Žigon, 1994; Clark, 2000).



Slika 7: Princip delovanja sistema IRMS (Clark, 2000)



## 2.5 VSEBNOST NITRATOV V ŽIVILIH EKOLOŠKE IN KONVENCIONALNE PRIDELAVE

Rastline potrebujejo večino dušika za tvorbo beljakovin ter cele vrste drugih pomembnih spojin (klorofil, pomembnih spojin za okus, vonj in barvila), vključno z DNK. Dušik je zato nujno potrebno hranilo za bujno vegetacijsko rast, kakovost in odpornost rastline. Večino dušika rastline sprejmejo v obliki nitrata. Ker je to hranilo v tleh in v rastlini zelo mobilno, se lahko iz tal izpere ali pa prekomerno nakopiči v rastlinah. Da bi preprečili izgube dušika, ga je potrebno pazljivo odmerjati, v skladu s potrebami rastlin v posamezni fazi razvoja.

Pri povečanem gnojenju z dušikom se praviloma povečuje vsebnost nitrata v rastlinah. Pri tem ni razlike, ali nitrat izvira iz mineralnih ali organskih gnojil. Pomanjkanje svetlobe in nizke temperature povzročajo slabšo presnavljanje nitrata in posledično pride do povečanja njegove vsebnosti v rastlini. Vsebnost nitrata je odvisna tudi od razvojnega stadija rastline. V času naglega vegetativnega razvoja se v rastlinah lahko nakopiči bistveno več nitrata, če ga preveč dodajamo, kot kasneje, ko rastline vstopijo v generativno fazo (Mihelič in sod., 2010).

Na sprejem snovi v rastlino vplivata intenziteta in valovna dolžina osvetlitve. Aktivni sprejem nitrata v rastlino je pogojen s prisotnostjo nastalih ogljikovih hidratov v procesu fotosinteze. Zmanjšana jakost osvetlitve posledično povzroči zmanjšano stopnjo fotosinteze, sprejem dušika v rastline je zmanjšan in zmanjša se aktivnost za redukcijo nitrata. Nereduciran nitrat se posledično akumulira v vakuolah korenin, poganjkov in zelenih listov (Demšar, 2003). Ti metabolni procesi potekajo predvsem v listih rastlin, zato se koncentracija nitrata poveča v steblih, pecljih ter listih, v sadju in cvetovih pa je najmanjša (Kmieciak in sod., 2004).

Rastlina v normalnih ravnih razmerah uporablja dušik za tvorbo proteinov. Ko se rast rastline upočasni, se upočasni tudi tvorba proteinov in dušik ostaja v rastlini kot neproteinski dušik. Na akumulacijo nitrata v rastlini vplivajo suša, visoke temperature, ki povečajo izhlapevanje vode iz rastlin, oblačnost, ki zmanjša tvorbo proteinov, pomanjkanje določenih hranil (P, Ca, K), poškodbe rastlin zaradi insektov, nezrelost plodov ob spravilu in previsoke količine dušika v tleh zaradi pretiranega gnojenja (Brown in sod., 1993). Na vsebnost nitrata v rastlini vplivajo številni faktorji, kot so sorta, tip zemlje, čas sajenja in obiranja, prisotnost nitrata v vodi in podtalnici, lokacija, klima in zdravstveno stanje rastline (Herencia in sod., 2011).

Rembalkowska (2007) navaja, da je vsebnost nitrata in nitritov precej večja v živilih iz konvencionalne pridelave kot v ekološko pridelanih. To so potrdili tudi Herencia in sod. (2007), ko so gojili fižol, blitvo, paradižnik in ponovno leta 2011 na korenju, solati, melonah, krompirju, jagodah, paradižniku in lubenicah. Hkrati so opazili, da obstajajo velike razlike med posameznimi vrstami sadja oz. zelenjave. Plodovi sadnih rastlin vsebujejo bistveno manjše vsebnosti nitrata, v večini primerov pod 10 mg/kg sveže mase (Walters, 1996).

### **2.5.1 Vpliv nitratov in nitritov na zdravje**

Ljudje smo izpostavljeni nitratom in nitritom iz različnih virov, najpomembnejša med njimi sta hrana in voda. V prehrani ljudi predstavlja največji delež vnosa nitrata v telo zelenjava (ca. 70% vnosa), manj pitna voda (ca. 20 %), meso in mesni izdelki (ca. 6 %). Mejne dovoljene dnevne količine zaužitega nitrata in nitrita (ADI - Acceptable Daily Intake), pri katerih ni nikakršnih škodljivih učinkov za zdravje, so 5,0 mg nitrata/kg telesne teže in 0,2 mg nitrita/kg telesne teže (Mihelič in sod., 2010).

Nitrit se uporablja kot konzervans, v proizvodnji mesnih izdelkov jih uporabljamo za lepšo rdečo obarvanost in podaljšanje roka uporabnosti. V prebavilih bakterije pretvorijo nitrat v nitrit, ki lahko reagira z amidi in amini, tvorijo se nitrozamidi in nitrozamini, za katere je dokazano, da so kancerogeni. Zaužiti nitrati so lahko vzrok za pojav raka na želodcu (Keuc, 1995).

Nitrit je eden od produktov pretvorbe nitrata in velja za zdravju škodljivo snov (Mihelič in sod., 2010). Vpliva na motorične sposobnosti, zmanjša krvni tlak, širi arterije in vene, povzroči bruhanje, poveča se tveganje za raka in mutagene učinke (Sofos in Raharjo, 1995). Prevelike količine nitratov se v telesu pretvorijo v nitrit, ki lahko reagira s hemoglobinom v krvi.  $Fe^{2+}$  se oksidira v  $Fe^{3+}$  in tvori methemoglobin, ki nima sposobnosti vezave kisika. Transport kisika iz pljuč po telesu v ostala tkiva in organe je zmanjšan, pojav pa imenujemo methemoglobinemija (Keuc, 1995; Rembialkowska, 2007).

## **2.6 ANTIOKSIDANTI**

### **2.6.1 Prosti radikali in oksidativni stres**

Prosti radikali v organizmu reagirajo z biološko pomembnimi molekulami. Biološke molekule se v končni fazi največkrat oksidirajo, radikali pa so iniciatorji tega procesa. Prooksidanti so bili definirani kot komponente, npr. kovinski ioni, ki zmanjšajo aktivacijsko energijo za reakcijo oksidacije lipidov. Po drugi definiciji so to vsi iniciatorji tvorbe radikalov. Definirani so tudi kot oksidanti, ki imajo vlogo v patoloških procesih ali kot snovi, ki tvorijo kisik vsebujoče stranske produkte metabolizma, ki lahko poškodujejo celice. V najširšem smislu lahko med prooksidante uvrščamo snovi, ki dejansko povzročajo oksidativne poškodbe, kakor tudi vse ostale snovi in dejavnike, ki te poškodbe pospešijo (Cigić in Tasić, 2006).

### **2.6.2 Antioksidanti**

Antioksidanti so tiste snovi, ki ščitijo organizem pred potencialno škodljivimi oksidirajočimi agensi. V živilstvu so to tiste snovi, ki zmanjšujejo oksidativne spremembe živil. V širšem smislu je antioksidant snov, ki prepreči oksidacijo neke druge snovi tudi takrat, ko je koncentracija le-te precej večja od koncentracije antioksidanta. Antioksidant je snov (kot  $\beta$ -karoten ali vitamin C), ki zavira oksidacijo ali reakcije, v katere vstopajo kisik, peroksidi ali prosti radikali (Cigić in Tasić, 2006).

Antioksidanti delujejo tako, da preprečujejo poškodbe celičnih molekul zaradi oksidacije. Z oksidoredukcijskimi reakcijami antioksidanti nevtralizirajo posebno reaktivne proste radikale, ki nastanejo iz kisika in vodikovega peroksida v običajnih fizioloških razmerah. Nekatere od teh prostih radikalov, kot so superoksidni anion ali peroksil ( $O_2^{\bullet}$ ), hidroksil ( $HO^{\bullet}$ ), hidroperoksil ( $HOO^{\bullet}$ ) radikali imenujemo tudi reaktivne kisikove zvrsti (ROS) (Boyer, 2005). Nobenega dvoma ni, da so antioksidanti encimi, ki katalizirajo reakcije, v katerih se prosti radikali in ROS pretvorijo v manj reaktivne spojine ter nekatere manjše molekule, ki so lovilci prostih radikalov (Cigić in Tasič, 2006).

Naravni antioksidanti, kot so vitamin C, vitamin E, karotenoidi, polifenoli, imajo različne koristne vplive na zdravje. Antioksidativne lastnosti teh komponent naj bi delovale kot zaščita pred kardiovaskularnimi obolenji, raku, preprečevanju staranja, vendar visoke količine antioksidantov lahko sprožijo nasproten učinek in postanejo prooksidanti (Rietjens in sod., 2002).

Antioksidanti se razlikujejo po kemijski strukturi, kot tudi po mehanizmu delovanja. Pogosto se antioksidanti delijo glede na izvor, način delovanja, fizikalno-kemijske lastnosti, strukturo, mehanizem delovanja. Vsi antioksidativni encimi in proteini, kakor tudi nekateri nizkomolekularni antioksidanti, nastajajo v organizmu kot rezultat celičnega metabolizma. Nekaterih snovi telo ne more proizvesti, zato jih moramo nujno zaužiti s hrano (antioksidativni vitamini, minerali, esencialne aminokisljine). Sadje in zelenjava sta izredno bogata z različnimi antioksidanti, ki zavirajo reakcije oksidacije in radikalne poškodbe v organizmu (Cigić in Tasič, 2006).

Pomembni antioksidanti v rastlinah so vitamin C, vitamin E, flavonoidi, karotenoidi, katehini in terpeni. Med te skupine uvrščamo nekaj tisoč aktivnih snovi, ki na različne načine prispevajo k skupnemu antioksidativnemu potencialu živila. Velika vsebnost endogenih antioksidantov vpliva tudi na dobro skladiščno sposobnost, ohranjanje senzorične in prehranske vrednosti živil, kakovost surovine za nadaljno predelavo, ohranjanje snovi, ki imajo pozitiven vpliv na človekovo zdravje (Hribar in Simčič, 2000).

### **2.6.3 Antioksidativni potencial**

Skupni antioksidativni potencial živila je odvisen od različnih dejavnikov, ki lahko delujejo pospeševalno ali zaviralno. Med postopkom predelave prihaja do kompleksnih reakcij, ki lahko bistveno spremenijo antioksidativni potencial živila. Med tehnološkim postopkom lahko pride do zmanjšanja antioksidativnega potenciala živila zaradi razpada naravno prisotnih antioksidantov ali zaradi nastanka komponent z prooksidativnimi lastnostmi. Do povečanja antioksidativnega potenciala lahko pride zaradi nastanka komponent z antioksidativnimi lastnostmi ali zaradi povečanja antioksidativnih lastnosti že prisotnih antioksidantov. Večina antioksidantov izgubi v procesu predelave antioksidativne lastnosti zaradi nestabilnosti. Med mehanskimi operacijami lupljenja in rezanja prihaja do hitre indukcije encimov, ki zmanjšajo aktivnost različnih naravnih antioksidantov (Hribar in Simčič, 2000). Bolj kot vitamin C k antioksidativnemu potencialu jabolk prispevajo flavonoidi, npr. kvercetin, epikatehin, procianidin B2 (Veberič in sod., 2005).

## **2.6.4 Določanje antioksidativnega potenciala s kolorimetričnim določanjem vsebnosti standardnega radikala**

Za merjenje antioksidativnega potenciala vzorca se uporablja primerjalno fotometrično sledenje izginjanja barve (stopnje bledenja - bleaching rate) stabilnega prostega radikala 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) pri 517 nm. Radikal DPPH<sup>•</sup> absorbira pri valovni dolžini 517 nm, v reakciji z antioksidantom (redukcija) razpada, zaradi česar se absorpcija zmanjša. Zmanjševanje absorbance je proporcionalno vsebnosti antioksidantov v vzorcu (Vidrih in Kač, 2000).

## **2.7 FENOLNE SNOVI**

### **2.7.1 Funkcija fenolnih snovi**

Fenolne spojine so naravni sekundarni metaboliti rastlin, ki določajo zunanje in notranje parametre kakovosti plodov, kot so videz, vonj, okus, aroma in zdravju koristne snovi (Veberič in sod., 2005). Fenolne spojine so skupine spojin, ki rastlinam sicer niso nujno potrebne, so pa pomembne zato, ker prispevajo pri premagovanju različnih abiotskih in biotskih sprememb. Med fenolnimi spojinami so najbolj pogosti glikozidi flavonolov, konjugati hidroksicimetne kisline in kondenzirani tanini ter antociani. V rastlinah so vključeni pri razvoju kot integralni del celičnih sten, atraktanti in repelenti, za barvo cvetovom in sadežem, pomagali naj bi rastlinam pred različnimi stresji, nekateri so tudi rezervne spojine (Abram in Baričevič, 2006). Polifenoli so najbolj razširjeni antioksidanti v naši prehrani. Naravni polifenoli, kot so flavonoidi, so pomembne sestavine sadja, zelenjave, oreškov, semen, čajev, oljčenga olja, rdečega vina... (Rietjens in sod., 2002). Sadje ponavadi vsebuje večje vsebnosti flavonoidov kot zelenjava. Živila, ki vsebujejo velike vsebnosti proantocianidinov, so sadje, predvsem jabolka, hruške, grozdje,... (Vrhovšek, 2001).

Vsebnost polifenolov v rastlini je odvisna od načina kulture, rastnih razmer in pogojev obiranja plodov, stopnje zrelosti, rastlinske vrste. Znano je, da nekateri fenolni antioksidanti lahko pri večjih koncentracijah delujejo celo kot prooksidanti (Hribar in Simčič, 2000).

### **2.7.2 Delitev fenolnih snovi**

Delimo jih na flavonoide in ne flavonoide. Glavne skupine flavonoidov se razlikujejo v heterocikličnem obroču C in jih delimo na flavone, flavonole, izoflavone, antociane, flavanole (katehini) in flavanone. Kemijska struktura in stopnja polimerizacije flavonoidov vpliva na njihove biološke lastnosti, razpoložljivost za človeški organizem, antioksidativne lastnosti, specifične interakcije s celičnimi receptorji in encimi (Vrhovšek, 2001).

### 2.7.3 Pomen fenolnih snovi za zdravje ljudi

Živilska stroka je enotnega mnenja, da prehrana, ki vsebuje večje količine sadja in zelenjave, zniža tveganje za nastanek številnih sodobnih civilizacijskih bolezni, kot so rak debelega črevesa, obolenje srca in ožilja, diabetes, debelost,... Ne glede na odstopanja določenih dokazov lahko trdimo, da prehrana, bogata s sadjem in zelenjavo, zniža tveganje za pojavnost raka na debelem črevesu (Hribar in Zlatic, 2006). Številne epidemiološke študije kažejo povezavo med uživanjem hrane in pijač, ki vsebujejo velike vsebnosti flavonoidov in zmanjšanjem nastanka mnogih bolezni modernega življenja, ki jih povzroča oksidativni stres. Fenolne spojine sodelujejo pri obrambi pred oksidativnimi poškodbami, ki jih povzročajo prosti radikali (Vrhovšek, 2001). Raziskave so pokazale, da imajo nekateri flavonoidi do petdesetkrat večji antioksidativen učinek kot vitamina C in E ter da so flavonoidi v rdečem grozdju zelo učinkoviti pri preprečevanju oksidacije človeškega LDL holesterola. Flavonoidi naj bi delovali preventivno tudi pred procesi staranja. Proantociani in antociani pomagajo spodbujati prekrvavitev vseh žlez in organov, delujejo zdravilno pri posledicah krhkih kapilar, kot so modrice, krčne žile in hemeroidi, pomagajo tudi pri preprečevanju osteoporoze (Mindell, 2001).

### 2.7.4 Fenolne snovi v jabolkih

Vsebnost flavonoidov v sadju in zelenjavi je v veliki meri odvisna od vrste rastline kot tudi od genetskih razlik znotraj same vrste. Poleg genotipa vplivajo tudi zunanji dejavniki, zlasti razmere rasti, letni čas, klimatske razmere, stopnja zrelosti, priprava hrane in predelava. Zelo pomemben vir kvercetina predstavlja sadje in zelenjava, npr. jabolko, čebula, brokoli (Hribar in Zlatic, 2006). Velik del vseh polifenolnih antioksidantov v jabolkih predstavljajo proantocianidini, od katerih se 600-900 mg/kg nahaja v mesu in 1900-3400 mg/kg v lupini, kar pomeni, da glede na težo jabolka 68-80 % proantocianidinov prispeva meso in 20-32 % lupina. V sortah jabolk, ki imajo rdečo lupino, se nahajajo antociani (83-156 mg/kg). Velike razlike v vsebnosti flavonoidov najdemo tudi med posameznimi sortami sadja in zelenjave. Za jabolka je bilo določeno, da vsebnosti polifenolnih kislin in flavonoidov lahko nihajo za štirikrat (Vrhovšek, 2001). Glavni polifenoli v jabolkih so flavanoli, saj predstavljajo kar 65-85 % celotne vsebnosti polifenolov (Gharras, 2009). Fenoli v kožici jabolk značilno prispevajo k antioksidativnemu potencialu jabolk, manj fenoli v mesu (pulpi). Da bi povečali antioksidativne lastnosti jabolk, je priporočljivo uživanje celotnih plodov jabolk (Veberič in sod., 2005).

Organsko pridelana jabolka kažejo večjo naravno odpornost proti škodljivcem in boleznim, zato domnevajo, da vsebujejo plodovi teh kultivarjev večjo vsebnost fenolnih snovi v pulpi in koži kot integrirano pridelana jabolka. Zaradi biotskih in abiotskih vplivov naj bi bila vsebnost fenolnih komponent večja v kožici jabolk kot v pulpi (Veberič in sod., 2005). Glavne fenolne snovi v kožici jabolk so rutin, klorogenska kislina, floridzin in kvercetin-3-ramnozid. Kultivarji, ki so bili gojeni organsko, imajo večje vrednosti klorogenske kisline kot tisti iz integrirane pridelave. Kvercetin je pomemben fenol z antioksidativnimi lastnostmi, ki ga telo lažje izkoristi v glikozidni obliki, ta pa se kasneje transformira v kvercetin. Tudi procianidini prispevajo k antioksidativnemu potencialu v jabolku.

Bistvene razlike med ekološkim in konvencionalnim režimom pridelovanja, predvsem gnojenje tal, lahko vplivajo na hranilno sestavo rastlin in na sekundarne metabolite rastline. Predvsem dostopnost neorganskega dušika lahko vpliva na sintezo sekundarnih metabolitov in proteinov. Znano je, da imajo organsko pridelana živila boljše senzorične lastnosti, vsebujejo manj pesticidov in umetnih gnojil, več hranil in zaščitnih snovi, ter manj nitratov kot konvencionalno pridelana živila. Biosinteza fenolnih snovi v rastlini je močno povezana s sorto, načinom gnojenja, temperaturo, svetlobo in sezonskimi variacijami. Večjo vsebnost polifenolov v organsko pridelanem sadju in zelenjavi lahko razložimo z večjim sprejemom fosforja in omejeno dostopnostjo dušika. Povečan sprejem fosforja zagotovi potrebno energijo za sintezo fitokemikalij. Poleg tega je bilo dokazano, da rastlina sintetizira več flavonoidov, kadar je dušik omejen (Vallverdu-Queralt in sod., 2012).

## 2.8 ZRELOSTNI FAKTORJI

### 2.8.1 Določanje trdote jabolk

Trdota mesa je pomemben pokazatelj stopnje zrelosti jabolk in je odvisna od genetskih in rastnih dejavnikov, oskrbe z minerali, stopnje zrelosti ob obiranju in načina skladiščenja (Hoehn in sod., 2003).

Čvrstost plodov se z zorenjem zmanjšuje in je odvisna od sestave celičnih sten, količine celuloze in hemiceluloze, pektinov, sladkorjev s pet ali šest C atomi. Razgradnja hemiceluloze in pektinskih snovi oslabi povezave med celicami, plodovi postanejo bolj sočni in okusni. V vodi netopni pektin se razgrajuje do vodotopnih snovi nižje molekulske mase. V nadaljevanju razgradnje pa postanejo plodovi moknati in razpadajo (Gvozdenović, 1989).

Trdota mesa jabolk je povezana z velikostjo plodov. Raziskave fizioloških tkiv jabolk so pokazale, da imajo večja jabolka manjšo čvrstost kot manjši plodovi. Ker je število celic v jabolkih konstantno (okoli 3 milijone) ne glede na velikost jabolk, imajo večja jabolka torej večje celice. Tkivo jabolk ima tudi določeno število medceličnih zračnih prostorov. Večji plodovi imajo večje celice in večje medcelične zračne prostore, ki povzročijo večji pritisk na celične stene in na pektinske vezi, ki celice povezujejo. Če celične ali pektinske vezi popustijo, se čvrstost tkiva zmanjša. Dokazano je, da če jabolka pustimo na sobni temperaturi, bodo večji plodovi hitreje izgubljali trdoto kot manjši (Pitts in sod., 1997).

Trdoto mesa merimo z destruktivnimi metodami in nedestruktivnimi (akustična metoda). Nedestruktivne metode so boljše, saj plodov ne poškodujejo in lahko skozi daljše časovno obdobje opazujemo isti plod. Med mehanske destruktivne metode spada penetrometrija, ki je lahko mehanska ali elektronska. Penetrometer je naprava, s katero merimo, kakšna sila je potrebna, da se bat določene velikosti vgrezne za določeno globino v meso plodu brez lupine. Rezultat izražamo v  $\text{kg/cm}^2$  (Štampar in sod., 2009; Hribar, 1990).



Slika 8: Merjenje trdote mesa jabolk z mehanskim penetrometrom (Evaluating fruit..., 2009)

### 2.8.2 Škrobni test

Škrob se med rastno sezono akumulira v sadju kot rezervna snov in se v poznejši fazi dozorevanja hidrolizira do sladkorjev. Razgradnja škroba je počasnejša v notranjem delu tkiva kot zunanem. Za jabolka sorte Gala je značilna krožna (cirkularna) razgradnja škroba, ki se začne v sredini in se proti zunanosti ploda širi v krogu. S pomočjo jodovice, ki obarva sredino ploskve prečno prerezanega jabolka, lahko na osnovi že izdelanih škrobnih lestvic za posamezne kultivarje dobimo dober podatek o stopnji zrelosti (Peirs in sod., 2002).

Plodove prerežemo prečno po sredici na dve polovici. Rezne ploskve potopimo v raztopino jodovice. Škrob se v prisotnosti jodovice obarva temno modro do črno. Škrobni indeks določimo s pomočjo primerjalne tabele, ki ima vrednosti od 1 do 10. Vrednost 1 pomeni 100 odstotkov škroba – nezrel plod. Vrednost 10 pa pomeni, da ni škroba, je v celoti razgrajen do sladkorjev – plod je prezrel. Vsaka sorta ima priporočene vrednosti škroba, od katerih je odvisno skladiščenje (Štampar in sod., 2009).

### 2.8.3 Določanje suhe snovi

Glavni delež suhe snovi predstavljajo sladkorji (saharoza, glukoza, fruktoza, sorbitol). Z dozorevanjem se njihova skupna vsebnost povečuje. Količino suhe snovi v plodu merimo z refraktometrom v odstotkih (1 % = °Brix). Sok ploda damo na ploščico refraktometra, zapremo s pokrovčkom, pogledamo proti svetlobi in odčitamo vrednost. Pri avtomatskih refraktometrih kanemo kapljico soka na analizno celico in odčitamo digitalno vrednost. Meritve izvajamo večkrat pred obiranjem, dokler sorte ne dosežejo zahtevanih vrednosti (Štampar in sod., 2009).

Preglednica 9: Priporočene vrednosti za škrobni indeks, trdoto, vsebnost sladkorja in organskih kislin pri nekaterih sortah jablan (vrednosti veljajo za tehnološko zrelost) (Štampar in sod., 2009: 208)

Sorta	škrobni indeks (1-10)	trdota v kg/cm <sup>2</sup>	suha snov v odstotkih	titrabilne kisline v g/L
Elstar	5-6	6,3-6,6	11,5-12,5	5,8-6,8
Gala	5-6	6,8-7,0	11,5-12,5	3,1-4,2
Jonagold	7-9	5,9-6,6	12,0-13,5	3,8-5,1
Zlati delišes	4-6	6,6-7,5	11,5-13,0	3,8-5,1
Idared	5-6	5,9-6,8	10,5-11,5	5,5-6,5
Breaburn	5-6	7,8-9,5	11,5-12,5	5,3-6,5
Jonatan	4,5-6	5,9-6,6	11,5-12,5	5,0-6,8



### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

##### 3.1.1 Jabolka

V okviru eksperimentalnega dela smo uporabili 11 vzorcev (vsak vzorec v dveh paralelkah) jabolk sorte Gala, ki so bila pridelana na ekološki ali na konvencionalni način (uporaba mineralnih ali organskih dušikovih gnojil). Poskus je bil izveden na posestvu Kompoš, Pod bloki, Fakultete za kmetijske in biosistemske vede Univerze v Mariboru v letu 2011. Gnojila so bila dodana v dveh odmerkih: 60 kg N/ha in 120 kg N/ha. V mesecu septembru smo odvzeli vzorce jabolk. Šest vzorcev jabolk je bilo gnojenih z mineralnimi dušikovimi gnojili, štiri vzorci z organskimi dušikovimi gnojili, en vzorec pa je služil kot kontrolni vzorec.

Preglednica 10: Oznake vzorcev, pomen oznak in tip uporabljenega gnojila (organsko/mineralno)

Oznaka vzorca	Pomen oznake	Tip gnojila (organsko/mineralno)
KON	KONTROLA (negnojeno)	/
GŽI 60	PLANTELLA ORGANIK (5 % dušika) v odmerku 60 kg N/ha	organsko gnojilo
GŽI 120	PLANTELLA ORGANIK (5 % dušika) v odmerku 120 kg N/ha	organsko gnojilo
BS 60	BIOSOL (7 % dušika) v odmerku 60 kg N/ha	organsko gnojilo
BS 120	BIOSOL (7 % dušika) v odmerku 120 kg N/ha	organsko gnojilo
AD 60	APNENI DUŠIK (20 % dušika) v odmerku 60 kg N/ha	mineralno gnojilo
AD 120	APNENI DUŠIK (20 % dušika) v odmerku 120 kg N/ha	mineralno gnojilo
KAN 60	KAN (27 % dušika) v odmerku 60 kg N/ha	mineralno gnojilo
KAN 120	KAN (27 % dušika) v odmerku 120 kg N/ha	mineralno gnojilo
UR 60	UREA (46 % dušika) v odmerku 60 kg N/ha	mineralno gnojilo
UR 120	UREA (46 % dušika) v odmerku 120 kg N/ha	mineralno gnojilo

##### 3.1.2 Priprava vzorcev jabolčnega soka za nadaljnje meritve

Vzorcem jabolk smo najprej na štirih mestih odstranili delček lupine in jim izmerili trdoto. Nato smo jabolka prerezali prečno po sredini in izrezali kolobarje, ki smo jih uporabili za škrobni test. Iz preostanka jabolka smo pripravili jabolčni sok s pomočjo sokovnika Philips HR 1861. Vzorce za merjenje izotopske sestave smo uporabili takoj, ostale vzorce pa smo zamrznili pri temperaturi -18 °C.

## 3.2 METODE DELA

### 3.2.1 Določanje vsebnosti dušikovih in ogljikovih izotopov v iztisnjem jabolčnem soku

#### 3.2.1.1 Določanje $\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{15}\text{N}$ vrednosti v pulpi jabolčnega soka z metodo IRMS

Z masnim spektrometrom za analitiko stabilnih izotopov lahkih elementov (IRMS) izmerimo izotopsko razmerje med deležem težjega in lažjega izotopa ogljika oz. dušika. Izotopsko razmerje je podano z vrednostjo  $\delta^{13}\text{C}$  oz.  $\delta^{15}\text{N}$  v ‰, ki je definirana z enačbo (1).

Reagenti:

- aceton
- destilirana voda
- interni, laboratorijski standard: ureaC in europaN ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ )
- referenčni standardi: IAEA-NBS (oil), IAEA-CH-7, IAEA-CH-6, IAEA-N-1, IAEA-N-2

Aparatura in pribor:

- centrifuga (Centric 322A)
- plastične centrifugirke ( $V = 50 \text{ ml}$ )
- sušilnik
- pinceta
- kositrove kapsule dimenzije  $\Phi = 4/6 \text{ mm}$  (PDZ Europa Ltd)
- masni spektrometer Europa Scientific 20-20 s preparativnim sistemom ANCA-SL za trdne in tekoče vzorce

Priprava vzorca:

V plastične centrifugirke nalijemo 30 mL vsakega vzorca jabolčnega soka. Vzorce nato centrifugiramo 10 minut pri 3400 obratov/min in tako ločimo pulpo ter netopne sestavine od čistega soka. Supernatant shranimo za določanje  $\delta^{13}\text{C}$  vrednosti sladkorjev. Pulpo uporabimo za določanje  $\delta^{13}\text{C}$  in  $\delta^{15}\text{N}$  vrednosti v pulpi. Pulpi dodamo vodo (30 ml) in dobro premešamo. Nato centrifugiramo (5 min, 3400 obratov/min) in odlijemo supernatant. Ponovimo spiranje z vodo in centrifugiranje. Sledi spiranje z acetonom (10 mL) in centrifugiranje (5 min, 3400 obratov/min), ki ga nato ponovimo. Po vsakem centrifugiranju moramo pulpo in topilo dobro premešati. Po končanem spiranju oborino posušimo v sušilniku na  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Z vodo odstranimo iz pulpe proste sladkorje, z acetonom pa lipide. Prisotni sladkorji v pulpi lahko ovirajo ekstrakcijo lipidov, zato jih moramo popolnoma odstraniti. Če ekstrakcija lipidov ni popolna, lahko povzročijo precejšnje napake pri vrednostih  $\delta^{13}\text{C}$  v pulpi.

#### Izvedba analize - določanje $\delta^{13}\text{C}$ :

Neposredno pred merjenjem v kositrove kapsule ( $\Phi = 4/6$  mm) s pinceto prenesemo homogeniziran vzorec pulpe posameznega vzorca in jih zatisnemo s pinceto. Vzorce nato izmerimo v masnem spektrometru. Pred merjenjem vzorcev pripravimo ustrezne standarde podobno kot vzorec. Za merjenje uporabljamo laboratorijski standard ureaC, katerega naneseemo 3  $\mu\text{l}$  na absorbent v kapsulah. Izotopsko sestavo standarda, ki znaša  $-30,6 \pm 0,2$  ‰, je potrebno določiti na začetku in koncu merjenja ter na vsakih pet do deset izmerjenih vzorcev. Za spremljanje kvalitete je potrebno poleg laboratorijskega standarda pripraviti tudi referenčne standarde IAEA-NBS (oil), IAEA-CH-7 in IAEA-CH 6, ki imajo  $\delta^{13}\text{C}$  vrednosti  $-29,7 \pm 0,2$  ‰,  $-31,8 \pm 0,2$  ‰ in  $-10,4 \pm 0,2$  ‰. Napaka meritev  $\delta^{13}\text{C}$  vrednosti znaša  $\pm 0,2$  ‰.

#### Izvedba analize – določanje $\delta^{15}\text{N}$ :

V kositrove kapsule ( $\Phi = 4/6$  mm) s pinceto prenesemo homogeniziran vzorec pulpe, ga zatisnemo s pinceto in vzorce izmerimo z masnim spektrometrom. Za merjenje uporabljamo laboratorijski standard europaN z izotopsko sestavo  $+2,5 \pm 0,2$  ‰, katerega naneseemo 3  $\mu\text{L}$  na absorbent v kapsulah. Izotopsko sestavo standarda določimo na začetku in koncu merjenja ter na vsakih pet do deset izmerjenih vzorcev. Za spremljanje kvalitete je potrebno poleg laboratorijskega standarda pripraviti tudi referenčna standarda IAEA-N-1 ( $\delta^{15}\text{N} = 0,4 \pm 0,2$  ‰) in IAEA-N-2 ( $\delta^{15}\text{N} = 20,3 \pm 0,2$  ‰). Napaka meritev  $\delta^{15}\text{N}$  vrednosti znaša  $\pm 0,3$  ‰.

#### 3.2.1.2 Določanje $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti sladkorjev v jabolčnem soku z metodo IRMS

Z metodo IRMS izmerimo izotopsko razmerje med deležem težjega in lažjega izotopa ogljika v izoliranem sladkorju. Izotopsko razmerje je podano z vrednostjo  $\delta^{13}\text{C}$  v ‰ (enačba 1).

##### Reagenti:

- 1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$
- $\text{Ca}(\text{OH})_2$
- interni, laboratorijski standard: ureaC
- referenčni standardi: IAEA-NBS (oil), IAEA-CH-7, IAEA-CH-6

##### Aparatura in pribor:

- centrifuga (centric 322A)
- centrifugirke ( $V = 50$  mL)
- električna kuhalna plošča
- termometer
- čaša z vodo
- plastične posodice ( $V = 10$  mL)
- pH lističi
- kalibrirana brizgalka za tekoče vzorce
- kositrove kapsule dimenzije  $\Phi = 4/6$  mm (PDZ Europa Ltd)

- pinceta
- absorbent (Chromosorb W 30-60 mesh; PDZ Europa Ltd)
- masni spektrometer Europa Scientific 20-20 s preparativnim sistemom ANCA-SL za trdne in tekoče vzorce

Izolacija sladkorjev v vzorcu:

Postopek za ločbo pulpe od čistega soka je opisan pod točko 3.2.1.1 (priprava vzorca). Za izolacijo sladkorja v vzorcu uporabimo supernatant. Najprej supernatantu dodamo 1 g kalcijevega hidroksida ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ), dobro premešamo in segrevamo 3 minute v vodni kopeli pri temperaturi  $90\text{ }^\circ\text{C}$ . S tem oborimo organske kisline, aminokisline in druge sestavine v vzorcu. Vzorec centrifugiramo (5 min, 3400 obratov/min), da ločimo oborino od supernatanta. V plastične posodice odpipetiramo 4 mL čistega supernatanta in uravnamo pH z dodatkom 1 M žveplove(VI) kisline do  $\text{pH} \approx 5$  oz. do spremembe barve raztopine v rumeno. pH vrednost preverimo s pH lističi. V raztopini so prisotni predvsem sladkorji in kalcijev sulfat ter nizka vsebnost barvil. Nato shranimo raztopino čez noč v hladilniku pri približno  $4\text{ }^\circ\text{C}$  pri čemer se obori preostali kalcijev sulfat. Vzorec nad oborino, ki vsebuje sladkorje, uporabimo za nadaljno analizo.

Izvedba analize:

Najprej v kositrove kapsule dodamo absorbent (približno 1 mg) in nanj nanesimo 6  $\mu\text{l}$  vzorca, ki vsebuje izolirane sladkorje iz jabolčnega soka. Kapsule previdno zatisnemo s pinceto in izmerimo vzorce na masnem spektrometru. Postopek meritve in uporaba standardov je enaka kot pri določitvi  $\delta^{13}\text{C}$  v pulpi in je opisana pod točko 3.2.1.1.

### **3.2.2 Določanje amonijevih ionov ter skupne koncentracije nitratov in nitritov v jabolčnem soku**

Vzorce jabolčnega soka smo vzeli iz zamrzovalnika in jih odtalili na sobni temperaturi. Jabolčni sok smo zaradi motnosti tretirali z reagentoma Carez 1 in Carez 2 in prefiltrirali skozi filter papir. Nato smo v 25 mL bučko odpipetirali 10 mL prefiltriranega jabolčnega soka ter jo dopolnili z 2x destilirano vodo do oznake na bučki. Tako pripravljene vzorce jabolčnega soka smo zamrznili v 20 mL centrifugirkah in jih poslali na analizo na Biotehniško fakulteto v Ljubljani. Koncentracijo amonijevih ionov ter skupno koncentracijo nitratov in nitritov so analizirali na aparatu Technicon Autoanalyser II, ki deluje na principu CFA (Continuous Flow Analysis). Za določitev skupne koncentracije nitratov in nitritov so uporabili naslednje reagente: kalijev fosfat, NaOH, bakrov sulfat, hidrazinijev sulfat, Triton x-100, N-naftiletilen diamin (NED), sulfanilamin in fosforno kislino. Pripravo reagentov ter izvedbo analize so opisali Oms in sodelavci (1995).

Princip metode določanja skupne koncentracije nitratov in nitritov temelji na redukciji nitrata v alkalni raztopini s hidrazinijevim sulfatom s pomočjo katalizatorja reakcije ( $\text{Cu}^{\text{II}}$ ) do nitrita. Skupni nitriti nato v kislem okolju reagirajo s sulfanilamidom in N-naftiletilen diaminom. Pri tem nastane rdeča azo-barva. Kolorimetrična meritev poteka pri valovni

dolžini 520 nm na aparatu Technicon Autoanalyser II in tako določi skupno koncentracijo nitritnega in nitratnega dušika v vzorcu (Oms in sod., 1995; Aoki in sod., 1997).

Koncentracijo amonijevih ionov so določili po IPB metodi (angl. indophenol-blue metode). Reagenti, potrebni za določitev amonijevih ionov so NaOH, tri-natrijev citrat, natrijev salicilat, Triton x-100, natrijev nitroprusid in dikloroizocianurna kislina (DCI). Pripravo reagentov in potek analize so opisali Aminot in sodelavci (1997). Amoniak v kislem okolju reagira s hipokloritom, ki nastane iz dikloroizocianurne kisline (DCI). Tvori se monokloramin, ki reagira s salicilatom. Nastane indofenol modra barva, katero so izmerili na aparatu Technicon Autoanalyser II pri valovni dolžini med 640 in 660 nm. Reakcijo katalizira nitroprusid, optimalna temperatura je 45 °C (Aminot in sod., 1997; Aoki in sod., 1997).

### **3.2.3 Določanje antioksidativnega potenciala v jabolčnem soku s prostim radikalom DPPH<sup>•</sup>**

Za določanje antioksidativnega potenciala smo uporabili indirektno metodo s prostim radikalom DPPH<sup>•</sup>, ki temelji na reakciji med stabilnim prostim radikalom DPPH<sup>•</sup> (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) in donorji vodika (npr. fenoli) (Brand-Williams in sod., 1995).

Pri spektrofotometrični metodi spremljamo spremembo barve alkoholne raztopine DPPH<sup>•</sup>, ob reakciji z antioksidantom. Pri tem se tvori reducirana oblika DPPH<sub>2</sub>, viden je preskok barve iz vijolične v rumeno. Absorbanco merimo pri valovni dolžini 517 nm (Molyneux, 2004). Zmanjševanje absorbance je proporcionalno vsebnosti antioksidantov v vzorcu.

Reagenti:

- DPPH<sup>•</sup> (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) (Sigma, Nemčija)
- metanol (Merck, Nemčija)

Aparatura in pribor:

- UV-VIS spektrofotometer,
- analitska tehtnica,
- ependorfke,
- centrifuga,
- pipeta
- plastične kivete (10 mm).

Izvedba analize:

Najprej je potrebno vzorce jabolčnega soka centrifugirati (4000 obratov/5 min). Supernatant smo prelili v ependorfke. Nato v 100 mL bučko zatehtamo 4 mg DPPH<sup>•</sup>, dodamo 20 mL metanola in premešamo, da se DPPH<sup>•</sup> popolnoma raztopi. Metanol dodajamo toliko časa, da je absorbanca raztopine blizu 1. Raztopina DPPH<sup>•</sup> mora biti pred meritvijo vedno sveže pripravljena.

Za meritev potrebujemo referenčni vzorec, vzorec in slepo probo. Referenčni vzorec (RF) pripravimo tako, da v ependorfko odpipetiramo 120  $\mu\text{L}$  metanola in dodamo 1,5 mL raztopine DPPH $\cdot$ . Vzorce pripravimo tako, da v ependorfko odpipetiramo 120  $\mu\text{L}$  vzorca jabolčnega soka in 1,5 mL raztopine DPPH $\cdot$ . Za vsak vzorec jabolčnega soka na ta način pripravimo vzorec v treh paralalkah. Slepo probo (SP) pripravimo za vsak vzorec posebej tako, da v ependorfki zmešamo 120  $\mu\text{L}$  vzorca jabolčnega soka in 1,5 mL metanola. Vse vzorce pred merjenjem dobro premešamo, prelijemo v kivete in izmerimo absorbanco pri 517 nm po 15 minutah.

Izračun:

$$\Delta A = A_{RF} - A_{VZ} + A_{SP} \quad \dots(4)$$

$$n(\text{mol}) = \frac{\Delta A \cdot V_{\text{reakc.zmesi}}}{\varepsilon \cdot l} \quad \dots(5)$$

$$l = 1 \text{ cm}$$

$$\varepsilon = 12000 \text{ L} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$$

$$V_{\text{reakcijske zmesi}} = 1,62 \text{ mL} = 0,00162 \text{ L}$$

$$V_{\text{soka}} = 120 \mu\text{L} = 0,000120 \text{ L}$$

$$AOP = M_{DPPH} (\text{mmol} / \text{L}) = n(\text{mol}) \cdot 10^3 / V_{\text{soka}} \quad \dots(6)$$

### 3.2.4 Določanje skupnih fenolnih spojin

Ker je za fenolne spojine znano, da absorbirajo predvsem svetlobo UV spektra in vidnega spektra, lahko glede na izmerjeno vrednost absorbance pri ustrezni valovni dolžini določimo koncentracije skupnih fenolov poleg tega pa lahko še skupnih in obarvanih antocianov.

Skupne fenolne snovi smo določili z metodo po Singletonu in Rossiju. Folin-Ciocalteu (F.C.) kolorimetrija temelji na kemijski redukciji reagenta, ki je vodna raztopina volframovih in molibdenovih oksidov. Raztopina nereducirane oblike je rumene barve, produkt redukcije kovinskega oksida pa je modro obarvan in absorbira svetlobo pri 765 nm. Izmerjena absorbanca je premosorazmerna s koncentracijo fenolnih spojin v reakcijski zmesi. Pravilno determinacijo količine skupnih fenolnih spojin ovirajo snovi, kot so žveplov dioksid, askorbinska kislina, aromatični amini, sladkorji, organske kisline, nefenolne organske snovi. Z dodatkom natrijevega karbonata dobimo alkalni pH reakcijske zmesi. Ob redukciji volframata(VI) in molibdata(VI), ki poteče le v prisotnosti fenolatnega aniona, Folin-Ciocalteujev reagent oksidira fenolne snovi. Rezultat, ki ga dobimo z F.C. metodo, zajema mnogo različnih substanc (obširno skupino fenolnih spojin). Kot standard se uporablja galna kislina, saj je relativno poceni in stabilna v "suhi" obliki. Iz umeritvene krivulje odčitamo koncentracijo skupnih fenolnih spojin in rezultat izrazimo kot mg galne kisline/L (Košmerl in Kač, 2007).

#### Reagenti:

- Folin-Ciocalteujev reagent (F.C.) neposredno pred uporabo po navodilih proizvajalca razredčimo z deionizirano vodo v razmerju 1:2. Uporabili smo Merckov reagent,
- 20 % raztopina natrijevega karbonata ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ),
- galna kislina,
- deionizirana voda.

#### Aparatura in pribor:

- UV-VIS spektrofotometer,
- merilne bučke (100 mL),
- kivete (10 mm),
- pipete,
- puhalka z deionizirano vodo.

#### Izvedba analize:

##### a.) Priprava umeritvene krivulje

Za pripravo umeritvene krivulje smo uporabili galno kislino. Najprej smo pripravili izhodno raztopino tako, da smo zatehtali v 100 mL bučko 30 mg galne kisline in dopolnili do oznake z deionizirano vodo. Iz osnovne raztopine galne kisline smo z ustreznim razredčevanjem pripravili različne koncentracije standardnih raztopin galne kisline (3, 15, 30, 75, 150 mg/L galne kisline).

V plastično kiveto smo odpipetirali 200  $\mu\text{L}$  ustrezne koncentracije standardnih raztopin galne kisline, dodali 140  $\mu\text{L}$  Folin-Ciocalteu reagenta, raztopljenega v 2,4 mL vode ter 420  $\mu\text{L}$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$  in vsebino premešali. Po enourni inkubaciji na sobni temperaturi smo dodali 910  $\mu\text{L}$  vode, premešali in izmerili absorbanco pri 765 nm. Za slepo probo smo uporabili destilirano vodo. Iz izmerjenih absorbanca je računalniški program samodejno izrisal umeritveno krivuljo in izračunal enačbo umeritvene krivulje, ki jo potrebujemo kasneje za izračun koncentracije skupnih fenolov v jabolčnem soku.

##### b.) Določanje fenolnih spojin v vzorcu jabolčnega soka glede na umeritveno krivuljo

Postopek je enak kot pri pripravi umeritvene krivulje, le da v kiveto namesto 200  $\mu\text{L}$  raztopine galne kisline odpipetiramo 50  $\mu\text{L}$  jabolčnega soka in 150  $\mu\text{L}$  vode. Iz enačbe umeritvene krivulje (ob upoštevanju redčitve) je računalniški program samodejno izračunal koncentracijo skupnih fenolnih spojin v vzorcu, izraženo kot mg galne kisline/L. Absorbanca je premosorazmerna količini skupnih fenolov v vzorcu.

### 3.2.5 Zrelostni faktorji

#### 3.2.5.1 Določanje trdote mesa jabolk

Trdoto mesa jabolk Gala smo določali z mehanskim penetrometrom z ravnim nastavkom. Na vsakem plodu smo določili trdoto mesa na štirih mestih po predhodni odstranitvi kože, pri čemer je bil kot med sosednjima meritvama  $90^\circ$ . Meritve smo opravljali tako, da smo mehanski penetrometer ročno potiskali v plod, kateremu smo merili trdoto mesa. Rezultate smo podali v  $\text{kg}/\text{cm}^2$ .

#### 3.2.5.2 Določanje vsebnosti škroba

Rezine prečno prerezanih jabolk smo pomočili v 0,01 M raztopino jodovice. Intenzivnost modrega obarvanja je odvisna od količine škroba v plodu. Obarvanost površine smo po 10 minutah ocenili s pomočjo primerjalne skale z vrednostmi od 1 do 10 (škrobna lestvica EVROFRU), kjer vrednost 1 predstavlja 100 % škroba v plodu, vrednost 10 pa 0 % (škrob ni več prisoten, je razgrajen do sladkorjev).



Slika 9: Določanje vsebnosti škroba z jodovico (Evaluating fruit..., 2009)

#### 3.2.5.3 Določanje vsebnosti suhe snovi

Vsebnost suhe snovi smo določili z digitalnim refraktometrom direktno v iztisnjenem soku. Refraktometer smo umerili z destilirano vodo na 0,00 % suhe snovi. Nato smo na refraktometer kanili kapljico jabolčnega soka in odčitali rezultat v odstotkih suhe snovi.



#### 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

V preglednici 11 so zbrani rezultati (povprečne vrednosti in standardni odkloni) meritev suhe snovi, trdote, škrobnega indeksa, koncentracije amonijevih ionov, skupne koncentracije nitratnih in nitritnih ionov, v preglednici 12 pa so podane povprečne vrednosti in standardni odkloni meritev  $\delta^{13}\text{C}$  vrednosti v sladkorjih ter jabolčni pulpi,  $\delta^{15}\text{N}$  v pulpi, koncentracija skupnih fenolnih spojin ter AOP v vzorcih jabolk, gnojenih z organskimi ali mineralnimi gnojili v dveh odmerkih gnojil (60 kg N/ha in 120 kg N/ha).

Preglednica 11: Rezultati povprečnih vrednosti in standardnih odklonov meritev suhe snovi, trdote, škrobnega indeksa, koncentracije amonijevih ionov in skupne koncentracije nitratnih in nitritnih ionov v vzorcih jabolk

Vzorec	SS (%)	Trdota (kg/cm <sup>2</sup> )	Škrobni indeks	NH <sub>4</sub> -N (mg/L)	(NO <sub>2</sub> +NO <sub>3</sub> )-N (mg/L)
KON	12,1	7,16 ± 0,61	8,07 ± 1,2	8,50 ± 1,70	1,69 ± 0,83
GŽI 60	12,5	6,81 ± 0,49	9,00 ± 1,1	9,50 ± 0,29	1,00 ± 0,29
GŽI 120	12,2	7,01 ± 0,44	9,00 ± 0,9	11,1 ± 1,03	1,38 ± 0,14
BS 60	12,8	7,40 ± 0,63	8,43 ± 0,9	11,3 ± 1,73	0,88 ± 0,14
BS 120	11,9	7,29 ± 0,55	8,61 ± 0,6	11,2 ± 0,38	1,31 ± 0,63
AD 60	12,4	7,00 ± 0,62	8,89 ± 0,7	10,0 ± 1,73	1,00 ± 0
AD 120	11,7	6,83 ± 0,66	9,29 ± 0,8	10,4 ± 0,72	1,00 ± 0
KAN 60	11,7	7,28 ± 0,69	9,00 ± 0,9	10,0 ± 0,58	1,06 ± 0,13
KAN 120	12,0	7,25 ± 0,56	8,43 ± 1,1	10,6 ± 0,13	0,94 ± 0,13
UR 60	11,8	7,17 ± 0,53	8,93 ± 1,6	11,4 ± 1,45	1,94 ± 0,24
UR 120	11,9	7,00 ± 0,68	8,43 ± 1,5	11,8 ± 0,87	2,31 ± 0,24

Preglednica 12: Rezultati povprečnih vrednosti in standardnih odklonov meritev  $\delta^{13}\text{C}$  vrednosti v sladkorjih in jabolčni pulpi,  $\delta^{15}\text{N}$  v pulpi, koncentracija skupnih fenolnih spojin ter AOP v vzorcih jabolk

Vzorec	$\delta^{13}\text{C}$ slad. (‰)	$\delta^{13}\text{C}$ pulpa (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ pulpa (‰)	Skupni fenoli (mg/L)	AOP (mmol/L)
KON	-25,9 ± 0,1	-25,1 ± 0,7	4,3 ± 0,1	317 ± 30	0,775 ± 0,04
GŽI 60	-25,4 ± 0,2	-24,8 ± 1,3	4,4 ± 0,2	312 ± 91	0,633 ± 0,13
GŽI 120	-26,0 ± 0,0	-25,7 ± 0,2	3,3 ± 0,1	297 ± 28	0,506 ± 0,01
BS 60	-25,2 ± 0,1	-24,4 ± 1,1	3,8 ± 0,1	336 ± 80	0,683 ± 0,10
BS 120	-25,9 ± 0,3	-25,0 ± 0,2	4,2 ± 0,6	323 ± 31	0,494 ± 0,03
AD 60	-25,6 ± 0,5	-26,3 ± 0,3	3,8 ± 0,2	279 ± 94	0,683 ± 0,06
AD 120	-25,7 ± 0,3	-25,8 ± 1,0	2,8 ± 0,1	296 ± 35	0,636 ± 0,02
KAN 60	-26,1 ± 0,3	-24,5 ± 0,0	2,5 ± 0,1	242 ± 37	0,497 ± 0,03
KAN 120	-25,7 ± 0,2	-24,7 ± 0,4	3,3 ± 1,1	337 ± 47	0,523 ± 0,01
UR 60	-25,8 ± 0,1	-25,0 ± 1,3	3,2 ± 0,8	306 ± 25	0,484 ± 0,02
UR 120	-25,4 ± 0,3	-24,1 ± 1,3	5,0 ± 0,4	299 ± 29	0,508 ± 0,01

#### 4.1 REZULTATI MERJENJA $\delta^{13}\text{C}$ VREDNOSTI V JABOLČNEM SOKU

$\delta^{13}\text{C}$  vrednosti sladkorjev pri ekološko gnojenih jabolkih se gibljejo od -25,4 do -25,9 ‰, pri konvencionalnih pa med -25,4 in -26,1 ‰. Najnižjo  $\delta^{13}\text{C}$  vrednost sladkorjev v jabolkih konvencionalne pridelave imajo jabolka, gnojena s KANom (-26,1 ± 0,31 ‰), najvišjo pa jabolka, gnojena z UR (-25,4 ± 0,34 ‰). Med organskimi gnojili imajo najnižjo  $\delta^{13}\text{C}$  vrednost sladkorjev jabolka, gnojena z GŽI (-25,4 ± 0,22 ‰), najvišjo pa pri gnojilu BS (-25,2 ± 0,12 ‰). Negnojena jabolka imajo  $\delta^{13}\text{C}$  vrednost sladkorjev -25,9 ± 0,05 ‰. Če primerjamo  $\delta^{13}\text{C}$  vrednosti sladkorjev med obema odmerkoma gnojil (60 kg N/ha in 120 kg N/ha), vidimo, da so vrednosti podobne, zato ne moremo sklepati, da večji odmerek značilno vpliva na  $\delta^{13}\text{C}$  vrednost sladkorjev.

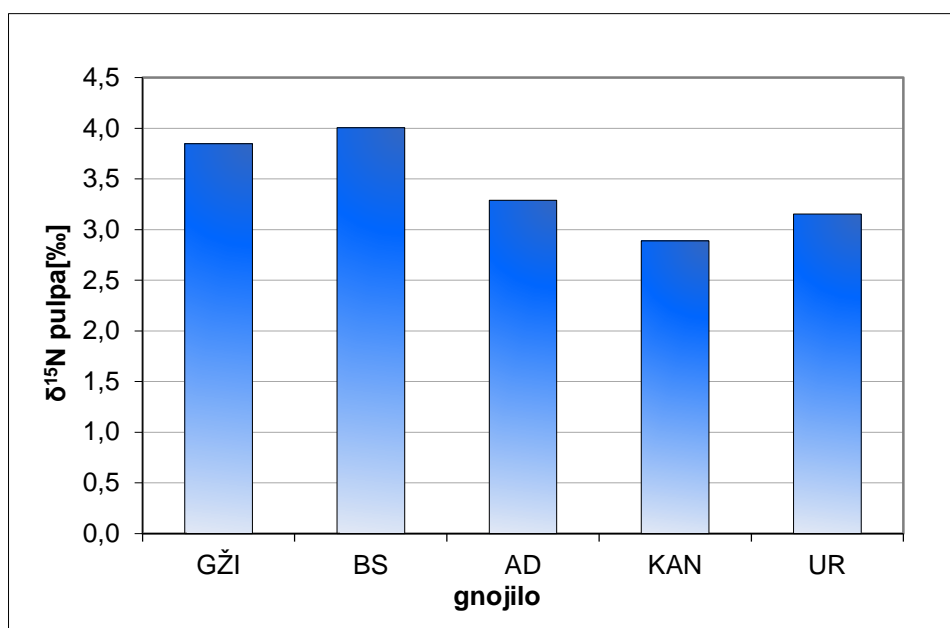
V jabolčni pulpi se  $\delta^{13}\text{C}$  vrednosti pri ekološko gnojenih jabolkih gibljejo med -24,4 in -25,7 ‰, pri konvencionalnih pa med -24,1 in -26,3 ‰. Med organsko pridelanimi jabolki dosegajo najnižje  $\delta^{13}\text{C}$  vrednosti pulpe jabolka, gnojena z gnojilom GŽI, najvišje pa jabolka, gnojena z BS. Jabolka konvencionalne pridelave imajo najnižjo vrednost  $\delta^{13}\text{C}$  v pulpi z gnojilom AD (-26,3 ± 0,3 ‰), najvišjo pa pri UR-i (-24,1 ± 1,3 ‰), medtem ko imajo negnojena jabolka vrednost  $\delta^{13}\text{C}$  v pulpi -25,1 ± 0,7 ‰. V jabolčni pulpi se  $\delta^{13}\text{C}$  vrednosti pri odmerku gnojila 60 kg N/ha gibljejo med -24,4 ‰ in -26,3 ‰, pri odmerku gnojila 120 kg N/ha pa med -24,1 ‰ in -25,8 ‰. Tudi za  $\delta^{13}\text{C}$  vrednosti v pulpi ne moremo trditi, da nanj vpliva odmerek gnojila. Kot je bilo pričakovati, razlika med  $\delta^{13}\text{C}$  vrednosti v jabolčni pulpi in sladkorjih, izoliranih iz jabolčnega soka, ne presega 2 ‰, kar je tipično za pristne sadne sokove.

Vrsta oz. tip gnojila ne vpliva na  $\delta^{13}\text{C}$  vrednost jabolk, saj imajo organska in mineralna gnojila enake  $\delta^{13}\text{C}$  vrednosti. Gnojenje z dušikom lahko vpliva na potek fotosinteze, neposredno vpliva na encim RuBisCo karboksilacijo in na njegovo diskriminacijo proti težjemu izotopu  $^{13}\text{C}$ . Rastline hitreje absorbirajo  $^{12}\text{C}$  in spremeni se izotopsko razmerje ogljika (Flores in sod., 2007; Rapisarda in sod., 2010). Izotopsko razmerje  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  je močno povezano s sorto rastline (Bizjak Bat in sod., 2012). Na  $\delta^{13}\text{C}$  vrednost vpliva tudi koncentracija atmosferskega  $\text{CO}_2$ , vlažnost tal in ostali okoljski dejavniki. Stopnja zrelosti ne vpliva na  $\delta^{13}\text{C}$  vrednost (Flores in sod., 2007).

$\text{C}_3$  rastline zajemajo vrednosti  $\delta^{13}\text{C}$  od -23 do -34 ‰, v povprečju okoli -27 ‰ (Pezdič, 1999). Naše vrednosti se gibljejo od -24,1 ‰ do -26,3 ‰, kar je v območju, značilnem za  $\text{C}_3$  rastline. Glede na  $\delta^{13}\text{C}$  vrednosti v pulpi lahko razlikujemo med načinom pridelave. Konvencionalna jabolka naj bi imela nižje  $\delta^{13}\text{C}$  vrednosti v pulpi kot ekološka (Bizjak Bat in sod., 2012). Naši rezultati temu nasprotujejo, kar lahko pojasnimo z dejstvom, da so nižje  $\delta^{13}\text{C}$  vrednosti v organskih jabolkih posledica večje mikrobiološke aktivnosti v ekološki pridelavi. Glede na  $\delta^{13}\text{C}$  vrednost ne moremo razlikovati med ekološko ali konvencionalno pridelanimi jabolki. S to trditvijo se strinjajo tudi Nakano in sod. (2003) ter Flores in sod. (2007) pri organsko in konvencionalno pridelanem paradižniku in popru.

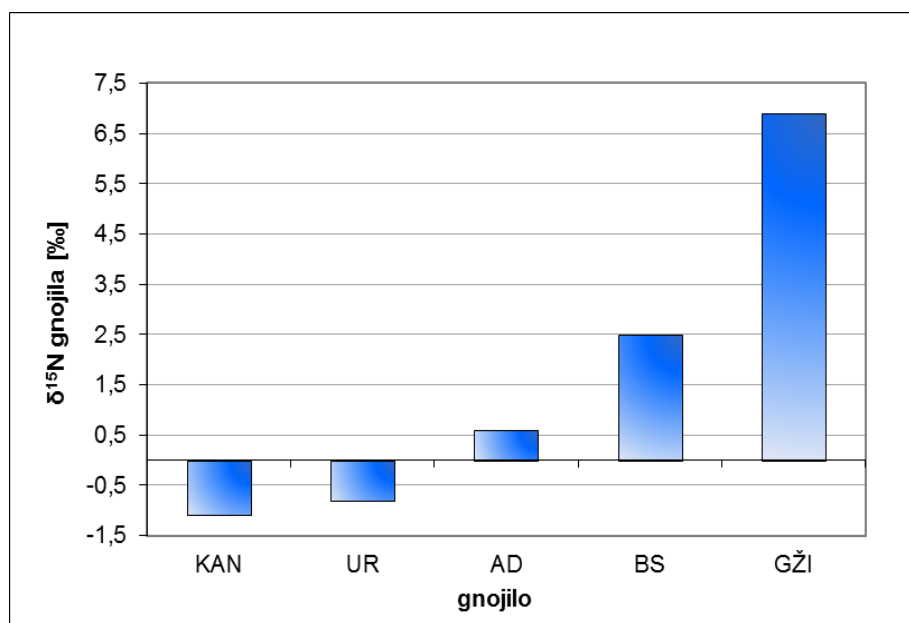
#### 4.2 REZULTATI MERJENJA $\delta^{15}\text{N}$ VREDNOSTI V JABOLČNI PULPI

$\delta^{15}\text{N}$  vrednosti v pulpi ekološko pridelanih jabolk zavzemajo vrednosti v večjem razponu od 3,3 do 4,4 ‰, pri konvencionalno pridelanih jabolkih pa so vrednosti nižje, od 2,5 do 3,8 ‰, izjema je pri gnojilu UR (120 kg N/ha), kjer  $\delta^{15}\text{N}$  vrednost izrazito izstopa ( $5,0 \pm 0,4$  ‰). Pri negnojenih jabolkih znaša  $\delta^{15}\text{N}$  vrednost  $4,3 \pm 0,1$  ‰. Iz naših rezultatov vidimo, da vrsta gnojila vpliva na izotopsko sestavo jabolk, kar prikazuje tudi slika 10. Jabolka, gnojena z organskimi gnojili, imajo višje  $\delta^{15}\text{N}$  vrednosti kot tista, gnojena z mineralnimi gnojili.



Slika 10: Povprečne  $\delta^{15}\text{N}$  vrednosti v pulpi jabolk, gnojenih z organskimi in mineralnimi gnojili

Glede na odmerek gnojila se pri dodanem 60 kg N/ha gibljejo vrednosti  $\delta^{15}\text{N}$  med 2,5 ‰ (gnojilo KAN) in 4,4 ‰ (gnojilo GŽI). Pri odmerku gnojila 120 kg N/ha dosežajo najnižjo  $\delta^{15}\text{N}$  vrednost pulpe jabolka, gnojena z AD ( $2,8 \pm 0,1$  ‰), najvišjo pa jabolka, gnojena z UReo, sledijo jabolka, gnojena z BS ( $4,2 \pm 0,6$  ‰). Glede na dobljene rezultate sklepamo, da količina dodanega gnojila ne vpliva na  $\delta^{15}\text{N}$  vrednosti v jabolkih, precej večji vpliv ima vrsta dodanega gnojila. Na sliki 11 so vidne razlike v  $\delta^{15}\text{N}$  vrednostih posameznih gnojil.



Slika 11: δ<sup>15</sup>N vrednosti organskih in mineralnih gnojil

Za razlikovanje med organsko in konvencionalno pridelanimi živali se uporablja razmerje <sup>15</sup>N/<sup>14</sup>N oz. δ<sup>15</sup>N vrednost. Mineralna dušikova gnojila imajo δ<sup>15</sup>N vrednosti od -2 do 2 ‰, organska pa znatno višje, od 10 do 20 ‰. Med procesom mineralizacije organske snovi se organska gnojila obogatijo s težjim izotopom (<sup>15</sup>N) zaradi izhlapevanja lažjega izotopa dušika (<sup>14</sup>N). Na vsebnost δ<sup>15</sup>N v rastlini ne vpliva le tip dodanega gnojila, pač pa tudi čas gnojenja, tip in vlažnost zemlje, predhodni posevki na tej zemlji (Bateman in sod., 2007). Ugotovili so, da pomaranče iz organske pridelave vsebujejo višje δ<sup>15</sup>N vrednosti v primerjavi s konvencionalno pridelanimi, verjetno zato, ker dodajanje organskih gnojil poveča vsebnost izotopa <sup>15</sup>N v zemlji in posledično se povečajo tudi δ<sup>15</sup>N vrednosti v sadju (Rapisarda in sod., 2005; Rapisarda in sod., 2010). Do enakih ugotovitev so prišli tudi Bizjak Bat in sod. (2012), ko so izmerili povprečne δ<sup>15</sup>N vrednosti od 1,9 do 3,8 ‰ v pulpi jabolok.

#### 4.3 AMONIJEVI IONI TER SKUPNA KONCENTRACIJA NITRATOV IN NITRITOV V JABOLČNEM SOKU

Pri organsko gnojenih jabolkih znašajo vrednosti amonijevih ionov v jabolčnem soku od 9,5 do 11,25 mg/L in skupna vsebnost nitrata in nitrita od 0,88 do 1,38 mg/L jabolčnega soka. Vrednosti amonijevih ionov so v konvencionalno gnojenih jabolkih podobne kot pri organskih in precej varirajo, od 10,0 do 11,75 mg/L, ravno tako skupna koncentracija nitratov in nitritov, ki so v razponu od 0,94 do 2,31 mg/L. Negnojena jabolka vsebujejo 8,5 ± 1,7 mg/L amonijevih ionov ter 1,69 ± 0,83 mg/L skupnih nitratov in nitritov.

Dušik je v gnojilih v amonijski (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) ali nitratni (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) obliki. Dušik (N) v mineralnih gnojilih je pogosto v obliki amoniaka in se v tleh zaradi bakterij pretvarja v nitratno obliko N, katero lahko rastline izkoristijo za rast in razvoj (Brown in sod., 1993). Motosugi in sod. (1995) so ugotovili, da amonijska oblika N zelo poveča vsebnost N v vseh delih jabolok in

zmanjša koncentracijo kalcija v tkivu plodov. Ugotovili so tudi, da amonijski N poveča vsebnost skupnih nitratov in aminokislin v jabolkih Fuji. Klein in Spieler (1987) temu nasprotujeta in trdita, da gnojenje z amonijsko obliko N ne poveča koncentracije amonijskih ionov v tleh in nima vpliva na kakovost sadja.

Veliko študij navaja, da več kot ima rastlina dostopnega dušika v tleh, več ga asimilira in posledica je večja vsebnost nitratov in nitritov v rastlini. Raziskave, ki so bile opravljene na korenju, so potrdile, da je korenje, ki je bilo gnojeno z organskimi gnojili, vsebovalo manj nitratov v primerjavi z mineralnimi gnojili. Vzrok je lahko manjša količina dušika v organskih gnojilih, ki je v obliki, ki je rastlinam težje dostopna (Bourn in Prescott, 2002). Tudi raziskave, opravljene na solati, navajajo, da je količina nitratov v solati, gnojeni z mineralnimi gnojili, tudi do dvakrat večja kot pri organsko gnojeni, zaradi večje dostopnosti dušika rastlinam v mineralnih gnojilih (Pavlou in sod., 2007).

Pri odmerku gnojila 60 kg N/ha znašajo vrednosti amonijskih ionov od  $9,50 \pm 0,29$  (GŽI) do  $11,4 \pm 1,45$  mg/L (UR) ter skupna koncentracija nitrata in nitrita od  $0,88 \pm 0,14$  (BS) do  $1,94 \pm 0,24$  mg/L jabolčnega soka (UR). Pri odmerku dodanega gnojila 120 kg N/ha so vrednosti amoniaka malo večje, in sicer od  $10,4 \pm 0,7$  do  $11,8 \pm 0,9$  mg/L, ravno tako pri skupnih nitratih in nitritih, ki so v razponu od  $0,94 \pm 0,13$  do  $2,31 \pm 0,24$  mg/L. V našem primeru smo opazili, da je pri manjšem odmerku gnojila (60 kg N/ha) vsebnost amonijskih ionov ter skupnih nitratov in nitritov v jabolčnem soku manjša kot pri večjem odmerku (120 kg N/ha).

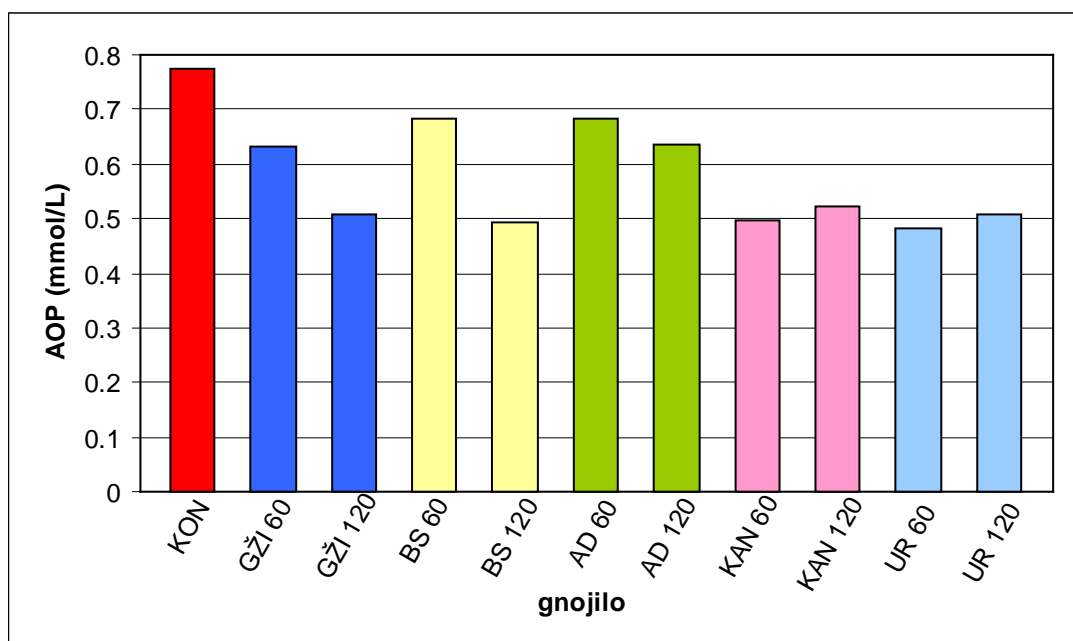
Vendar je vpliv vrste gnojila in odmerka na vsebnost amonija, skupnih nitratov in hranilno vrednost živil močno povezan z okoljskimi in klimatskimi razmerami, zato ne moremo trditi, da so rezultati iz ene lokacije nujno ponovljivi na drugi (Bourn in Prescott, 2002). Zhang in sod. (2011) so ugotovili, da se količina nitratov in nitritov v jabolkih spreminja z razvojem plodov. Količina nitratov se pred zorenjem poveča in nato z zorenjem plodov znatno zmanjša. Ravno tako je vsebnost nitratov in nitritov večja v mladem plodu kot pozneje v zrelih jabolkih.

Glede na dobljene rezultate ne moremo z zagotovostjo trditi, da vrsta gnojila značilno vpliva na količino N v obliki amonija ali nitratov in nitritov v jabolkih, saj smo v nekaterih jabolkih, pridelanih z organskim gnojilom, izmerili celo višje vrednosti amonijaka ter nitratov in nitritov kot pri mineralnih gnojilih.

#### 4.4 VREDNOSTI AOP V JABOLČNEM SOKU

Vrednosti AOP v jabolčnem soku so povprečje šestih meritev. Kontrolni vzorec (negnojeno) ima največji AOP, in sicer  $0,775 \pm 0,04$  mmol/L, med organskimi jabolki mu sledijo jabolka, gnojena z BS ( $0,683 \pm 0,10$  mmol/L), med konvencionalnimi pa jabolka, gnojena z AD z isto vrednostjo AOP. Najmanjši AOP imajo konvencionalno pridelana jabolka z UR ( $0,484 \pm 0,02$  mmol/L), pri organskih pa z BS ( $0,494 \pm 0,03$  mmol/L).

Glede na odmerek dodanega gnojila smo izmerili precej velike razlike v vrednostih AOP. Pri odmerku gnojila 60 kg N/ha smo izmerili najmanjšo vrednost AOP 0,484 mmol/L in največjo 0,683 mmol/L. Najmanjša vrednost AOP pri odmerku 120 kg N/ha je znašala 0,494 mmol/L, največja pa 0,636 mmol/L. Na sliki 12 vidimo, da so vsebnosti AOP pri odmerku gnojila 60 kg N/ha višje v primerjavi z odmerkom 120 kg N/ha pri istem gnojilu, razen pri KANu in URei so vrednosti primerljive. Dobljeni rezultati ne potrjujejo predvidenega vpliva gnojila na antioksidativni potencial.



Slika 12: Vrednosti AOP v jabolkih, gnojenih z organskimi in mineralnimi gnojili

Sintezo sekundarnih metabolitov v rastlini pospešijo stresne razmere (spremembe temperature, suša, škodljivci, pomanjkanje hranil). Ob napadu patogenov rastlina tvori naravne obrambne snovi, kot so polifenoli, antioksidanti. C/N ravnotežna teorija pravi, da kadar je dušik rastlinam dostopen v zadostnih količinah, rastline sintetizirajo N-vsebujoče spojine (proteini, aminokisliline, alkaloidi). Ob pomanjkanju dušika se metabolizem rastlin spremeni, tvorijo se C-vsebujoče spojine, kot so celuloza, škrob, sekundarni metaboliti (polifenoli, terpenoidi) (Brandt in Molgaard, 2001). Torej naj bi v organski pridelavi, kjer je ponavadi količina dušika omejena, rastline tvorile več C-vsebujočih spojin, med katere spadajo antioksidanti in ostali sekundarni metaboliti.

Rezultati številnih raziskav so si nasprotujoči. V literaturi zasledimo, da živila iz organske pridelave vsebujejo več polifenolov in imajo večji antioksidativni potencial (AOP). Vzrok je lahko večja izpostavljenost rastlin mikrobnemu napadu zaradi odsotnosti sintetičnih pesticidov ter posledično tvorba več naravnih obrambnih snovi. Hkrati je odziv rastline na način pridelave unikaten za vsako specifično vrsto in sorto rastline, kar nasprotuje prejšnji trditvi (Faller in Fialho, 2010). Paradižnikova mezga iz ekološke pridelave je vsebovala večje količine antioksidantov kot tista iz konvencionalne (Vallverdu-Queralt in sod., 2012). Bizjak Bat in sod. (2012) pa so ugotovili, da je AOP in količina skupnih fenolnih snovi v sadju ekološke ali konvencionalne pridelave enaka oz. se vrednosti ne razlikujejo glede na način pridelave. V našem primeru se vrednosti AOP v jabolkih, gnojenih z ekološkimi ali mineralnimi gnojili, ne razlikujejo. Niti vrsta niti različen odmerek gnojila nista znatno vplivala na AOP v jabolkih.

#### 4.5 REZULTATI DOLOČANJA SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN

Vsebnost skupnih fenolnih spojin (SFS) v jabolčnem soku smo določali v šestih paralelkah.

Iz rezultatov vidimo, da je vsebnost skupnih fenolnih spojin v jabolčnem soku v precej velikem razponu. Največjo koncentracijo skupnih fenolnih spojin glede na vrsto gnojila (organsko ali mineralno) imajo jabolka, gnojena s KANom (povprečno  $337 \pm 47,2$  mg/L), sledijo jim jabolka, gnojena z organskim gnojilom BS ( $336 \pm 79,8$  mg/L). Koncentracija skupnih fenolnih spojin v ekološko pridelanih jabolkih (uporabljena organska dušikova gnojila) se giblje v območju od 297 do 336 mg/L. Konvencionalno pridelana jabolka pa imajo vrednosti skupnih fenolnih spojin od 241 do 337 mg/L. Kontrolni vzorec (negnojena jabolka) vsebuje  $317 \pm 29,8$  mg/L skupnih fenolnih snovi.

Glede na odmerek dodanega gnojila znašajo pri odmerku 60 kg N/ha koncentracije SFS od 242 do 336 mg/L, pri odmerku 120 kg N/ha pa od 297 do 337 mg/L.

Številni genetski, okoljski in tehnološki dejavniki vplivajo na koncentracijo polifenolov v živilu. Različni kultivarji sadja se precej razlikujejo po vsebnosti polifenolov, zato moramo za povečanje SFS v sadnih sokovih izbrati ustrezne kultivarje (Gharras, 2009). Veberič in sodelavci (2005) so ugotovili, da kultivarji iz organske pridelave kažejo značilno večje vsebnosti skupnih fenolnih snovi, analiziranih v jabolčni pulpi, kot kultivarji integrirane pridelave ali odporni kultivarji. V nasprotju s tem Roussos in Gasparatos (2009) ter Bizjak Bat in sod. (2012) trdijo, da se vsebnost fenolnih snovi v jabolkih ekološke ali konvencionalne pridelave ne razlikuje. Razlike v vsebnosti fenolnih snovi so lahko posledica večje izpostavljenosti organsko pridelanih jabolk boleznim, škodljivcem, pomanjkanju hranil,... Iz naših rezultatov ne moremo sklepati, da vrsta gnojila vpliva na vsebnost fenolnih snovi.

#### 4.6 REZULTATI DOLOČANJA ZRELOSTNIH FAKTORJEV

Trdota mesa jabolk se glede na vrsto dodanega gnojila ne razlikuje veliko, malce večje vrednosti opazimo pri ekološko pridelanih jabolkih. Največjo trdoto imajo jabolka ekološke pridelave, gnojena z BS ( $7,40 \pm 0,63 \text{ kg/cm}^2$ ), med konvencionalno pridelanimi jabolki pa jabolka, gnojena s KANom ( $7,28 \pm 0,69 \text{ kg/cm}^2$ ). Najmanjšo trdoto imajo jabolka, gnojena z GŽI. Glede na odmerek gnojila imajo pri 60 kg N/ha največjo trdoto jabolka, gnojena z BS, najmanjšo pa tista, gnojena z GŽI. Pri odmerku 120 kg N/ha smo ponovno izmerili največjo trdoto pri jabolkih, gnojenih z BS, najmanjšo pa pri jabolkih, gnojenih z AD.

Vrsta gnojila ali odmerek ne kažeta značilnega vpliva na trdoto jabolk. Na trdoto jabolk vplivajo rastni in genetski dejavniki, stopnja zrelosti plodov, sestava celične stene, vsebnost pektinov, sladkorjev itd. Z zorenjem se trdota plodov zmanjšuje. Večja jabolka naj bi imela manjšo čvrstost plodov.

Škrobni indeks se med posameznimi vzorci jabolk bistveno ne razlikuje. Največji škrobni indeks imajo jabolka, gnojena z AD ( $9,29 \pm 0,8$ ), najmanjšega pa kontrolni vzorec (negnojena jabolka) ( $8,07 \pm 1,2$ ). Ne moremo trditi, da vrsta gnojila ali odmerek dodanega gnojila vplivajo na razgradnjo škroba. Stopnja razgradnje škroba je odvisna predvsem od sorte in stopnje zrelosti plodov. Pri vseh jabolkih se je večina škroba pretvorila v sladkorje.

Največjo vsebnost suhe snovi imajo jabolka, gnojena z BS, najmanjšo pa jabolka, gnojena z UReo in KANom. Pri uporabi organskih gnojil zaznamo rahlo povečano vsebnost suhe snovi kot pri mineralnih gnojilih.

Mnogi znanstveniki so opazili, da vsebujejo organsko pridelana živila večjo vsebnost suhe snovi kot konvencionalno pridelana (Herencia in sod., 2007; Herencia in sod., 2011; Bourn in Prescott, 2002). Prekomerno gnojenje naj bi povzročilo hitro rast, poveča se pridelek, vendar deloma zaradi večje vsebnosti vode v plodovih. Manjša vsebnost dušika v organski pridelavi vpliva na sintezo snovi v rastlini. Zmanjša se sinteza molekul, bogatih z dušikom (aminokislina, proteini), poveča pa se sinteza polifenolov, celuloze, škroba, kar vodi v povečano vsebnost suhe snovi (Herencia in sod., 2011).



## 5 SKLEPI

Iz rezultatov analiz za ugotavljanje vpliva gnojenja z organskimi in mineralnimi gnojili na izotopsko in kemijsko sestavo jabolk lahko povzamemo naslednje sklepe:

- Trdota plodov jabolk znaša od 6,82 do 7,40 kg/cm<sup>2</sup> in se ne razlikuje med ekološko in konvencionalno pridelanimi jabolki. Tudi glede na odmerek dodanega gnojila se vrednosti ne razlikujejo. Vrsta in odmerek dodanega gnojila ne vplivata na trdoto plodov.
- Vrednosti suhe snovi znašajo od 11,7 do 12,8 %. Največjo vsebnost suhe snovi smo izmerili pri jabolkih, gnojenih z BS (organsko), najmanjšo pa pri gnojilu KAN in AD (mineralni gnojili). Pri uporabi organskih gnojil zaznamo rahlo povečano vsebnost suhe snovi kot pri mineralnih gnojilih.
- Stopnja razgradnje škroba je odvisna predvsem od sorte in stopnje zrelosti plodov. Škrobni indeks od 8,07 do 9,29 dokazuje, da se je večina škroba v jabolkih pretvorila v sladkorje.
- Vsebnost amonijevih ionov in skupna vsebnost nitratov in nitritov v jabolkih se spreminja z razvojem plodov in je odvisna od okoljskih in klimatskih razmer. Mnoge raziskave navajajo, da je količina nitratov v živilih, gnojenih z mineralnimi gnojili, večja kot pri organsko gnojenih zaradi večje dostopnosti dušika rastlinam v mineralnih gnojilih. Kontrolni vzorec jabolk (negnojena) vsebuje najmanjšo koncentracijo amonijevih ionov ( $8,5 \pm 1,7$  mg/L). Pri organsko in mineralno gnojenih jabolkih se vsebnosti N v obliki amonija gibljejo od 9,5 do 11,8 mg/L, skupna vsebnost nitratov in nitritov pa od 0,88 do 2,31 mg/L. Pri manjšem odmerku gnojila (60 kg N/ha) je vsebnost amonijevih ionov ter nitratov in nitritov v jabolčnem soku manjša kot pri večjem odmerku (120 kg N/ha). Rezultati nakazujejo, da vrsta gnojila ali odmerek vplivata na vsebnost dušikovih ionov v obliki amoniaka ali nitratov in nitritov v jabolkih. Kljub temu pa ne moremo z gotovostjo določiti vpliv organskega oziroma mineralnih gnojil na vsebnost amonija ali nitratov in nitritov v jabolkih.
- $\delta^{13}\text{C}$  vrednosti v sladkorjih so nižje kot v jabolčni pulpi. Pri ekološko gnojenih jabolkih se  $\delta^{13}\text{C}$  vrednosti gibljejo od -25,4 do -25,9 ‰ v sladkorjih in od -24,4 do -25,7 ‰ v jabolčni pulpi, pri konvencionalnih pa so vrednosti med -25,4 in -26,1 ‰ v sladkorjih in med -24,1 in -26,3 ‰ v pulpi.  $\delta^{13}\text{C}$  vrednosti sladkorjev in pulpe so podobne med obema odmerkoma gnojil (60 kg N/ha in 120 kg N/ha), zato ne moremo sklepati, da večji odmerek značilno vpliva na  $\delta^{13}\text{C}$  vrednost.
- $\delta^{15}\text{N}$  vrednosti v pulpi jabolk, gnojenih z organskimi gnojili, zavzemajo vrednosti od 3,3 do 4,4 ‰, pri mineralno gnojenih jabolkih pa so vrednosti nižje, od 2,5 do 3,8 ‰, izjema je pri gnojilu URea (120 kg N/ha), kjer  $\delta^{15}\text{N}$  vrednost izrazito izstopa ( $5,0 \pm 0,4$  ‰). Našo hipotezo smo potrdili, da imajo jabolka, gnojena z organskimi gnojili, višje  $\delta^{15}\text{N}$  vrednosti kot tista, gnojena z mineralnimi gnojili. Dodajanje organskih

gnojil poveča vsebnost izotopa  $^{15}\text{N}$  v zemlji in posledično se povečajo tudi  $\delta^{15}\text{N}$  vrednosti v sadju.

- AOP organsko gnojenih jabolok znaša od 0,198 do 0,273 nmol/mL, pri mineralno gnojenih pa od 0,194 do 0,273 nmol/mL. V našem primeru se vrednosti AOP v jabolkih, gnojenih z ekološkimi ali mineralnimi gnojili, ne razlikujejo. Niti vrsta niti različen odmerek gnojila nista znatno vplivala na AOP v jabolkih.
- Vsebnosti fenolnih snovi v jabolkih ekološke ali konvencionalne pridelave se ne razlikujejo. Koncentracija skupnih fenolnih spojin v organsko gnojenih jabolkih se giblje v območju od 297 do 336 mg/L, mineralno gnojena jabolka pa imajo vrednosti SFS od 241 do 337 mg/L. Kontrolni vzorec (negnojena jabolka) vsebuje  $317 \pm 30$  mg/L skupnih fenolnih snovi. Iz naših rezultatov ne moremo potrditi, da vrsta gnojila ali odmerek dodanega gnojila vplivata na vsebnost fenolnih snovi. S tem zanikamo postavljeno hipotezo, da kultivarji iz organske pridelave kažejo značilno večje vsebnosti skupnih fenolnih snovi.

## 6 POVZETEK

Zdrava prehrana je osnova za ohranjanje zdravja človeka. Na kakovost živil pomembno vpliva način pridelave. Vse bolj se uveljavlja ekološka pridelava sadja in zelenjave. Zaradi občutno višje cene ekoloških živil obstaja nevarnost napačnega označevanja izdelkov kot »ekološka«, vendar to niso. Zato potekajo številne raziskave pri odkrivanju metod za ločevanje izdelkov med ekološkimi in konvencionalnimi pridelki, da bi preprečili oškodovanje potrošnikov.

Namen diplomskega dela je bil ugotoviti, ali obstajajo razlike med jabolki sorte Gala, gnojenimi z organskimi in mineralnimi gnojili. Eksperimentalni poskus je bil izveden na posestvu Kompoš, Pod bloki, Fakultete za kmetijske in biosistemske vede Univerze v Maribor v letu 2011. Študijo smo opravili na 11 vzorcih jabolk sorte Gala (vsak vzorec v dveh paralelkah, torej skupno 22 vzorcev). Šest vzorcev jabolk je bilo gnojenih z mineralnimi dušikovimi gnojili, štiri vzorci z organskimi dušikovimi gnojili, en vzorec pa je bil negojen in je služil kot kontrolni vzorec. Pri vseh vzorcih so bila gnojila dodana v dveh odmerkih: 60 kg N/ha in 120 kg N/ha.

Najprej smo določili zrelostne faktorje. Plodovom jabolk smo izmerili trdoto, nato pa jabolka prerezali in izmerili vsebnost škroba. Preostanek plodov smo iztisnili in jabolčni sok uporabili za nadaljne analize. Z refraktometrom smo določili vsebnost suhe snovi. Med kemijskimi parametri smo določali vsebnost skupnih fenolnih spojin, antioksidativni potencial jabolk, vsebnost amonija ter skupno vsebnost nitratov in nitritov. Za določitev vsebnosti dušikovih in ogljikovih izotopov v iztisnjem jabolčnem soku smo uporabili masni spektrometer za analitiko stabilnih izotopov (IRMS – angl. Isotope Ratio Mass Spectrometry). Izmerili smo vrednosti  $\delta^{13}\text{C}$  v sladkorjih in pulpi jabolk ter vrednosti  $\delta^{15}\text{N}$  v jabolčni pulpi.

Skupne fenolne snovi smo določili s Folin-Ciocalteujevim reagentom in izmerili absorbanco pri 765 nm. Biosinteza fenolnih snovi v rastlini je močno povezana s sorto, načinom gnojenja, temperaturo, svetlobo in sezonskimi variacijami. Razlike v vsebnosti fenolnih snovi so lahko posledica večje izpostavljenosti organsko pridelanih jabolk boleznim, škodljivcem, pomanjkanju hranil. Vsebnost skupnih fenolnih snovi se je gibala med 242 do 337 mg/L in se ni razlikovala med organsko in mineralno gnojenimi jabolki. Iz naših rezultatov ne moremo sklepati, da vrsta ali odmerek gnojila vplivata na vsebnost fenolnih snovi.

Literatura navaja, da živila iz organske pridelave vsebujejo več polifenolov in imajo večji antioksidativni potencial. To je lahko posledica večje izpostavljenosti rastlin mikrobnemu napadu zaradi odsotnosti sintetičnih pesticidov ter posledično tvorba več naravnih obrambnih snovi. Fenoli v kožici jabolk značilno prispevajo k antioksidativnemu potencialu jabolk, manj fenoli v mesu (pulpi). V našem primeru se vrednosti AOP, izmerjene s prostim radikalom DPPH<sup>•</sup> v jabolkih, gnojenih z ekološkimi ali mineralnimi gnojili, ne razlikujejo.

Pri povečanem gnojenju z dušikom se praviloma povečuje vsebnost nitrata v rastlinah. Pri tem ni razlike, ali nitrat izvira iz mineralnih ali organskih gnojil. Količina nitratov se pred zorenjem poveča in nato z zorenjem plodov zmanjšuje.

V našem primeru smo opazili, da je pri manjšem odmerku gnojila (60 kg N/ha) vsebnost N v obliki amonijevih ionov ter skupna vsebnost nitratov in nitritov v jabolčnem soku manjša kot pri večjem odmerku (120 kg N/ha). Vendar zaradi raznolikih rezultatov ne moremo z gotovostjo trditi, da je vsebnost N v obliki amonijevih, nitratnih in nitritnih ionov v jabolkih odvisna od vrste ali odmerka gnojila.

Izmerjene  $\delta^{13}\text{C}$  vrednosti se gibljejo od -24,1 ‰ do -26,3 ‰, kar je značilno za  $\text{C}_3$  rastline. Vrsta oz. tip gnojila ne vpliva na  $\delta^{13}\text{C}$  vrednost jabolk, saj imajo organska in mineralna gnojila enake  $\delta^{13}\text{C}$  vrednosti. Zato  $\delta^{13}\text{C}$  vrednost ni uporaben parameter za razlikovanje med ekološko ali konvencionalno pridelanimi jabolki.

Uporaba dušik vsebujočih gnojil ima velik vpliv na pridelek, na vrednost  $\delta^{15}\text{N}$  rastlin ter na vsebnost dušika in vrednost  $\delta^{15}\text{N}$  v tleh. V procesu nastajanja komposta amoniak hitreje izhlapeva pri lažjem izotopu  $^{14}\text{N}$ , zato so  $\delta^{15}\text{N}$  vrednosti komposta in ostalih naravnih gnojil bistveno višje kot vrednosti  $\delta^{15}\text{N}$  v sintetičnih gnojilih. Zato lahko to razliko v vrednostih  $\delta^{15}\text{N}$  izrabimo za razlikovanje med ekološko in konvencionalno pridelavo.

$\delta^{15}\text{N}$  vrednosti v pulpi jabolk, gnojenih z organskimi gnojili, zavzemajo vrednosti od 3,3 do 4,4 ‰, pri mineralno gnojenih jabolkih pa so vrednosti nižje, od 2,5 do 3,8 ‰. Pri negnojenih jabolkih znaša  $\delta^{15}\text{N}$  vrednost  $4,3 \pm 0,1$  ‰. Jabolka, gnojena z organskimi gnojili, imajo višje  $\delta^{15}\text{N}$  vrednosti kot tista, gnojena z mineralnimi gnojili.  $\delta^{15}\text{N}$  vrednosti v jabolčni pulpi so tako edini parameter, ki nam pomaga pri razlikovanju med uporabo sintetičnih in organskih gnojil.

## 7 VIRI

- Abram V., Baričevič D. 2006. Fenolne spojine v začimbah in zeliščih. V: Karcinogene in antikarcinogene komponente v živilih. 24. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 9. in 10. november 2006. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 127-136
- Aminot A., Kirkwood D.S., Kerouel R. 1997. Determination of ammonia in seawater by the indophenol-blue method: Evaluation of the ICES NUTS I/C 5questionnaire. *Marine Chemistry*, 56: 59-75
- Aoki T., Fukuda S., Hosoi Y., Mukai H. 1997. Rapid flow injection analysis method for successive determination of ammonia, nitrite and nitrate in water by gas-phase chemiluminescence. *Analytica Chimica Acta*, 349: 11-16
- Bateman A.S., Kelly S.D., Jickells T.D. 2005. Nitrogen isotope relationship between crops and fertilizer: Implication for using nitrogen isotope analysis as an indicator of agricultural regim. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 14: 5760-5765
- Bateman A.S., Kelly S.D., Woolfe M. 2007. Nitrogen isotope composition of organically and conventionally grown crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 2664-2670
- Bavec M. 2001. Ekološko kmetijstvo. Ljubljana, ČZD Kmečki glas: 448 str.
- Bizjak Bat K., Vidrih R., Nečemer M., Mozetič Vodopivec B., Mulič I., Kump P., Ogrinc N. 2012. Characterization of Slovenian apples with respect to their botanical and geographical origin and agricultural production practice. *Food Technology and Biotechnology*, 50, 1: 107-116
- Boyer R. 2005. Temelji biokemije. Ljubljana, Študentska založba: 634 str.
- Bourn D., Prescott J. 2002. A comparison of the nutrition value, sensory qualities, and food safety of organically and conventionally produced food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42, 1: 1-34
- Brandt K., Molgaard J.P. 2001. Organic agriculture: does it enhance or reduce the nutritional value of plant foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81: 924-931
- 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
- Breas O., Renieri F., Serrini G. 1994. Isotope ratio mass spectrometry: Analysis of wines from different European countries. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 8, 12: 967-970

- Brown J.R., Christy M., Smith G.S. 1993. G9804, Nitrate in soils and plants. University of Missouri: 6 str.  
<http://extension.missouri.edu/xplor/agguides/agchem/g09804.htm> (27.08.2012)
- Caf A., Brence A. 2010. Ekološko sadjarstvo – zakaj pa ne? Novo Mesto, Kmetijsko gozdarska zbornica Slovenije, Kmetijsko gozdarski zavod Novo Mesto: 2 str.  
<http://www.kmetijskizavod-nm.si/file/967/download/1131> (21.08.2012)
- Choi W.J., Ro H.M., Hobbie E.A. 2003. Patterns of natural <sup>15</sup>N in soils and plants from chemically and organically fertilized uplands. *Soil Biology & Biochemistry*, 35: 1493-1500
- Cigić B., Rudan Tasič D. 2006. Antioksidanti in prooksidanti. V: Karcinogene in antikarcinogene komponente v živilih. 24. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 9. in 10. november 2006. Gašperlin L., Žlender B. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 103-115
- Clark J. 2000. The mass spectrometer. Cambridge, Chemguide: 7 str.  
<http://www.chemguide.co.uk/analysis/masspec/howitworks.html> (11.02.2013)
- Craig H. 1957. Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for mass spectrometric analysis of carbon dioxide. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 12: 133-149
- Demšar J. 2003. Zmanjševanje vsebnosti nitrata v aeroponsko gojeni solati (*Latuca sativa* Varsity) s prilagajanjem koncentracije hranilne raztopine svetlobnim razmeram. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 6-28
- Dermastia M. 2007. Pogled v rastline. Ljubljana, Nacionalni inštitut za biologijo: 130 str.
- Ehleringer J.R., Epstein S. 2001. C3 and C4 photosynthesis. V: *Encyclopedia of global environmental change*. Mooney H.A., Canadell J. (eds.). New York, Wiley: 186-190
- Engel M.H., Macko S.A. 1993. *Organic geochemistry: Principles and applications*. New York, London, Plenum Press: 861 str.
- Evaluating fruit for harvest. 2009. *The English Apple Man*, 4, 4<sup>th</sup> September: 3 str.  
[http://www.theenglishappleman.com/journal\\_090904.asp](http://www.theenglishappleman.com/journal_090904.asp) (12.04.2012)
- Falkowski P.G. 2003. Biogeochemistry of primary production in the sea. V: *Biogeochemistry: Treatise on geochemistry*. Vol. 8. Schlesinger W.H., Holland H.D. Turekian K.K. (eds.). Oxford, Elsevier, Pergamon Oxford: 185-213
- Faller A.L.K., Fialho E. 2010. Polyphenol content and antioxidant capacity in organic and conventional plant foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23: 561-568

- Farquhar G. D., Ehleringer J.R., Hubick K.T. 1989. Carbon isotope discrimination. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 40: 503-537
- Flores P., Fenoll J., Hellín P. 2007. The feasibility of using  $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{13}\text{C}$  values for discriminating between conventionally and organically fertilized pepper (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 14: 5740-5745
- Georgi M., Voerkeliu S., Rossmann A., Graßmann J., Schnitzler W.H. 2005. Multielement isotope ratios of vegetables from integrated and organic production. *Plant and Soil*, 275: 93-100
- Gharras H.E. 2009. Polyphenols: food sources, properties and applications - a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 44: 2512-2518
- 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
- Gvozdenović D. 1989. Od obiranja sadja do prodaje. Ljubljana, ČZP Kmečki glas: 10-81
- Herencia J.F., Ruiz-Porrás J.C., Melero S., Garcia-Galavis P.A., Morillo E., Maqueda C. 2007. Comparison between organic and mineral fertilization for soil fertility levels, crop macronutrient concentration, and yield. *Agronomy Journal*, 99: 973-983
- Herencia J.F., Garcia-Galavis P.A., Dorado J.A.R., Maqueda C. 2011. Comparison of nutritional quality of the crops grown in an organic and conventional fertilized soil. *Scientia Horticulturae*, 129: 882-888
- Hoehn E., Gasser F., Guggenbuhl B., Kunsch U. 2003. Efficacy of instrumental measurements for determination of minimum requirements of firmness, soluble solids and acidity of several apple varieties in comparison to consumer expectations. *Postharvest Biology and Technology*, 27, 1: 27-37
- Hribar J. 1990. Metode za določanje časa obiranja in vpliv obiranja na obstojnost plodov v skladišču. *Sad: revija za sadjarstvo, vinogradništvo in vinarstvo*, 9: 11-12
- Hribar J., Simčič M. 2000. Antioksidanti v sadju in vrtninah. V: *Antioksidanti v živilstvu*. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 151-158
- Hribar J., Zlatič E. 2006. Flavonoidi sadja in zelenjave kot antikancerogene komponente. V: *Karcinogene in antikarcinogene komponente v živilih*. 24. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 9. in 10. november 2006. Gašperlin L., Žlender B. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 157-163
- Janković P. 1990. Gala – novozelandska sorta jabolok. *Sad: revija za sadjarstvo, vinogradništvo in vinarstvo*, 9: 8-11

- Kaplan N., Margaritz M. 1986. A nitrogen-isotope study of the sources of nitrate contamination in groundwater of the Pleistocene coastal plain aquifer, Israel. *Water Research*, 20, 2: 131-135
- Kendall C. 1998. Tracing nitrogen sources and cycling in catchments. V: *Isotope tracers in catchment hydrology*. Kendall C., McDonnell J.J. (eds.). Amsterdam, Elsevier Science Publishers B.V.: 519-576
- Keuc Z. 1995. Vpliv nitratov na prenatalni in zgodnji razvoj človeka. *Okolje: slovenski ekološki glasnik: revija za ekološka vprašanja*, 3, 1/2: 24-27
- Klein I., Spieler G. 1987. Fertilization of apple with nitrate or ammonium nitrogen under drip irrigation. II. Nutrient distribution in the soil. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 18, 3: 323-339
- Kmiecik W., Lisiewska Z., Slupski J. 2004. Effects of freezing and storing of frozen products on the content of nitrates, nitrites, and oxalates in dill (*Anethum graveolens* L.). *Food Chemistry*, 86: 105-111
- Košir I. J. 2001. Karakterizacija vin z NMR spektroskopijo visoke ločljivosti. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 17-30
- Košmerl T., Kač M. 2007. Osnovne kemijske in senzorične analize mošta in vina: laboratorijske vaje za predmet Tehnologija vina. 3. izd., popravljena in dopolnjena. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 106-106
- Krišković P. 1989. Biološko pridelovanje hrane. Ljubljana, ČZD Kmečki glas: 217 str.
- Leskošek M. 1993. Gnojenje. Ljubljana, ČZD Kmečki glas: 45-46
- Lind K., Lafer G., Schloffer K., Innerhofer G., Meister H. 2001. Ekološko sadjarstvo. Ljubljana, ČZD Kmečki glas: 314 str.
- Martin G.J. 1990. The chemistry of chaptalization. *Endeavour*, 14, 3: 137-143
- 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: 182 str.
- Mindell E. 2001. Vitaminska biblija za novo tisočletje. Ljubljana, Mladinska knjiga: 422 str.
- Molyneux P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakar Journal of Science and Technology*, 26, 2: 211-219



- Motosugi H., Gao Y.P., Sugiura A. 1995. Rootstock effect on fruit quality of Fuji apples grown with ammonium or nitrate nitrogen in sand culture. *Scientia Horticulturae*, 61: 205-214
- Nakano A., Uehara Y., Yamauchi A. 2003. Effect of organic and inorganic fertigation on yields,  $\delta^{15}\text{N}$  values and  $\delta^{13}\text{C}$  values of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Saturn). *Plant Soil*, 255, 1: 343-349
- O'Leary M.H. 1988. Carbon isotopes in photosynthesis. *BioScience*, 38, 5: 328-326
- Oms M.T., Cerda A., Cerda V. 1995. Sequential injection analysis of nitrites and nitrates. *Analytica Chimica Acta*, 315: 321-330
- Pavlou G.C., Ehaliotis C.D., Kavvadias V.A. 2007. Effect of organic and inorganic fertilizers applied during successive crop seasons on growth and nitrate accumulation in lettuce. *Scientia Horticulturae*, 111: 319-325
- Peirs A., Scheerlinck N., Perez A.B., Jancsok P., Nicolai B.M. 2002. Uncertainty analysis and modelling of the starch index during apple fruit maturation. *Postharvest Biology and Technology*, 26: 199-207
- Pezdič J. 1999. Izotopi in geokemijski procesi: univerzitetni učbenik. Ljubljana, Naravoslovnotehniška fakulteta, Oddelek za geologijo: 269 str.
- Pitts M., Drake S., Cavalieri R. 1997. Apple size and length of storage affects firmness. Wenatchee, Department of Biological Systems Engineering, Washington State University: 9 str.  
<http://postharvest.tfrec.wsu.edu/pages/PC97D> (avgust 2012)
- Rapisarda P., Calabretta M.L., Romano G., Intrigliolo F. 2005. Nitrogen metabolism components as a tool to discriminate between organic and conventional citrus fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 7: 2664-2669
- Rapisarda P., Camin F., Fabroni S., Perini M., Torrisi B., Intrigliolo F. 2010. Influence of different organic fertilizers on quality parameters and the  $\delta^{15}\text{N}$ ,  $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^2\text{H}$ ,  $\delta^{34}\text{S}$ , and  $\delta^{18}\text{O}$  values of orange fruit (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 6: 3502-3506
- Rembialkowska E. 2007. Quality of plant products from organic agriculture. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87: 2757-2762
- Repič P., Bavec M., Štabuc Starčević D., Vučko I. 2005. Dovoljena sredstva za ekološko kmetijstvo 2005. Maribor, Fakulteta za kmetijstvo, Inštitut za kontrolo in certifikacijo v kmetijstvu: 119 str.

- Rietjens I.M.C.M., Boersma M.G., Haan L., Spenkelink B., Awad H.M., Cnubben N.H.P., Zanden J.J., Woude H., Alink G.M., Koeman J.H. 2002. The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 11: 321-333
- 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, 11: 4078-4083
- Roussos P.A., Gasparatos D. 2009. Apple tree growth and overall fruit quality under organic and conventional orchard management. *Scientia Horticulturae*, 123: 247-252
- SAHRA. 2005. Isotopes and hydrology: Nitrogen. Tucson, SAHRA – Sustainability of semi-Arid Hydrology and Riparian Areas: 5 str.  
<http://cierzo.sahra.arizona.edu/programs/isotopes/nitrogen.html> (06.04.2012)
- Sancin V. 1988. Sadje z našega vrta. Trst, Založništvo tržaškega tiska: 376 str.
- Sofos J.N., Raharjo S. 1995. Curing agents. V: Food additive toxicology. Maga J.A., Tu A.T. (eds.). New York, Marcel Decker, Inc.: 235-267
- Sutherland R.A., Van Kessel C., Farrell R.E., Pennock D.J. 1993. Landscape-scale variations in plant and soil nitrogen-15 natural abundance. *Soil Science Society of America Journal*, 57, 1: 169-178
- Štampar F., Lešnik M., Veberič R., Solar A., Koron D., Usenik V., Hudina M., Osterc G. 2009. Sadjarstvo. 2. dop. izd. Ljubljana, ČZD Kmečki glas: 416 str.
- Šturm M., Lojen S. 2010. Izotopska sestava dušika v ekološko in konvencionalno pridelani zelenjavi na slovenskem trgu. V: Novi izzivi v poljedelstvu 2010. Zbornik simpozija, Rogaška Slatina, 2. in 3. december 2010. Kocjan A.D., Čeh B. (ur.). Ljubljana, SAD-Slovensko agronomsko društvo: 232-238
- Uno G., Storey R., Moore R. 2001. Principles of botany. New York, The McGraw-Hill Companies: 240-249
- Vallverdu-Queralt A., Medina-Remon A., Casals-Ribes I., Lamuela-Raventos R.M. 2012. Is there any difference between the phenolic content of organic and conventional tomato juices. *Food Chemistry*, 130: 222-227
- Van der Merwe N. 1982. Carbon isotopes, photosynthesis and archaeology. *American Scientist*, 70: 596-606
- Veberič R., Trobec M., Herbinger K., Hofer M., Grill D., Stampar F. 2005. Phenolic compounds in some apple (*Malus domestica* Borkh) cultivars of organic and integrated production. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85: 1687-1694

- Vidrih R., Kač M. 2000. Analitika antioksidantov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 101-114
- Virginia R.A., Delwiche C.C. 1982. Natural  $^{15}\text{N}$  abundance of presumed  $\text{N}_2$ -fixing and non-  $\text{N}_2$ -fixing plants from selected ecosystems. *Oecologia*, 54: 317-325
- Viršček Marn M., Stopar M. 1998. Sorte jabolk. Ljubljana, Kmečki glas: 211 str.
- Vrhovšek U. 2001. Flavonoidi kot predstavniki antioksidantov. V: Funkcionalna hrana. 21. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 8. in 9. november 2001. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 97-106
- Walters C.L. 1996. Nitrate and nitrite in foods. V: Nitrates and nitrites in food and water. Hill M.J. (ed.). Cambridge, Woodhead Publishing Limited: 93-111
- Zhang L., Zhu S., Chen C., Zhou J. 2011. Metabolism of endogenous nitric oxide during growth and development of apple fruit. *Scientia Horticulturae*, 127: 500-506
- Žigon D. 1994. Hibridni večsektorski masni spektrometer. *Vakuumist*, 14, 3: 4-9

## ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Rajku Vidrihu in somentorici prof. dr. Nives Ogrinc za strokovno pomoč, vodenje in potrpežljivost pri izdelavi diplomskega dela.

Za opravljeno recenzentsko delo se zahvaljujem prof. dr. Tatjani Košmerl.

Hvala tudi osebju na Odseku za znanosti o okolju Instituta »Jožefa Stefana« v Podgorici ter zaposlenim na Katedri za tehnologije, prehrano in vino Oddelka za živilstvo za tehnično pomoč pri izvajanju praktičnega dela v laboratoriju, še posebej Sonji Čerpič.

Zahvaljujem se tudi Karmen Bizjak Bat za koristne nasvete ter pomoč pri laboratorijskih analizah.

Hvala Lini Burkan Makivić, univ dipl. inž. živ. tehnol., za pomoč pri urejanju literature.

Zahvaljujem se tudi vsem ostalim, ki ste mi kakorkoli pomagali pri nastanku diplomskega dela.

Mojim staršem, mami Mariji in očetu Jožetu, sestrama Gabrijeli in Lidiji, ker ste mi stali ob strani, me spodbujali in podpirali med celotnim študijem, prav tako hvala.

Hvala tudi tebi Peter, ker me sprejemaš tako kot sem. Z mano si bil v svetlih in temnih trenutkih, me spodbujal in mi nesebično pomagal.