

**Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije  
Slovenian Institute of Hop Research and Brewing**

# **Hmeljarski bilten Hop Bulletin**

**ISSN za tiskano izdajo 0350-0756**

**ISSN za spletno izdajo 2536-1988**

**27(2020)**



**Žalec 2020**

**Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije**  
**Slovenian Institute of Hop Research and Brewing**

# **Hmeljarski bilten**

# **Hop Bulletin**

**27(2020)**



**Žalec, 2020**

## Hmeljarski bilten / Hop Bulletin

ISSN za tiskano izdajo 0350-0756

ISSN za spletno izdajo 2536-1988

**Izdaja /** Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS) /  
**Issued by** Slovenian Institute of Hop Research and Brewing (IHPS)  
Cesta Žalskega tabora 2, 3310 Žalec, Slovenija / Slovenia

**Urednika /** dr. **Barbara Čeh** in dr. **Boštjan Naglič**  
**Editors**

**Uredniški odbor /** dr. **Barbara Čeh** (IHPS), izr. prof. dr. **Andreja Čerenak** (IHPS), prof. dr.  
**Editorial board** **Anton Ivančič** (redni profesor v pokoju / retired professor), izr. prof. dr. **Jernej Jakše** (Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani / University of Ljubljana, Biotechnical Faculty – BF UL), prof. dr. **Branka Javornik** (redna profesorica v pokoju / retired professor), dr. **Josef Ježek** (Hop Research Institute, Žatec, Czech Republic), doc. dr. **Iztok Jože Košir** (IHPS), doc. dr. **Rok Mihelič** (BF UL), dr. **Boštjan Naglič** (IHPS), prof. dr. **Martin Pavlovič** (IHPS in Fakulteta za kmetijstvo in biosistemske vede Univerze v Mariboru / IHPS and Faculty of Agriculture and Life Sciences University of Maribor), dr. **Sebastjan Radišek** (IHPS), dr. **Magda Rak Cizej** (IHPS), dr. **Elisabeth Seigner** (Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft / Bavarian State Research Center for Agriculture, Freising, Germany), dr. **Siniša Srečec** (Visoko gospodarsko učilište u Križevcima, Hrvaška / College of Agriculture at Križevci, Croatia), prof. dr. **Anton Tajnšek** (redni profesor v pokoju / retired professor), prof. dr. **Dominik Vodnik** (BF UL)

**Naslov uredništva,** Cesta Žalskega tabora 2, SI-3310 Žalec, Slovenija / Slovenia;  
**politika /** e-pošta / e-mail: barbara.ceh@ihps.si  
**Editorial office and**

**policy** Člani uredniškega odbora so tudi recenzenti prispevkov. Prispevki so najmanj dvojno recenzirani. Za jezikovno pravilnost odgovarjajo avtorji. S poslanim člankom se avtorji strinjajo za tiskano in spletno objavo revije. / Articles are reviewed and revised. Authors are fully responsible for linguistic structure of the text. By sending an article, the authors agree for the online and printed publication of the journal.

**Recenzenti** v tej številki izven uredniškega odbora:  
**Reviewers** outside the Editorial Board for this number:

**Marjeta Eržen** (IHPS), dr. **Tanja Guček** (IHPS), dr. **Zala Kolenc** (Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Mariboru / Faculty of Chemistry and Chemical Engineering of the University of Maribor), dr. **Anita Kušar** (Inštitut za nutricionistiko / Nutrition Institute), **Lucija Luskar** (IHPS), dr. **Miha Ocvirk** (IHPS), **Monika Oset Luskar** (IHPS)

**Domača stran /** <http://www.ihps.si/raziskave-in-razvoj/publikacije/hmeljarski-bilten/>  
**Home page**

**Bilten zajemajo /** COBISS, CABI Publishing, EBSCO Publishing  
**Indexed and**

**abstracted by**

**Tisk / Printed by** Grafika Gracer d.o.o.

**Avtorske pravice /** © 2020 Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije /  
**Copyright** © 2020 Slovenian Institute of Hop Research and Brewing

**Izdajo sofinancira Agencija za raziskovalno dejavnost RS. /**  
**The issue was financially supported by the Slovenian Research Agency.**

## VSEBINA / CONTENTS

Tanja GUČEK, Jernej JAKŠE in Sebastjan RADIŠEK <b>Primerjava metod za izolacijo RNA z namenom določanja viroidov v hmelju z RT-PCR in RT-qPCR</b> Comparison of RNA extraction kits for detection of hop viroids with RT-PCR and RT-qPCR.....	5
Martin PAVLOVIČ, Viljem PAVLOVIČ, Boštjan NAGLIČ in Barbara ČEH <b>Vpliv vremenskih dejavnikov na vsebnost alfa-kislin v storžkih hmelja</b> The impact of weather conditions on hop alpha-acid content .....	22
Martin PAVLOVIČ, Manja KUMER, Karmen PAŽEK in Andreja ČERENAK <b>Modelno vrednotenje žlahtniteljske kakovosti križancev hmelja</b> Model evaluation of breeding and market quality of hop hybrids.....	30
Magda RAK CIZEJ in Franček POLIČNIK <b>Primerjava feromonskih in svetlobnih vab za spremljanje koruzne vešče (<i>Ostrinia nubilalis</i> Hübner)</b> Comparison of pheromone and light traps for European corn borer ( <i>Ostrinia nubilalis</i> Hübner) monitoring .....	42
Barbara ČEH, Sebastjan RADIŠEK, Bojan ČREMOŽNIK in Andrej ŠUŠEK <b>Vpliv apnenega dušika na rast in razvoj hmelja, reakcijo tal in talno mikrofloro</b> Influence of calcium cyanamide on growth and development of hop, soil reaction and soil microflora.....	56
Janja ZULE in Ema FABJAN <b>Uporabnost hmeljevine za proizvodnjo celuloznih vlaken in papirja</b> Use of hop biomass for production of cellulose fibers and paper .....	73
Lucija LUSKAR in Barbara ČEH <b>Dinamika in razporeditev temperature v kompostnih kupih iz hmeljevine</b> Dynamics and distribution of the temperature in hop biomass compost piles .....	84
Zala KOLENC in Urban BREN <b>Antibakterijski učinki hmelja</b> Antibacterial activities of hops.....	100

Petra TERPINC

**Usoda fenolnih spojin med proizvodnjo piva**

Fate of phenolic compounds during beer production ..... 112

Iztok Jože KOŠIR in Nataša KOČAR MLINARIČ

**Effect of substitutes for barley malt on chemical-physical and sensorial characteristics of beer**

Vpliv nadomestkov ječmenovega slada na kemijsko-fizikalne in senzorične lastnosti piva ..... 128

Petra TERPINC in Helena ABRAMOVIČ

**Effect of phenolic compounds extracted from *Camelina sativa* oil on oxidative stability of lipid system**

Učinek fenolnih spojin ekstrahiranih iz olja *Camelina sativa* na oksidativno stabilnost lipidnega sistema ..... 139

Tadej PERŠAK, Ivan PAHOLE in Simon KLANČNIK

**Optična analiza semen industrijske konoplje**

Optical analyses of industrial hemp seeds ..... 149

Richwell ALUFASI, Silvija ZEMAN, Tanja BAGAR and  
Walter CHINGWARU

***Cannabis sativa* L. and its potential applications in environmental bioremediation. A review.**

*Cannabis sativa* L. in njena potencialna uporaba za bioremediacijo okolja. Pregledni članek ..... 161

Marjeta ERŽEN, Samo KREFT in Andreja ČERENAK

**Kanabigerol (CBG) v konoplji (*Cannabis sativa* L.) in njegovi pozitivni učinki na zdravje**

Cannabigerol (CBG) in hemp (*Cannabis sativa* L.) and its positive effects on health ..... 173

Nataša FERANT in Barbara ČEH

**Vpliv lokacije pridelovanja navadnega ožepka (*Hyssopus officinalis* L.) na pridelek in vsebnost eteričnega olja**

The impact of production location on hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) yield and essential oil content ..... 181

Maja DOBRAJC, Stanislav TRDAN, Jernej JAKŠE in Sebastjan RADIŠEK

**Interakcije med viroidi in žuželkami**

Viroid-insect interactions ..... 190

## PRIMERJAVA METOD ZA IZOLACIJO RNA Z NAMENOM DOLOČANJA VIROIDOV V HMELJU Z RT-PCR IN RT-qPCR

Tanja GUČEK<sup>1</sup>, Jernej JAKŠE<sup>2</sup> in Sebastjan RADIŠEK<sup>3</sup>

Izvirni znanstveni članek / original scientific article

Prispelo / received: 25. 10. 2020

Sprejeto / accepted: 11. 11. 2020

### Izvleček

Za določanje viroidov v hmelju rutinsko uporabljamo metodi RT-PCR in RT-qPCR (RT-PCR v realnem času), ki omogočata hitro, zanesljivo in občutljivo detekcijo. Glavno težavo pri določanju viroidov predstavlja izolacija RNA, ki lahko zaradi nizke koncentracije viroida ali prisotnosti PCR inhibitorjev povzroči lažno negativne rezultate. Za določanje viroidov v hmelju smo primerjali šest komercialno dostopnih kompletov reagentov za izolacijo RNA (Sigma-Aldrich TRIzol, Spectrum™ Plant Total kit, New England Biolabs (NEB) Monarch Total RNA Miniprep kit, Macherey-Nagel (MN) NucleoSpin® RNA Plus kit, Bioline ISOLATE II RNA Plant Kit, Qiagen RNeasy® Plant Mini Kit) in »hišno« metodo za izolacijo celokupnih nukleinskih kislin s CTAB reagentom. Primerjali smo okužene (CBCVd + HLVD) in neokužene rastline hmelja, različna tkiva (liste in storžke) ter različne načine homogenizacije (uporaba stiskalnice in terilnice). Vzorcem smo izmerili koncentracijo in jih analizirali z RT-PCR in RT-qPCR metodama. Z RT-PCR smo najmočnejše signale zaznali po CTAB izolaciji. V primeru uporabe komercialno dostopnih reagentov, smo izolirali le RNA in z RT-qPCR vzorce z uporabo Qiagen, NEB in MN kompletov, pomnožili brez nespecifičnih signalov. Za manj občutljivo določanje viroidov z RT-PCR je uporaba CTAB izolacije zadostna, v primeru vzorcev z nižjimi koncentracijami viroida pa se priporoča uporaba komercialno dostopnih reagentov.

**Ključne besede:** izolacija RNA, viroidi, hmelj, RT-PCR, RT-qPCR

<sup>1</sup> Dr., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Oddelek za varstvo rastlin, Cesta Žalskega tabora 2, 3310 Žalec, e-naslov: tanja.gucek@ihps.si

<sup>2</sup> Prof. dr., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana, e-naslov: jernej.jakse@bf.uni-lj.si

<sup>3</sup> Dr., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Oddelek za varstvo rastlin, Cesta Žalskega tabora 2, 3310 Žalec, e-naslov: sebastjan.radisek@ihps.si

## COMPARISON OF RNA EXTRACTION KITS FOR DETECTION OF HOP VIROIDS WITH RT-PCR AND RT-qPCR

### Abstract

RT-PCR and RT-qPCR (real-time RT-PCR) methods are routinely used to determine viroids in hops, allowing rapid, reliable, and sensitive detection. The main limitation is RNA isolation, which can result in false negative results, due to low viroid concentration or the presence of PCR inhibitors. Six commercial RNA extraction reagents (Sigma-Aldrich TRIzol, Spectrum™ Plant Total kit, New England Biolabs (NEB) Monarch Total RNA Miniprep kit, Macherey-Nagel (MN) NucleoSpin® RNA Plus kit, Bioline ISOLATE II RNA Plant Kit, Qiagen RNeasy® Plant Mini Kit) and total nucleic acids isolation method using CTAB reagent were compared for their ability to extract hop viroids. Infected (CBCVd + HLVD) and healthy hop plants, different tissue (leaves and cones) and homogenization methods (use of press and mortar) were tested. The concentration of the samples was measured and analyzed by RT-PCR and RT-qPCR. With RT-PCR, the strongest signals were detected after CTAB isolation. In the case of the use of commercial extraction kits, only RNA was isolated, and samples isolated with Qiagen, NEB and MN kits, were amplified by RT-qPCR without non-specific signals. For less sensitive determination of viroids by RT-PCR, the use of CTAB isolation is sufficient. While in the case of testing samples with lower viroid concentrations, the use of commercially available reagents is recommended.

**Key words:** RNA isolation, viroids, hops, RT-PCR, RT-qPCR

### 1 UVOD

Hmelj je gostitelj štirih viroidov, ki so kljub svoji preprosti strukturi lahko zelo agresivne patogene RNA molekule, ki vodijo tudi do odmrtnosti rastline (Jakše in sod., 2015). Viroidna RNA ne vsebuje zapisa za proteine, a vseeno vsebuje strukturne elemente, ki omogočajo razmnoževanje, gibanje po rastlini in zmožnost, da se izognejo obrambnemu odzivu gostitelja (Daros, 2016). Viroidi, ki okužijo hmelj, so hmeljev latentni viroid (HLVD), viroid zakrnelosti hmelja (HSVD), viroid razpokanosti skorje agrumov (CBCVd) in viroid grbavosti jabolk (AFCVd) (Jakše in sod., 2015; Puchta in sod., 1988; Sano in sod., 2004; Sasaki in Shikata, 1977). Bolezenska znamenja okužbe s CBCVd obsegajo zakrnelost rastlin, krajšanje in zbitost vmesnih členov trt in stranskih poganjkov, predčasno cvetenje, pokanje trt, deformacije listov in suho trohno korenike (Jakše in sod., 2015). Razvoj bolezenskih znamenj je odvisen od sorte hmelja, razvojne faze rastline, vpliva okolja in kombinacije več sočasno prisotnih viroidov. Okužene rastline niso ozdravljive, zato jih je potrebno uničiti in hkrati z ustreznimi ukrepi poskrbeti, da se širjenje bolezni čim bolj omeji (Guček, 2020).

Za uspešno zajezeitev širjenja bolezni so ključne zanesljive metode določanja viroidov. Ker viroidi po rastlinah niso enakomerno razporejeni in se njihova koncentracija zelo spreminja, je optimizacija metod za njihovo določanje zelo zahtevna (Malfitano in sod., 2005; Palacio-Bielsa in sod., 1999). Za določanje viroidov v hmelju so najpogosteje v uporabi PAGE, hibridizacija točkovnega odtisa (dot-blot) in reverzni prepis z verižno reakcijo s polimerazo v enem koraku (RT-PCR) (Guček in sod., 2017), za občutljivejšo določanje pa se uporablja tudi RT-PCR v realnem času (RT-qPCR) (Matoušek in sod., 2017; Seigner in sod., 2020).

Kljub številnim izboljšavam glede občutljivosti in cene RT-PCR in RT-qPCR metod, predstavljaja glavno težavo izolacija nukleinskih kislin, ki je velikokrat časovno preobsežna, prezahtevna in cenovno neugodna (Palacio-Bielsa in sod., 1999). Kakovost končnih rezultatov je pogojena s količino in kakovostjo izoliranih nukleinskih kislin. Zmanjšana občutljivost PCR reakcij zaradi prisotnosti inhibitorjev, kot so polisaharidi, sekundarni metaboliti in polifenoli, lahko vodi v lažno negativne rezultate (Bernad in Duran-Vila, 2006; Kunta in sod., 2007). Vpliv izolacije na določanje nizkega števila tarče mora biti čim manjši, zato je izbor ustrezne metode izolacije, kot so uporaba izbranih kemikalij za čiščenje, kolone na osnovi silikatov, magnetne kroglice, liofilizacija in druge, ključen dejavnik (Mirmajlessi in sod., 2015). Kljub številnim poskusom izolacije virusne in viroide RNA iz rastlinskih tkiv (Faggioli in sod., 1998; Sipahioglu in sod., 2007; Paylan in sod., 2014; Umana in sod., 2013; Arruabarrena in sod., 2016), univerzalne metode, ki bi izločila vse inhibitorje, še niso odkrili.

Ne glede na vse mora biti metoda izolacije cenovno ugodna, enostavna, primerna za rutinsko uporabo z različnimi rastlinskimi vzorci in z minimalno možnostjo kontaminacij. Učinkovita metoda izolacije v kombinaciji s hitro in občutljivo diagnostično metodo omogoča zanesljivo določanje viroidov (Guček in sod., 2017). Z namenom izbora zanesljive, hitre in cenovno ugodne izolacije nukleinskih kislin iz hmelja za določanje z RT-PCR in RT-qPCR smo na različnih vzorcih hmelja testirali sedem načinov izolacij.

## 2 MATERIAL IN METODE

Izolacijo smo izvajali na okuženih (CBCVd + HLVd) in neokuženih (brez-virusnih in brez-viroidnih, BVV) rastlinah hmelja, pri čemur so vzorci predstavljali tri različne tipe tkiv: mladi listi, stari listi in storžki. Vzorcem smo izmerili koncentracijo in jih analizirali z RT-PCR in RT-qPCR.



## 2.1 Rastlinski material in vzorčenje

V poskus smo vključili rastline hmelja sorte Celeia, ki so bile okužene s CBCVd in HLVD, ter neokužene rastline hmelja sorte Bobek, ki so bile v predhodnih testiranjih potrjene kot BVV. Rastline smo vzgajali v rastni komori pri temperaturi 25 °C v času osvetljevanja (13 h) in 18 °C v času teme (11 h).

Za analizo smo uporabili sveže tkivo, tako da smo ločeno vzorčili 3-4 mlade (najmanjši svetlozeleni listi) in 3-4 starejše liste (večji že porumeneli listi) hmelja. Za testiranje smo uporabili tudi zamrznjene storžke hmelja sorta Celeia, ki so bili okuženi s CBCVd in HLVD, in pred analizo hranjeni pri -70 °C. Pri vsaki izolaciji nukleinskih kislin smo analizirali štiri vzorce (v treh ponovitvah) in negativno kontrolo izolacije (NKI, brez tkiva):

- Vzorec 1: sveži mladi listi hmelja sorte Celeia okuženega s CBCVd + HLVD
- Vzorec 2: sveži stari listi hmelja sorte Celeia okuženega s CBCVd + HLVD
- Vzorec 3: zamrznjeni storžki hmelja sorte Celeia okuženega s CBCVd + HLVD
- Vzorec 4: sveži listi BVV hmelja sorte Bobek
- NKI: negativna kontrola izolacije

## 2.2 Izolacija RNA in celokupnih nukleinskih kislin (TNA)

Izolacijo RNA smo izvedli z uporabo šestih komercialno dostopnih kompletov reagentov, celokupnih nukleinskih kislin pa s CTAB postopkom. Pri izolaciji RNA smo uporabili kolone na osnovi silikatov (razen pri TRIzol), na katere se RNA veže in očisti z uporabo specifičnih pufrov. Razlika med posameznimi izolacijami je bila v sestavi uporabljenih pufrov, času in hitrosti centrifugiranja ter korakih čiščenja, pri enem je bila dodana tudi encimska razgradnja DNA. Zaradi omejitve kolon se RNA izolira iz manjših količin (do 100 mg), zato smo tkivo hmelja (listi ali storžki) homogenizirali v terilnicah, pri CTAB izolaciji (100 mg) pa v stiskalnici z avtomatsko pipeto (Meku, Nemčija). Za pripravo reagentov smo uporabili vodo tretirano z DEPC (Sigma-Aldrich) in v vseh korakih uporabljali zaščitne rokavice, da smo preprečili prisotnost RNaz. Izolirano RNA smo shranili pri -70 °C. Pri delu smo uporabljali namizno centrifugo 5427 R (Eppendorf).

### 2.2.1 Izolacija celokupnih nukleinskih kislin z uporabo CTAB reagenta

Tkivo hmelja (100 mg) smo zmleli z uporabo stiskalnice z avtomatsko pipeto (Meku, Nemčija). Celokupne nukleinske kisline (v nadaljevanju TNA, ang. total nucleic acids) smo iz hmelja izolirali z uporabo CTAB reagenta kot že predhodno

opisano (Kump in Javornik, 1996) z manjšimi modifikacijami (Pokorn, 2017). TNA smo raztopili v 50  $\mu$ l TE pufra (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0).

### **2.2.2 Izolacija RNA z uporabo TRIzol reagenta**

Tkivo hmelja (100 mg) smo v terilnici homogenizirali v 500  $\mu$ l TRIzol reagenta. Vzorcju smo dodali 150  $\mu$ l kloroforma, ga premešali, na sobni temperaturi (ST) inkubirali 30 min in centrifugirali 15 min na 12.000 rpm pri 4 °C. Supernatant (200  $\mu$ l) smo prenesli v novo mikrocentrifugirko, dodali 200  $\mu$ l 2-propanola in 20  $\mu$ l 3M natrijevega acetata, ter 1 uro inkubirali pri -20 °C. Vzorec smo ponovno centrifugirali 15 min na 12.000 rpm pri 4 °C, supernatant odlili, dodali 500  $\mu$ l 70 % (v/v) etanola in premešali. Etanol smo odstranili in TNA raztopili v 50  $\mu$ l vode brez RNaz (ang. RNase-free Water, Sigma-Aldrich).

### **2.2.3 Izolacija RNA s Spectrum™ Plant Total RNA Isolation Kit (Sigma)**

Izolacijo celokupne RNA smo izvedli s komercialno dostopnim kompletom Spectrum™ Plant Total RNA Isolation Kit (SPT, Sigma-Aldrich), po A protokolu (Jakše in sod., 2015). Vzorec (do 100 mg) smo zdrobili z uporabo terilnice in priloženega pufra. Po čiščenju smo RNA iz kolone sprali s 50  $\mu$ l »Elution solution« s centrifugiranjem 1 min pri 12.000 rpm na 4 °C.

### **2.2.4 Izolacija RNA z Monarch Total RNA Miniprep kit (NEB)**

Z uporabo Monarch Total RNA kita smo vzorec (do 100 mg) v terilnici homogenizirali v 800  $\mu$ l »DNA/RNA Protection Reagent«, centrifugirali 2 min pri 16.000 g na ST in supernatant odpipetirali v novo mikrocentrifugirko. Vzorcju smo dodali enak volumen »RNA Lysis Buffer«, dobro premešali in odpipetirali v kolono za odstranitev DNA (ang. rDNA removal column), centrifugirali 30 s pri 16.000 g na ST in kolono zavrgli. Vzorcju smo dodali enak volumen 95 % (v/v) etanola, ga premešali s pipetiranjem in prenesli v kolono za čiščenje RNA (ang. RNA purification column). Vzorec smo centrifugirali 30 s pri 16.000 g na ST in RNA očistili v treh korakih, s 500  $\mu$ l »RNA Priming Buffer« in dvakrat s 500  $\mu$ l »RNA Wash Buffer«, z vmesnim centrifugiranjem 30 s pri 16.000 g na ST. RNA smo sprali s 50  $\mu$ l vode brez nukleaz (ang. Nuclease free water) s centrifugiranjem 1 min pri 16.000 g na ST. Zaradi omejenega števila kolon smo vzorce analizirali v dveh ponovitvah.

### **2.2.5 Izolacija RNA z RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen)**

Za izolacijo RNA z RNeasy® Plant Mini Kit smo tkivo hmelja (do 100 mg) v terilnici homogenizirali v 450  $\mu$ l »RLT Buffer«, dobro premešali in prenesli v kolono »QIAshredder spin column«. Vzorec smo centrifugirali 2 min pri 12.700

rpm na ST in 500 µl supernatanta prenesli v novo mikrocentrifugirko ter mu dodali 250 µl 100 % (v/v) etanola. Vzorec smo dobro premešali, odpipetirali v kolono »RNeasy spin column« in centrifugirali 15 s pri 12.000 rpm na ST. RNA smo očistili v treh korakih, tako da smo v kolono odpipetirali 700 µl »RW1 Buffer« in dvakrat 500 µl »RPE Buffer«, z vmesnim centrifugiranjem 15 s pri 12.000 rpm na ST. Kolono smo na koncu še dodatno posušili s centrifugiranjem in RNA sprali s 50 µl vode brez RNaz s centrifugiranjem 1 min pri 12.000 rpm na ST.

### **2.2.6 Izolacija RNA z NucleoSpin® RNA Plus kit (MN)**

Za izolacijo RNA z NucleoSpin® RNA Plus kitom smo vzorec (do 100 mg) v terilnici homogenizirali v 500 µl »Buffer LBP«, ga prenesli v kolono za odstranitev genomske DNA (ang. NucleoSpin gDNA Removal Column) in centrifugirali 1 min pri 11.000 g na ST. Kolono smo zavrgli in vzorcu dodali 150 µl »Binding Solution BS«, dobro premešali in odpipetirali v kolono za čiščenje RNA (ang. NucleoSpin RNA Plus Column). Vzorec smo centrifugirali 30 s pri 11.000 g na ST in RNA očistili v treh korakih, z 200 µl »Buffer WB1«, 600 µl in 250 µl »Buffer WB2« in vmesnim centrifugiranjem 30 s pri 11.000 g na ST. RNA smo sprali z vodo brez RNaz v dveh korakih po 30 µl in centrifugiranjem 2 min pri 11.000 g na ST.

### **2.2.7 Izolacija RNA z ISOLATE II RNA Plant Kit (Bioline)**

S kompletom ISOLATE II RNA Plant Kit smo ob izolaciji RNA še dodatno očistili z encimsko razgradnjo DNA. Tkivo hmelja (do 100 mg) smo v terilnici homogenizirali v 350 µl »Buffer RLY« in 3,5 µl β-merkaptioetanol. Vzorec smo prenesli v kolono »ISOLATE II Filter« in centrifugirali 1 min pri 11.000 g na ST. Supernatant smo odpipetirali v novo mikrocentrifugirko, mu dodali 350 µl 70 % (v/v) etanola, ga dobro premešali in odpipetirali v kolono »ISOLATE II RNA Plant Column«. Vzorec smo centrifugirali 30 s pri 11.000 g na ST, v kolono odpipetirali 350 µl »Membrane Desalting Buffer« in s ponovnim centrifugiranjem posušili membrano. Razgradnjo DNA smo izvedli z dodatkom 95 µl »DNase mixa« (100 µl encima Dnase I + 900 µl Reaction Buffer for DNase I) in 15 min inkubiranjem na ST. RNA smo nato očistili v treh korakih, z 200 µl »Wash Buffer RW1«, 600 µl in 250 µl »Wash Buffer RW2« in vmesnim centrifugiranjem 30 s pri 11.000 g na ST. RNA smo sprali s 30 µl vode brez RNaz s centrifugiranjem 1 min pri 11.000 g na ST. Zaradi omejenega števila kolon smo vzorce analizirali v dveh ponovitvah.

### **2.2.8 Meritve koncentracije nukleinskih kislin**

Za merjenje koncentracije TNA in RNA smo uporabili fluorometer Qubit 3.0 (Thermo Fisher Scientific, ZDA) z ustreznim kompletom reagentov Qubit dsDNA BR Assay kit za DNA in Qubit RNA BR Assay kit za RNA, glede na navodila

proizvajalca. Fluorometer ne omogoča meritev čistosti RNA (razmerje absorbanca), zato so podani samo rezultati za koncentracijo.

### 2.3 RT-PCR in agarozna gelska elektroforeza

Obratno prepisovanje in PCR smo izvajali v enem koraku (RT-PCR) s kompletom One Step RT-PCR (Qiagen) v inštrumentu Mastercycler nexus GSX1 (Eppendorf). Pred analizo smo izolirano RNA redčili v vodi brez RNaz (10-krat za RT-PCR, 100-krat za RT-qPCR), da bi preprečili vpliv inhibitorjev. Z RT-PCR smo s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi ločeno analizirali prisotnost HLVd in CBCVd v vzorcih hmelja kot predhodno opisano v Guček in sod. (2019). Namnožene produkte smo analizirali na 2 % agaroznem gelu v 1x TBE pufuru obarvanem z etidijevim bromidom (0,5 µg/ml) in detektirali z UV lučjo (Syngene, ZDA). Pogoji med elektroforezo so bili naslednji: 160 V in 180 mA.

### 2.4 RT-qPCR za sočasno določanje viroidov (mRT-qPCR)

Obratno prepisovanje in PCR v realnem času smo izvajali v enem koraku (RT-qPCR) s kompletom SensiFAST™ Probe No-ROX Kit (Bioline) in encimom reverzno transkriptazo MultiScribe Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) v inštrumentu LightCycler96 (Roche). Z RT-qPCR smo sočasno (mRT-qPCR) analizirali prisotnost CBCVd in HLVd v vzorcih hmelja, v kombinaciji s HSVd, ki je občasno lahko prisoten, kot predhodno opisano v Guček (2020). Ker so bili vsi vzorci na HSVd negativni, rezultati za HSVd niso prikazani. Za mejno vrednost smo pri CBCVd uporabili  $C_q = 29$ , pri HLVd pa  $C_q = 31$  (Guček, 2020). V primeru, da smo z mRT-qPCR dobili negativen rezultat smo vzorec analizirali tudi s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi za interno kontrolo (mRNA170), ki omogočajo analizo kvalitete izolirane RNA, kot predhodno opisano v Guček (2020).

## 3 REZULTATI Z RAZPRAVO

Viroidi v rastlinah niso enakomerno razporejeni, prav tako pa se čez leto spreminja njihova koncentracija (Li in sod., 1995; Morton in sod., 1993; Rodio in sod., 2006; Zhu in sod., 2001), zato ima pri določanju viroidov velik vpliv tkivo in čas vzorčenja. Ob neustreznem vzorčenju ali neuspešni izolaciji RNA je lahko vzorec lažno negativen. Občutljivost analize lahko povečamo z analizo večje količine vzorca (100 mg), ki ga skoncentriramo na majhen volumen izolirane RNA (50 µl). To nam sicer lahko omogoča uspešno določanje viroidov, a hkrati lahko skoncentriramo tudi nečistoče in inhibitorje, zaradi katerih pomnoževanje tarčnih molekul ni optimalno (Xu in sod., 2017). Z namenom izbora ustreznega načina izolacije nukleinskih kislin iz vzorcev hmelja okuženih s hudo viroidno

zakrnelostjo za določanje z RT-PCR in RT-qPCR, smo primerjali sedem izolacij nukleinskih kislin.

### 3.1 Meritve koncentracij nukleinskih kislin

Pri uporabi CTAB reagenta smo dobili najvišje koncentracije glede na vse ostale izolacije RNA (preglednica 1). CTAB reagent je uspešno razbil celično membrano, s fenolom pa smo učinkovito odstranili proteine, zato je bila koncentracija TNA visoka. Glede na ostale izolacije smo pri CTAB za homogenizacijo uporabili večjo količino tkiva, ker smo uporabili stiskalnico in dobili bolj reprezentativen vzorec. Za izolacijo TNA smo uporabili samo del homogenega vzorca, da smo med posameznimi izolacijami analizirali primerljive količine tkiva.

**Preglednica 1:** Koncentracija nukleinskih kislin v vzorcih hmelja glede na posamezno izolacijo.

Vzorec/povnitev <sup>1</sup>	Koncentracija TNA/RNA [ng/μl] <sup>2</sup>						
	CTAB	TRIZol	Sigma	MN	Qiagen	NEB	Bioline
Vzorec 1/1	3260	135	1110	1050	887	1900	574
Vzorec 1/2	301	127	1390	762	1280	1670	396
Vzorec 1/3	2730	108	943	778	563	nt	nt
Vzorec 2/1	1120	< 100	1850	473	371	1340	< 100
Vzorec 2/2	416	< 100	1640	815	626	696	< 100
Vzorec 2/3	237	< 100	647	653	281	nt	nt
Vzorec 3/1	560	< 100	252	135	< 100	239	< 100
Vzorec 3/2	1280	< 100	353	< 100	< 100	235	< 100
Vzorec 3/3	499	< 100	425	127	< 100	nt	nt
Vzorec 4/1	< 100	407	108	296	< 100	134	152
Vzorec 4/2	186	412	127	258	< 100	127	163
Vzorec 4/3	nt	359	nt	nt	nt	100	< 100
NKI	-	-	-	-	-	-	-

<sup>1</sup>vzorec 1, sveži mladi listi okuženega hmelja; 2, sveži stari listi okuženega hmelja; 3, zamrznjeni okuženi storžki; 4, listi BVV hmelja; NKI, negativna kontrola izolacije

<sup>2</sup>CTAB: merjenje DNA, ostale: merjenje RNA; CTAB, CTAB reagent; TRIzol, TRIzol reagent; Sigma, Spectrum™ Plant Total kit; NEB, Monarch Total RNA Miniprep kit; MN, NucleoSpin® RNA Plus; Bioline, ISOLATE II RNA Plant Kit; Qiagen, RNeasy® Plant Mini Kit; nt, ni bilo testirano

Pri izolaciji RNA smo primerjali TRIzol in najpogosteje uporabljene komplete za izolacijo iz rastlinskih tkiv, ki omogočajo hitro izolacijo na osnovi čiščenja preko silikatnih membran, velikokrat brez uporabe toksičnih in nevarnih reagentov, kot so fenol, kloroform, gvanidinijev tiocianat in β-merkaptoetanol. Pri izolaciji RNA s

TRIZol reagentom smo dobili izrazito nižje koncentracije glede na ostale izolacije (preglednica 1). Vzorci mladega listja so imeli več kot 10-krat nižje vrednosti kot pri CTAB reagentu, pri vzorcih starega listja in zamrznjenih storžkov pa je bila koncentracija pod 100 ng/μl. Najvišje koncentracije RNA smo dobili z uporabo Sigma in NEB kompletov, najnižje pa zaradi dodatne encimske razgradnje DNA z Bioline (preglednica 1).

Glede na tkivo so bile v povprečju koncentracije pri svežem tkivu mladih okuženih listov (CBCVd + HLVd) dvakrat višje kot pri starih listih in vsaj trikrat višje kot pri zamrznjenih storžkih (preglednica 1). Med tkivom starih listov in storžkov so bile z uporabo kompletov vsaj štirikratne razlike (z izjemo Bioline), prav tako so bile vrednosti primerljive pri TRIZol in CTAB reagentu (preglednica 1). Na splošno se za določanje viroidov uporablja sveže tkivo, v predhodnih raziskavah je bilo namreč omenjeno, da se iz zamrznjenega tkiva izolira nižje koncentracije nukleinskih kislin, kar se ujema z našimi rezultati (Sipahioglu in sod., 2007). Alternativa zamrzovanju bi bilo sušenje tkiva, kar se je v omenjeni raziskavi pokazalo kot ustrezno. Pri BVV rastlinah smo določili nižje koncentracije, ker v rastlinah ni bilo prisotne viroidne oziroma virusne RNA (vzorec 4). V negativni kontroli izolacije (NKI) je bila koncentracija pod mejo določitve, iz česar lahko sklepamo, da se med postopkom dela vzorci niso kontaminirali.

### 3.2 Rezultati RT-PCR

Ne glede na vrsto vzorca (sveže ali zamrznjeno), starost (starejši ali mladi listi) ali vrsto tkiva (listi ali storžki) smo CBCVd in HLVd s CTAB reagentom z RT-PCR uspešno zaznali v vseh vzorcih (slika 1a, preglednica 2). Pri TRIZolu smo CBCVd uspešno določili samo pri svežih mladih listih, pri HLVd pa tudi pri zamrznjenih storžkih. Pri mladih listih so bili signali za HLVd zelo šibki, na gelu smo dobili tudi nespecifične fragmente velikosti okrog 500 bp (slika 1b, preglednica 2). Amplikoni različnih dolžin so posledica nespecifične vezave reverzne transkriptaze z gostiteljsko RNA, ki tvori termostabilne zanke. Nativna RNA se lahko veže tudi sama nase in deluje kot začetni oligonukleotid za reverzno transkriptazo, zato so na gelu vidne različne dolžine (Tuiskunen in sod., 2010; Umaña in sod., 2013). V primeru starejšega tkiva izolacija ni bila uspešna, razlog bi bil lahko v prisotnosti nečistoč (kontaminacija s fenolom) in nižji koncentraciji viroidov v starejših listih (Guček, 2020).

Metodi sta se razlikovali v načinu homogenizacije in reagentu za lizo celic. Pri CTAB reagentu smo tkivo homogenizirali v stiskalnici, pri TRIZol reagentu in ostalih izolacijah pa v terilnicah. Uporaba stiskalnice se je izkazala kot ustrežnejša, uporabili smo lahko večjo količino vzorčenega tkiva, ki smo ga zmleli v homogen vzorec. Pri terilnicah smo lahko uporabili le manjše dele vzorčenega tkiva, v skupni količini do 100 mg. Kljub temu razgradnja celic ni bila ustrezna, še vedno

so bile prisotne nečistoče, kar je vodilo do obarvanja oborjenih nukleinskih kislin in lažno negativnih rezultatov.

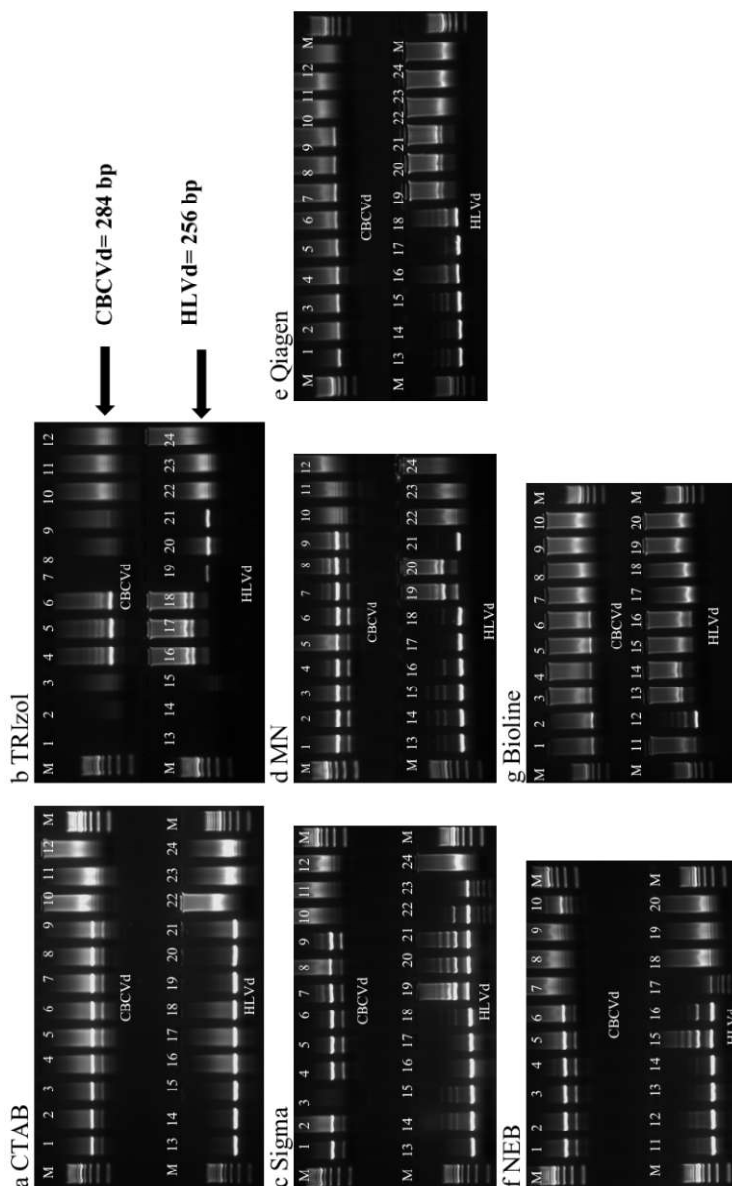
**Preglednica 2:** Rezultati RT-PCR za viroid CBCVd in HLVD glede na posamezno izolacijo.

Vzorec/ ponovitev <sup>1</sup>	CBCVd <sup>2</sup>						HLVD							
	CTAB	TRIzol	Sigma	MN	Qiagen	NEB	Bioline	CTAB	TRIzol	Sigma	MN	Qiagen	NEB	Bioline
Vzorec 1/1	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	+	+	+	+	(+)
Vzorec 1/2	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	+	+	+	+	+
Vzorec 1/3	+	+	+	+	+	nt	nt	+	(+)	+	+	+	nt	nt
Vzorec 2/1	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	(+)
Vzorec 2/2	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	(+)
Vzorec 2/3	+	-	+	+	+	nt	nt	+	-	+	+	+	nt	nt
Vzorec 3/1	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	+	(+)
Vzorec 3/2	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	(+)	+	(+)
Vzorec 3/3	+	-	+	+	+	nt	nt	+	+	+	+	(+)	nt	nt
Vzorec 4/1	-	-	-*	-	-	-	-	-	-	+	-	-	(+)	-
Vzorec 4/2	-	-	-*	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Vzorec 4/3	nt	-	nt	nt	nt	-	-	-	nt	nt	nt	nt	-	-
NKI	-	-	-	-	-	-*	-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>1</sup>vzorec 1, sveži mladi listi okuženega hmelja; 2, sveži stari listi okuženega hmelja; 3, zamrznjeni okuženi storžki; 4, listi BVV hmelja; NKI, negativna kontrola izolacije; vzorec 1/1-3, tehnična ponovitev vzorca (vzorci narejeni v treh ponovitvah)

<sup>2</sup>CBCVd, viroid razpokanosti skorje agrumov; HLVD, hmeljev latentni viroid; CTAB, CTAB reagent; TRIzol, TRIzol reagent; Sigma, Spectrum<sup>TM</sup> Plant Total kit; NEB, Monarch Total RNA Miniprep kit; MN, NucleoSpin<sup>®</sup> RNA Plus; Bioline, ISOLATE II RNA Plant Kit; Qiagen, RNeasy<sup>®</sup> Plant Mini Kit; +, pozitiven signal na CBCVd/HLVD; (+), šibek pozitiven signal na CBCVd/HLVD; -, negativen signal na CBCVd/HLVD (sivi okvirček); nt, ni bilo testirano\*rezultat po ponovitvi RT-PCR reakcije

Pri izolaciji s kompleti Sigma, MN, Qiagen, NEB in Bioline smo CBCVd z RT-PCR uspešno določili pri vseh vzorcih (slika 1c-g). Intenziteta signalov je bila najmočnejša pri Sigma, MN in NEB kompletu (slika 1c, d, f). Pri CBCVd smo z Bioline kompletom dobili zelo šibke signale (slika 1g). Pri določanju HLVD smo tako v mladem kot starem tkivu okuženega listja dobili pozitivne signale, pri storžkih pa smo imeli težave s slabšo intenziteto signalov (slika 1c-g). S kompletom Sigma in NEB smo pri storžkih dobili močne signale, z MN nekoliko šibkejše, pri uporabi Bioline in Qiagen kompleta pa zelo šibke (slika 1e, g). Zelo šibek rezultat pri storžkih je lahko posledica nečistoč, kot so polifenoli in polisaharidi, zato je bila koncentracija RNA nižja in RT-PCR reakcija inhibirana. Zaradi nečistoč smo na gelu videli nespecifičen fragment velikosti okrog 500 bp, ki je bil prisoten pri Sigma, MN, Qiagen in NEB kompletih (slika 1c-f, preglednica 2).



**Slika 1:** Analiza RT-PCR rezultatov na 2 % agaroznem gelu za izolacijo TNA in RNA. Od 1-12: Vzorci testirani na CBCVd (284 bp), od 13-24: vzorci testirani na HLVd (256 bp). **a) CTAB reagent. b) TRIzol reagent.** Vzorci po vrsti: stari okuženi listi (3x), mladi okuženi listi (3x), okuženi storžki (3x), listi BVV hmelja (2x), NKI. **c) Sigma komplet. d) MN komplet. e) Qiagen komplet.** Od 1-12: Vzorci po vrsti: mladi okuženi listi (3x), stari okuženi listi (3x), okuženi storžki (3x), listi BVV hmelja (2x), NKI. **f) NEB komplet. g) Bioline komplet.** Vzorci po vrsti: stari okuženi listi (2x), mladi okuženi listi (2x), okuženi storžki (2x), listi BVV hmelja (3x), NKI. M: 100 bp GeneRuler DNA Ladder.



Bioline komplet se je od ostalih izolacij RNA razlikoval po koraku encimske razgradnje DNA, ki je zaradi dodatnega čiščenja negativno vplivala na zaznavanje obeh viroidov. Kljub dodatni razgradnji je bil na gelu pri HLVD še vedno viden nespecifičen fragment (slika 1g). Pri uporabi Qiagen kompleta sicer nismo dobili najintenzivnejših signalov, a je bilo število nespecifičnih fragmentov najmanjše, iz česar lahko sklepamo, da je bilo po izolaciji prisotnih najmanj nečistoč (slika 1e). Pri Sigmii je bil en vzorec mladih okuženih listov negativen na CBCVD in dva vzorca BVV hmelja pozitivna, pri NEB pa smo dobili pozitiven rezultat pri NKI, kar je bilo posledica kontaminacije med RT-PCR, zato smo reakcijo ponovili (slika 1c, f).

Glede na kakovost signalov po RT-PCR reakciji lahko povzamemo, da so za določanje CBCVD v hmelju primerni CTAB reagent, Sigma, MN, NEB in Qiagen kompleti. Z Bioline kompletom smo dobili slabšo kakovost signalov, kar je lahko problematično ob nižji koncentraciji viroidov v rastlini. S TRIZol reagentom je bilo določanje viroidov v primeru starejšega tkiva in storžkov neuspešno zaradi prisotnih nečistoč. V primeru določanja HLVD se omenjene komplete lahko uporabi za testiranje vzorcev listja, pri zamrznjenih storžkih pa je glede na slabšo intenziteto signalov primernejša uporaba Sigma in NEB kompleta (slika 1c, f).

### 3.3 Rezultati mRT-qPCR

Izolirane vzorce smo analizirali tudi z mRT-qPCR na CBCVD, HLVD in HSVd in ne glede na viroid ali tkivo pri vseh izolacijah dobili pozitivne rezultate, razen pri TRIZol reagentu (preglednica 3). Pri HLVD smo v primeru vzorca 4/1 izoliranega s Sigma in MN kompletom ( $C_q = 29$  in  $30$ ), zaradi 10 ciklov višje  $C_q$ -vrednosti od pozitivnih vzorcev, vzorca potrdili kot negativna (preglednica 3).

Pri izolaciji TNA, smo vse vzorce testirali tudi z začetnimi oligonukleotidi za interno kontrolo mRNA170. V primeru CTAB izolacije so bili vsi vzorci pozitivni ( $C_q = 11-13$ ), pri TRIZol reagentu pa so bile  $C_q$ -vrednosti za mlade liste in storžke (3/2) višje ( $C_q = 16-23$ ), v primeru starih listov in dveh storžkov (3/1 in 3/3) pa negativne (preglednica 3). Glede na negativne  $C_q$ -vrednosti lahko sklepamo, da nam s TRIZol reagentom ni uspelo izolirati RNA, posledično tudi pri RT-PCR nismo dobili pozitivnih signalov (slika 1b).

Pri pozitivnih vzorcih smo najnižje  $C_q$ -vrednosti ( $C_q = 13$ ) dobili pri CTAB izolaciji za HLVD v mladih listih, najvišje pa pri Bioline v storžkih ( $C_q = 24$ ). Na splošno so bile najvišje  $C_q$ -vrednosti pri vzorcih izoliranih z Bioline kompletom ( $C_q = 19-24$ ) in TRIZol reagentom ( $C_q = 20-21$ ), kar se sklada tudi s šibkejšimi signali na gelu (preglednica 3, slika 1b, g). Zelo primerljive rezultate smo dobili pri vzorcih izoliranih s Sigma ( $C_q = 16-20$ ), Qiagen ( $C_q = 17-22$ ) in NEB ( $C_q = 17-21$ ). Najnižje vrednosti in posledično največ viroida smo izolirali s CTAB reagentom

(Cq= 13-19) in MN kompletom (Cq= 15-19). Vsi vzorci BVV hmelja in NKI so bili testirani kot negativni (Cq $\geq$  29). Najčistejša izolirana RNA je bila s kompleti Qiagen, NEB in MN, kajti v NKI (in nekaterih BVV) ni bilo nespecifičnega pomnoževanja (preglednica 3). Za testiranje vzorcev z nizkimi koncentracijami (blizu mejnih vrednosti) je zato bolj priporočljiva uporaba kompletov Qiagen, NEB in MN, da se izognemo lažno negativnim rezultatom.

**Preglednica 3: Rezultati mRT-qPCR (Cq-vrednosti) za viroid CBCVd in HLVd glede na posamezno izolacijo.**

Vzorec/ ponovitev <sup>1</sup>	CBCVd <sup>2</sup>							HLVd						
	CTAB	TRIZol	Sigma	MN	Qiagen	NEB	Bioline	CTAB	TRIZol	Sigma	MN	Qiagen	NEB	Bioline
Vzorec 1/1	15.63	20.24	20.23	17.48	21.12	20.82	19.07	12.99	21.05	17.62	16.91	18.31	18.88	18.57
Vzorec 1/2	17.13	20.45	19.68	17.63	21.00	20.56	19.66	15.58	21.31	17.19	17.41	18.06	18.62	19.14
Vzorec 1/3	15.80	20.99	19.97	17.84	21.71	nt	nt	13.59	21.54	17.24	17.26	18.77	nt	nt
Vzorec 2/1	18.78	-	15.87	16.30	18.51	17.38	19.17	16.60	-	15.82	17.27	18.96	17.34	20.11
Vzorec 2/2	19.06	-	16.01	15.19	17.69	17.44	19.42	16.99	-	15.86	16.82	18.21	17.27	20.37
Vzorec 2/3	18.44	-	17.20	15.85	19.23	nt	nt	16.62	-	17.28	17.03	19.51	nt	nt
Vzorec 3/1	16.71	-	17.01	18.87	21.53	18.47	23.82	17.43	-	18.06	18.98	21.01	19.09	23.70
Vzorec 3/2	17.05	21.16	16.89	19.53	21.64	18.87	24.03	17.82	20.11	17.84	19.37	21.39	19.40	23.83
Vzorec 3/3	15.21	-	16.43	18.80	21.91	nt	nt	15.69	-	17.21	18.90	21.52	nt	nt
Vzorec 4/1	33.75	29.55	29.62	30.75	-	-	-	36.08	-	29.17	30.02	-	33.19	31.31
Vzorec 4/2	-	29.70	31.10	-	-	-	32.35	-	31.53	31.93	-	-	-	31.71
Vzorec 4/3	nt	29.88	nt	nt	nt	-	-	nt	32.58	nt	nt	nt	31.57	33.53
NKI	33.04	33.17	31.22	32.73	-	-	-	33.38	35.41	30.93	-	-	-	30.00

<sup>1</sup>vzorec 1, sveži mladi listi okuženega hmelja; 2, sveži stari listi okuženega hmelja; 3, zamrznjeni okuženi storžki; 4, listi BVV hmelja; NKI, negativna kontrola izolacije

<sup>2</sup>CBCVd, viroid razpokanosti skorje agrumov; HLVd, hmeljev latentni viroid; CTAB, CTAB reagent; TRIZol, TRIZol reagent; Sigma, Spectrum<sup>TM</sup> Plant Total kit; NEB, Monarch Total RNA Miniprep kit; MN, NucleoSpin<sup>®</sup> RNA Plus; Bioline, ISOLATE II RNA Plant Kit; Qiagen, RNeasy<sup>®</sup> Plant Mini Kit; Cq  $\leq$  29, pozitiven signal na CBCVd/HLVd; Cq  $\geq$  29/ - / obarvano, negativen signal na CBCVd/HLVd; nt, ni bilo testirano

V predhodnih raziskavah so za izolacijo virusne in viroidne RNA primerjali različne metode na osnovi fenolov,  $\beta$ -merkaptetanola, silikatov, litijevega klorida, CTAB reagenta in komercialno dostopnih reagentov (Faggioli in sod., 1998; Zhang in sod., 1998; Sipahioglu in sod., 2007; Paylan in sod., 2014; Umana in sod., 2013; Buzkan in sod., 2004; Nouayti in sod., 2018; Arruabarrena in sod., 2016). V večini primerov so se za viroide kot najbolj optimalne izkazale metode, ki so bile posebej modificirane glede na analizirano tkivo in patogen in kombinacije dveh različnih

metod (TNA + komplet reagentov) (Paylan in sod., 2014; Umama in sod., 2013; Arruabarrena in sod., 2016; Sipahioglu in sod., 2007).

**Preglednica 4:** Povzetek primerjave izolacij glede na ceno, čas, RT-PCR in RT-qPCR rezultate.

Postavka/ metoda <sup>1</sup>	Izolacija <sup>2</sup>						
	CTAB	TRIzol	Sigma	MN	Qiagen	NEB	Bioline
Cena kemikalij na vzorec	1 €	3 €	4 €	4,8 €	7 €	5 €	6 €
Časovni obseg dela	4 h	4 h	1,5 h	1 h	1 h	1 h	1,5 h
RT-PCR							
Mladi okuženi listi	+	+	+	+	+	+	(+)
Stari okuženi listi	+	-	+	+	+	+	(+)
Storžki	+	-	+	(+)	(+)	+	(+)
mRT-qPCR (Cq-vrednost)	13-19	20-21	16-20	15-19	17-22	17-21	19-24
<b>Ustreznost izolacije</b>	✓	✗	✓	✓	✓	✓	✗

<sup>1</sup>RT-PCR, intenziteta signala pri posameznem tkivu: +, pozitiven signal na CBCVd/HLVd; (+), šibek pozitiven signal na CBCVd/HLVd; -, negativen signal na CBCVd/HLVd; mRT-qPCR, razpon Cq-vrednosti pri posamezni izolaciji

<sup>2</sup>CTAB, CTAB reagent; TRIzol, TRIzol reagent; Sigma, Spectrum<sup>TM</sup> Plant Total kit; NEB, Monarch Total RNA Miniprep kit; MN, NucleoSpin<sup>®</sup> RNA Plus; Bioline, ISOLATE II RNA Plant Kit; Qiagen, RNeasy<sup>®</sup> Plant Mini Kit

Izolacija TNA predstavlja cenejšo alternativo komercialno dostopnim kompletom, ampak je zahtevnejša in časovno zamudnejša kot izolacija RNA s kompleti reagentov (preglednica 4). Intenziteta signalov pri RT-PCR za CBCVd in HLVd je bila najmočnejša po izolaciji s CTAB reagentom (slika 1a). Rezultati RT-PCR (slika 1) in mRT-qPCR (preglednica 3) za TNA in RNA so bili primerljivi. Pri Bioline kompletu smo zaradi encimske razgradnje dobili slabše rezultate (slika 1g), v primeru TRIzol reagenta pa zaradi nečistoč v nekaterih vzorcih RNA nismo uspešno izolirali (slika 1b, preglednica 4). Glede na tkivo smo CBCVd in HLVd uspešno določili v svežih listih, pri zamrznjenih storžkih smo pri HLVd dobili šibkejšje signale (slika 1), zato je za določanje HLVd primernejša uporaba svežega tkiva.

#### 4 ZAKLJUČEK

Izbor ustrezne metode izolacije viroidne RNA je odvisen od koncentracije viroida v rastlini, vzorčenega tkiva in metode določanja. Za vsako kombinacijo viroid-gostitelj je zato potrebno določiti specifičen način vzorčenja in izolacije, ki mora biti zanesljiv in cenovno ugoden. Z namenom izbora ustrezne izolacije za določanje CBCVd in HLVd smo primerjali sedem RNA izolacij (preglednica 4).

V primeru, da določamo viroide v vzorcih hmelja z RT-PCR je CTAB izolacija kljub daljšemu časovnemu obsegu a z nizko ceno, glede na naše rezultate, ustrežnejša (preglednica 4). Kompleti reagentov so zaradi cene primernejši za analize manjšega števila vzorcev z RT-qPCR. Z mRT-qPCR smo ob uporabi Qiagen, NEB in MN kompletov dobili zanesljive rezultate brez nespecifičnih pomnoževanj v NKI (preglednica 3). Uporaba TRizola in Bioline kompleta za testirane vzorce ni bila optimalna (preglednica 4). Za določanje CBCVd in HLVd z RT-PCR in RT-qPCR nam je tako na voljo več načinov izolacij nukleinskih kislin, za katerega se odločimo pa je odvisno od analiziranega vzorca.

**Zahvala.** Avtorji se za finančno podporo zahvaljujemo Javni agenciji za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (štipendija za mladega raziskovalca št. 36371 in raziskovalni program P4-0077).

## LITERATURA

- Arruabarrena A, Benítez-Galeano MJ, Giambiasi M, Bertalmío A, Colina R, Hernández-Rodríguez L. Application of a simple and affordable protocol for isolating plant total nucleic acids for RNA and DNA virus detection. *J Virol Methods*. 2016;237:14-17.
- Bernad L. in Duran-Vila N. A novel RT-PCR approach for detection and characterization of citrus viroids. *Molecular and Cellular Probes*. 2006; 20: 105–113.
- Daròs J.A. Viroids: Small noncoding infectious RNAs with the remarkable ability of autonomous replication. V: *Current research topics in plant virology*. Wang A., Zhou X. (ur.). Switzerland, Springer International Publishing. 2016: 295-322.
- EPPO. First report of Citrus bark cracking viroid in Germany. *EPPO Reporting Service 2019 no. 8- Diseases*. 2019. 165.
- Faggioli F, Pasquini G, Barba M. Comparison of different methods of RNA isolation for plum pox virus detection by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Acta Virol*. 1998;42(4):219-221.
- Guček T., Trdan S., Jakše J., Javornik B., Matoušek J., Radišek S. Diagnostic techniques for viroids. *Plant Pathology*. 2017; 66: 339–358.
- Guček T. Biologija viroida razpokanosti skorje agrumov (CBCVd) in razvoj metod za določanje viroidov v hmelju. *Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta*, 2020. 188 str.
- Hataya T., Katsuyuki H., Suda N., Nagata T., Shifang L., Itoga Y., Shikata E. Detection of hop latent viroid (HLVd) using reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR). *Annals of the Phytopathological Society of Japan*. 1992; 58: 677–684.
- Jakše J., Radišek S., Pokorn T., Matoušek J., Javornik B. Deep-sequencing revealed Citrus bark cracking viroid (CBCVd) as a highly aggressive pathogen on hop. *Plant Pathology*. 2015; 64: 831–842.
- Kump B. in Javornik B. Evaluation of genetic variability among common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) populations by RAPD markers. *Plant Science*. 1996; 114: 149–158.
- Kunta M., da Graca J. V., Skaria M. Molecular detection and prevalence of citrus viroids in Texas. *Hortscience*. 2007; 42: 600–604.
- Li S.-F., Onodera S., Sano T., Yoshida K., Wang G.-P., Shikata E. Gene Diagnosis of Viroids Comparisons of Return-PAGE and Hybridization Using DIG-labeled DNA and

- RNA Probes for Practical Diagnosis of Hop Stunt, Citrus Exocortis and Apple Scar Skin Viroids in Their Natural Host Plants. *Japanese Journal of Phytopathology*. 1995; 61: 381–390.
- Malfitano M., Barone M., Duran-Vila N., Alioto D. Indexing of viroids in citrus orchards of Campania, Southern Italy. *Journal of Plant Pathology*. 2005; 87: 115–121.
- Matoušek J., Siglová K., Jakše J., Radišek S., Brass J. R. J., Tsushima T., Guček T., Duraisamy G.S., Sano T., Steger, G. Propagation and some physiological effects of Citrus bark cracking viroid and Apple fruit crinkle viroid in multiple infected hop (*Humulus lupulus* L.). *Journal of Plant Physiology*. 2017; 213: 166–177.
- Mirmajlessi S. M., Loit E., Mand M., Mansouripour S. M. Real-Time PCR Applied to Study on Plant Pathogens: Potential Applications in Diagnosis - a Review. *Plant Protection Science*. 2015; 51: 177–190.
- Mishra A. K., Duraisamy G. S., Matoušek J., Radišek S., Javornik B., Jakše J. Identification and characterization of microRNAs in *Humulus lupulus* using high-throughput sequencing and their response to Citrus bark cracking viroid (CBCVd) infection. *BMC Genomics*. 2016; 17: 919.
- Morton A., Barbara D. J., Adams A. N. The distribution of hop latent viroid within plants of *Humulus lupulus* and attempts to obtain viroid-free plants. *Annals of Applied Biology*. 1993; 123: 47–53.
- Načrt izrednih ukrepov za izkoreninjenje viroidnih zakrnelosti hmelja. Benko Beloglavec A. (ur.). Ljubljana, UVHVVR. 2019: 26 str.
- Palacio-Bielsa A., Foissac X., Duran-Vila N. Indexing of citrus viroids by imprint hybridisation. *European Journal of Plant Pathology*. 1999; 105: 897–903.
- Paylan I. C., Çandar A., Gümüş M., Pazarlar S., Önder S. A comparison of six total RNA isolation methods for diagnosis of GYSVd-1 (Grapevine yellow speckle viroid-1) on *vitis vinifera* L. leaves. *Pakistan Journal of Botany*. 2014; 46: 2089–2093.
- Pokorn T. Identifikacija potencialnih tarč viroidnih malih RNA (vd-sRNA) v hmelju (*Humulus lupulus* L.) [na spletu]. *Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta*. [Dostopano 30 april 2019]. Pridobljeno od: <https://repozitorij.uni-lj.si/IzpisGradiva.php?lang=slv&id=97741>.
- Puchta H., Ramm K., Sängler H. L. Nucleotide sequence of a hop stunt viroid isolate from the German grapevine cultivar „Riesling“. *Nucleic Acids Research*. 1988; 16: 2730.
- Rodio M. E., Delgado S., Flores R., Di Serio F. Variants of Peach latent mosaic viroid inducing peach calico: uneven distribution in infected plants and requirements of the insertion containing the pathogenicity determinant. *Journal of General Virology*. 2006; 87: 231–240.
- Sano T., Yoshida H., Goshono M., Monma T., Kawasaki H., Ishizaki K. Characterization of a new viroid strain from hops: evidence for viroid speciation by isolation in different host species. *Journal of General Plant Pathology*. 2004; 70: 181–187.
- Sasaki M. in Shikata E. On some properties of hop stunt disease agent, a viroid. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*. 1977; 53: 109–112.
- Seigner L., Liebrecht M., Keckel L., Einberger K., Absmeier C. Real-time RT-PCR detection of Citrus bark cracking viroid (CBCVd) in hops including an mRNA-based internal positive control. *Journal of Plant Diseases and Protection*. 2020; doi: 10.1007/s41348-020-00317-x: 5 str.

- 
- Sipahioglu HM, Ocak M, Usta M. Compariosn of Three Conventional Extraction Methods for the Detection of Plant Virus/Viroid RNAs from Heat Dried High-phenolic Host Leaves. Published online 2007;6: 102-107.
- Tuiskunen A., Leparc-Goffart I., Boubis L., Monteil V., Klingström J., Tolou H. J., Plumet S. Self-priming of reverse transcriptase impairs strand-specific detection of dengue virus RNA. *Journal of General Virology*. 2010; 91: 1019–1027.
- Umaña R., Pritsch C., Arbiza J. R., Rivas F., Pagliano G. Evaluation of four viroid rna extraction methods for the molecular diagnosis of cevd in citrus lemon using RT-PCR, dot blot and northern blot. *Biotechnologia Aplicada*. 2013; 30: 131–136.
- Xu R., Shieh Y. C., Stewart D. S. Comparison of RNA extraction kits for the purification and detection of an enteric virus surrogate on green onions via RT-PCR. *Journal of Virological Methods*. 2017; 239: 61–68.
- Zhu Y., Green L., Woo Y. M., Owens R., Ding B. Cellular basis of potato spindle tuber viroid systemic movement. *Virology*. 2001; 279: 69–77.

## VPLIV VREMENSKIH DEJAVNIKOV NA VSEBNOST ALFA-KISLIN V STORŽKIH HMELJA

Martin PAVLOVIČ<sup>1</sup>, Viljem PAVLOVIČ<sup>2</sup>, Boštjan NAGLIČ<sup>3</sup> in Barbara ČEH<sup>4</sup>

Izvirni znanstveni članek / original scientific article

Prispelo / received: 25. 10. 2020

Sprejeto / accepted: 30. 11. 2020

### Izveček

V članku je analizirana povezava med štirimi podnebnimi spremenljivkami in vsebnostjo alfa-kislin v storžkih sorte hmelja Aurora, najbolj razširjene sorte v slovenski pridelavi, v obdobju 1994–2019. Z analizo Pearsonovih korelacijskih koeficientov in uporabo faktorske analize podatkov, razčlenjenih po koledarskih tednih rastnega cikla, so definirana obdobja, ko so spremembe parametrov temperature, padavin, sončnega sevanja in relativne vlažnosti najmočneje statistično povezane s končno vsebnostjo alfa-kislina v storžkih.

**Ključne besede:** alfa-kislina; vremenski atributi; cv. Aurora; napovedovanje; kakovost hmelja

## THE IMPACT OF WEATHER CONDITIONS ON HOP ALPHA-ACID CONTENT

### Abstract

The paper analyses the correlation between changes in four climatic variables and alpha-acid production for the hop variety Aurora (Super Styrian Aurora), the most widely-planted variety in the Slovenian production during 1994–2019. By analyzing Pearson correlation coefficients and using factor analysis of data broken down by calendar month and week of the growing cycle, it determines the specific times of the year when changes to temperature, rainfall, sunshine and relative humidity are most strongly correlated to changes in alpha-acid production at harvest.

**Key words:** alpha-acids; weather attributes; cv. Aurora; forecasting; hop quality

---

<sup>1</sup> Prof. dr., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije in Fakulteta za kmetijstvo in biosistemske vede Univerze v Mariboru, e-pošta: martin.pavlovic@ihps.si

<sup>2</sup> Dr., Šolski center Slovenske Konjice-Zreče, viljem.pavlovic@guest.arnes.si

<sup>3</sup> Dr., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, e-pošta: bostjan.naglic@ihps.si

<sup>4</sup> Dr., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, e-pošta: barbara.ceh@ihps.si

## 1 UVOD

Smole in eterična olja so glavni sestavni deli lupulinskih žlez ženskih socvetij (storžkov) hmelja (*Humulus lupulus* L.). Del mehkih smol so hmeljne kisline, sestavljene iz dveh kemično podobnih skupin spojin, alfa-kislin ali humulonov in beta-kislin ali lupulonov. Poleg grenčic doprinesejo alfa-kisline tudi k mikrobiološki stabilnosti piva in krepijo stabilnost pene (Moir, 2000; Steenackers in sod., 2015). Tvorba alfa-kislin pri hmelju poteka od začetka nastajanja storžkov. Razvoj v dvotedenskem obdobju pred obiranjem pa je najpomembnejši, saj v tem času nastane 90 % alfa-kislin (Hecht in sod., 2004). Vsebnost alfa-kislin je genetska lastnost hmelja in je med 2–21% mase suhega storžka. Na njihovo količino pomembno vplivajo tudi vremenske razmere v rastni sezoni (Donner in sod., 2020). Te v vegetacijskem obdobju hmelja močneje vplivajo na kopičenje alfa-kislin v tehnološki zrelosti kot razmere v tleh (Srečec in sod., 2013). Vsebnost alfa-kislin je pomembna sestavina pri določanju pivovarske in posledično tržne vrednosti hmelja. S širjenjem javnih in zasebnih programov žlahtnjenja hmelja je od 90-tih let prejšnjega stoletja dalje eden glavnih ciljev osredotočen na povečanje vsebnosti alfa-kislin.

Kljub svetovnem trendu rasti uporabe kapljičnega namakanja prevladujoči delež hmeljišč v Evropi še vedno nima sistematičnega namakanja. Suša in neredne padavine povzročajo zmanjšano biosintezo in vigor rastlin hmelja, kar povzroči manjšo tvorbo alfa-kislin (De Keukeleire in sod., 2007). S študijem vpliva vremenskih razmer na vsebnost alfa-kislin v rastni sezoni pri sorti Aurora v Sloveniji so ugotovili obratno korelacijo med povprečnimi dnevnimi temperaturami in proizvodnjo alfa-kislin ( $r = -0,39$ ,  $P < 0,05$ ) in močno pozitivno korelacijo med skupnimi padavinami in proizvodnjo alfa-kislin ( $r = 0,46$ ,  $P < 0,05$ ) (Srečec in sod., 2008). Nekatere tuje raziskave kažejo, da julijske temperature zraka najbolj vplivajo na razvoj alfa-kislin (Kučera in Krofta, 2009). Ugotovljeno je bilo, da so padavine v mesecih maju, juniju in juliju ključne za razvoj alfa-kislin. V avgustu, v zadnjem mesecu pred obiranjem, pa niso bile več signifikantne. Ti rezultati ne veljajo enako za vsa hmeljarska območja, kar nakazuje podobna raziskava na več sortah na Češkem (Donner in sod., 2020).

Cilj te raziskave je bil ugotoviti vpliv vremenskih razmer v celotni rastni sezoni na vsebnost alfa-kislin v hmeljevih storžkih pri sorti Aurora, v letu 2020 najbolj razširjeni sorti (558 ha, 38 %) v Sloveniji, s preučitvijo podatkov v časovnem obdobju 1994–2019.



## **2 MATERIALI IN METODE**

### **2.1 Vsebnost alfa-kislin v storžkih**

Uporabili smo rezultate laboratorijskih analiz vsebnosti alfa-kislin za sorto Aurora, ki so bile narejene na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS) od leta 1994 do 2019. Vsebnosti so bile izmerjene na vzorcih posušenih storžkov z uporabo standardizirane konduktometrične metode ekstrakcije hmelja (Analytica EBC 2000; Košir in Livk, 2019). Opravili smo Levenov test enake variance med povprečnimi vrednostmi vsebnosti alfa-kislin v storžkih s treh območij v severovzhodni Sloveniji (Celje, 46°15', 15°15', 244 m; Šmartno pri Slovenj Gradcu, 46°29', 15°7', 455 m; Maribor 46°33', 15°38', 269 m). Rezultati kažejo ocenjeno povprečno vsebnost alfa-kislin za celotno območje pridelave hmelja v Sloveniji.

### **2.2 Sorta Aurora**

Sorta Aurora je srednje zgodnja sorta hmelja, diploidni hibrid med nemško sorto Northern Brewer in TG 77 neznanega izvora. Sorto z intenzivno in prijetno aromo hmelja so vzgojili v 70-tih letih prejšnjega stoletja na IHPS v Žalcu. Vsebuje med 7,2–12,6 % alfa-kislin.

### **2.3 Meteorološki podatki**

Zbrali smo podatke od 1. januarja 1994 do 31. decembra 2019 s treh meteoroloških postaj na omenjenih območjih, ki so v analizo dale več kot 300.000 podatkovnih točk. Razpoložljivi vremenski podatki so zajemali dnevne padavine (mm; t.j. L/m<sup>2</sup>), povprečne dnevne temperature (°C), skupne sončne ure (h) in povprečno dnevno relativno vlažnost (%). Razlike v teh vremenskih podatkih se med temi tremi postajami niso statistično značilno razlikovale in nobena postaja ni imela stalno višjih podatkovnih vrednosti kot katera koli druga.

### **2.4 Vremenski atributi**

Preučevali smo vpliv korelacije med vsoto temperatur (T), številom sončnih ur (S), skupno količino padavin (R) in povprečno relativno vlažnostjo (RH) ter vsebnostjo alfa-kislin v storžkih hmelja. Iz pridobljenih meteoroloških podatkov smo tedensko izračunavali povprečne vrednosti spremenljivk od aprila do avgusta. Od začetka rasti rastlin (14. teden v letu), do začetka obiranja (34. teden v letu). Vrednosti za vsak meteorološki atribut (A) smo izračunali po naslednjem obrazcu:

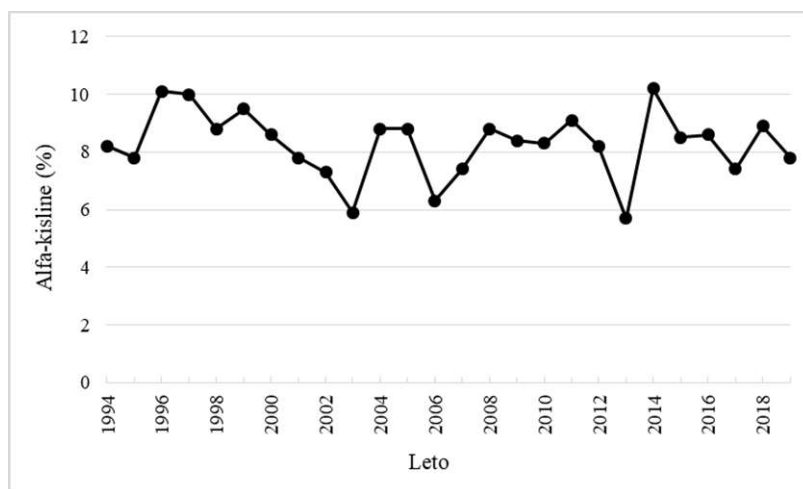
$$A_{ab} = \sum_{w=a}^b pw \quad (1)$$

$$a = 26 + z - k; b = 29 + z; k = 1, 2, \dots, 12; z = 0, 1, \dots, 5$$

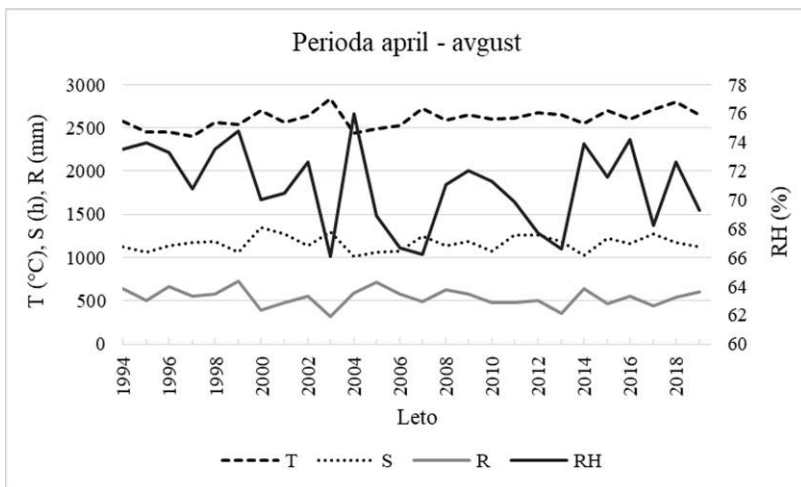
kjer A ustreza prej omenjenim spremenljivkam (T, R, S in RH) in kjer pw predstavlja tedenske podatke parametra. Pw smo izračunali na podlagi dnevnih meteoroloških podatkov, pridobljenih iz arhivov Agencije Republike Slovenije za okolje (ARSO). V zgornji formuli predstavlja **a** spodnjo mejo časovnega intervala, **b** pa zgornjo mejo intervala, za katerega smo izračunali vrednosti. Za merjenje korelacije med dvema spremenljivkama smo uporabili Pearsonov korelacijski koeficient.

### 3 REZULTATI IN RAZPRAVA

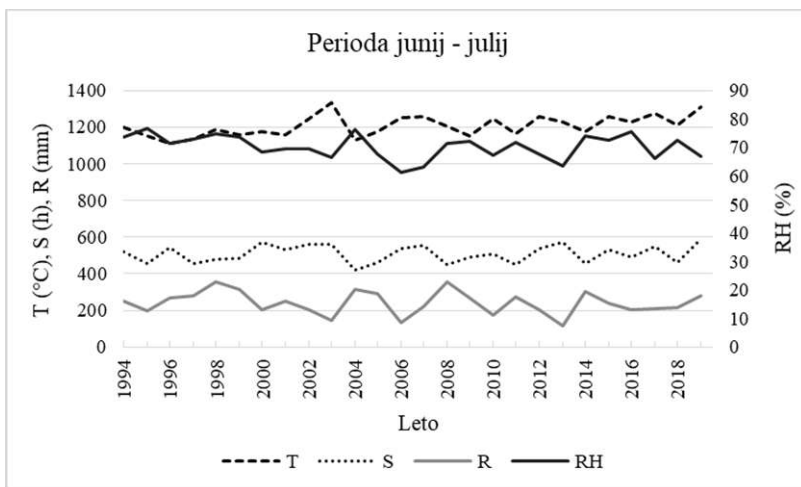
Rezultati študije so prikazani za različne tedenske intervale. Razkrite so najbolj kritične faze rasti in razvoja hmelja za vsako uporabljeno metodo, kjer T, R, S in RH prikazujejo njihov pomemben vpliv na vsebnost alfa-kislin ter posredno na pivovarsko kakovost in tržno vrednost hmelja. Na sliki 1 prikazujemo podatke o povprečnih vsebnostih alfa-kislin v hmelju pri sorti Aurora v obravnavnem obdobju. Na slikah 2 in 3 so prikazani podatki, zbrani med letoma 1994 in 2019 s treh meteoroloških postaj, ki pokrivajo celotno območje pridelave hmelja v Sloveniji. Na sliki 2 so prikazane skupne povprečne vrednosti spremenljivk T, R, S in RH za celotno rastno dobo in na sliki 3 vrednosti samo za junij in julij.



**Slika 1:** Povprečne vsebnosti alfa-kislin v hmelju (v %) pri sorti Aurora v obdobju 1994–2019



**Slika 2:** Meteorološki podatki za obdobje april – avgust s treh postaj med letoma 1994 in 2019 - skupne povprečne vrednosti T (temperatura (°C)), S (sončno sevanje (h)), R (padavine (mm)), RH (relativna zračna vlaga (%))



**Slika 3:** Meteorološki podatki za obdobje junij–julij s treh postaj med letoma 1994 in 2019 - skupne povprečne vrednosti T (temperatura (°C)), S (sončno sevanje (h)), R (padavine (mm)), RH (relativna zračna vlaga (%))

Pearsonovi koeficienti korelacije za spremenljivke T, S, R in RH glede na tvorbo alfa-kislin so bili izračunani za tedenske intervale za obdobje med letoma 1994 in 2019. Analiza podatkov je pokazala največjo negativno korelacijo med temperaturo (T) in tvorbo alfa-kislin ( $T_{2530}$ ,  $r = -0,78$ ,  $P < 0,01$ ) v intervalu med 25. in 30. tednom. Spremenljivka  $T_{2530}$  predstavlja vsoto aktivnih temperatur od 18. junija do

29. julija. V označenih intervalih tednov za spremenljivko temperatura  $T_{2532}$ ,  $T_{2732}$  in  $T_{2428}$  se pokaže nižja, a še vedno statistično značilna korelacija (-0,76, -0,64, -0,64; pri  $P < 0,01$ ). Rezultati kažejo, da je temperatura (T) močno povezana s tvorbo alfa-kislin v obdobjih od začetka intenzivne rasti rastlin do konca cvetenja. Vpliv temperature (T) na tvorbo alfa-kislin v avgustu tik pred obiranjem pa je šibek in statistično neznačilen.

V časovnem obdobju med tednoma 25 in 30 je bila večja negativna korelacija med sončnim sevanjem (S) in vsebnostmi alfa-kislin ( $S_{2530}$ ,  $r = -0,81$ ,  $P < 0,01$ ). To razmerje je dalo največjo negativno korelacijo v tej študiji in velja za obdobje med 18. junijem in 29. julijem. Konča se približno štiri tedne pred začetkom obiranja hmelja. Korelacija med sončnim sevanjem (S) in proizvodnjo alfa-kislin v avgustu je bila statistično neznačilna.

Najvišja pozitivna korelacija padavin (R) v mm ( $L/m^2$ ) in vsebnostjo alfa-kislin, ki velja za obdobje med 18. junijem in 29. julijem, je dala naslednje rezultate  $R_{2530}$ ,  $r = 0,72$  ( $P < 0,01$ ). Padavine (R) so pokazale najvišjo pozitivno korelacijo z vsebnostjo alfa-kislin. Moč korelacije med padavinami (R) in vsebnostjo alfa-kislin je začela upadati po 29. juliju. V tej pozni fazi so rastline hmelja v celoti zacvetele in razvijale storžke.

Relativna vlažnost (RH) je bila v primerjavi z ostalimi parametri (T, S, R) v najvišji korelaciji z vsebnostjo alfa-kislin  $RH_{2732}$  ( $r = 0,82$ ,  $P < 0,01$ ). To je časovno obdobje med 27. in 32. tednom. Gre za čas med 2. julijem in 12. avgustom.

Spremenljivki temperatura (T) in sončno sevanje (S) sta v pretežno negativni korelaciji z vsebnostjo alfa-kislin, medtem ko so padavine (R) in relativna vlažnost (RH) v pozitivni korelaciji. Ti pari parametrov se zrcalijo, pri rezultatih pa je mogoče uporabiti tudi osnovno logiko. Ko imamo več sonca (S), je temperatura (T) v poletnih mesecih praviloma višja. Ko je oblačno, je to znak, da je sončnega obsevanja (S) manj in da je relativna vlažnost (RH) lahko višja. Kasneje je več možnosti za deževje (R), ko je manj sonca (S).

Faktorsko analizo smo uporabili z namenom zmanjšanja velikega števila spremenljivk in grupiranjem le-teh v manjše število obteženih komponent. Poslužili smo se metode glavnih komponent (ang. principal component analysis) ob uporabi ortogonalne (Varimax) preslikave množice podatkov.

Ustreznost izbranih spremenljivk za faktorsko analizo smo preverili s pregledom korelacijske matrike, Bartettovim testom sferičnosti  $\chi^2 (28) = 181,6$ ,  $p < 0,001$ , pregledom "antiimage" korelacijske matrike, kjer so vse vrednosti diagonal presegele 0,69, s Kaiser-Meyer-Olkinovo mero ustreznosti vzorčenja ( $KMO=0,75$ ), kar je dovolj velika vrednost nad priporočeno vrednostjo 0,5 ter vrednostjo komunalitet za posamezne spremenljivke. Za število glavnih komponent smo se

odločili na osnovi hevrističnega pravila, da naj komponente pojasnijo vsaj 80 % skupne variance. Dobljena matrika po varimax rotaciji je izpostavila 3 komponente.

Značilnost prve komponente je izkazan izrazit vpliv števila ur sončnega obsevanja rastline na razlago variance vsebnosti alfa-kislin. Ta komponenta nam pojasni največji delež variabilnosti (32,4 %). Drugo komponento zaznamujeta temperatura in sočasna količina padavin, kar lahko razložimo z večjo relativno vlažnostjo zraka. Ta komponenta nam pojasni 31,3 % variabilnosti. Tretjo komponento karakterizirata predvsem atributa količine padavin v določenem časovnem obdobju, ki pojasni najmanjši delež (23,7 %) variabilnosti vsebnost alfa-kislin sorte Aurora skozi leta. To lahko razložimo tudi z vse večjim obsegom pojavljanja kapljičnega namakanja hmelja. Poudarimo naj, da količina vode, dodana z namakanjem, ni zajeta v preučevanih atributih.

Rezultati naše raziskave se ujemajo s tistimi na Hrvaškem (Srečec in sod., 2008). Pri sorti Aurora so zaznali negativno korelacijo med naraščajočo vsoto efektivnih temperatur in tvorbo alfa-kislin ( $r=-0,39$ ), medtem ko količine padavin in vsebnost alfa-kislin kažejo pozitivno korelacijo ( $r=0,46$ ). Pri češki sorti Saaz so na vsebnost alfa-kislin vplivale vremenske razmere v časovnem obdobju med junijem in avgustom, torej v razvojnih fazah cvetenja, tvorbe storžkov in zorenja (Kučera in Krofta, 2009). Negativna korelacija med julijskimi temperaturami in vsebnostjo alfa-kislin je najbolj vplivala na njihov model, kar je enako, kot je pokazala naša raziskava ( $r=-0,71$ ). V primerjavi s predhodno študijo (Pavlovič in sod., 2011), ki je zajela podatke med letoma 1994 in 2010, je tokratna (z našimi rezultati v primerjavi z oklepaji) natančneje opredelila najpomembnejša časovna obdobja za vremenske vplive pri tvorbi alfa-kislin. Temperatura je bila najpomembnejša med 24. in 31. tednom (od 25. do 30.), skupna količina padavin in sonca med 25. in 29. tednom (od 25. do 30.) in vlažnost zraka med 28. do 33. tednom (od 27. do 32.). Podobno so Donner in sod. (2020) ugotovili za češke sorte hmelja, pri katerih so imele poletne visoke temperature zraka največji negativni vpliv na tvorbo alfa-kislin. Drugi dejavniki, ki negativno vplivajo na proizvodnjo alfa-kislin, so bile visoke temperature v juliju in avgustu, število dni z najvišjo temperaturo nad 30 °C in vsota temperatur v sezoni. Češka sorta hmelja Agnus je pokazala stabilno vsebnost alfa-kislin, neodvisno od vremena, medtem ko sta bili sorti Saaz in Premiant bolj občutljivi na ta parameter.

#### 4 SKLEPI

Vsebnost alfa-kislin v hmelju je eden najpomembnejših parametrov kakovosti in s tem tržne vrednosti hmelja. Vpliv vremenskih nihanj na proizvodnjo alfa-kislin v hmelju je pomemben in povezan s stopnjami razvoja rastlin, katerih datumi se vsako leto nekoliko spreminjajo zaradi naravnih podnebnih sprememb. Storžki hmelja sorte Aurora se običajno začnejo razvijati v drugi polovici junija (26.

teden), rastlina pa je v polnem razcvetu sredi julija (28. teden). Modeli za vnaprejšnjo napoved vsebnosti alfa-kislin (na podlagi vhodnih podatkov iz najvplivnejših časovnih obdobij v letu, ko vključene vremenske spremenljivke najbolj vplivajo na vsebnost alfa-kislina pri sorti Aurora), bi tako lahko vključevali izbrane najvplivnejše tedenske intervale. Rezultati raziskave kažejo, da trije faktorji pojasnjujejo 87,4 % variance. Prvi faktor (32,4 %) zajema podatke o sončnem sevanju (S), pri čemer ima ta največji vpliv od začetka junija do konca julija. Drugi faktor (31,3 %) zajema tako temperaturne spremenljivke (T) kot spremenljivko, ki zajema padavine (R). Tretji dejavnik (23,7 %) zajema padavine v obdobju od druge polovice maja do sredine avgusta, to je deset dni pred obiranjem sorte Aurora v Sloveniji. Rezultati študije potrjujejo uporabo analiziranih podatkov za nadaljnje raziskave oblikovanja celovitega napovednega modela.

## 5 VIRI

- Analytica EBC, 2000. European Brewery Convention. Grundwerk: Section 7.4. EBC Analysis Committee, Hans Carl Getraenke Fachverlag, Nuernberg, Germany.
- Donner P., Pokorný J., Ježek J., Krofta K., Patzak J., Pulkrábek J. Influence of weather conditions, irrigation and plant age on yield and alpha-acids content of Czech hop (*Humulus lupulus* L.) cultivars. *Plant, Soil and Environment*. 2020; 66: 41-46.
- De Keukeleire J., Ooms G., Heyerick A., Roldan-Ruiz I., Van Bockstaele E., De Keukeleire D. Relevance of Organic Farming and Effect of Climatological Conditions on the Formation of Alpha-Acids, Beta-acids, Desmethylxanthohumol, and Xanthohumol in Hop (*Humulus lupulus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007; 55: 61-66.
- Hecht S., Kammhuber K., Reiner J., Bacher A., Eisenreich W. Biosynthetic experiments with tall plants under field conditions.  $^{18}\text{O}_2$  incorporation into humulone from *Humulus lupulus*. *Phytochemistry*. 2004; 65: 1057-1060.
- Košir, I.J., Livk, J. Hop industry crop Evaluation 2019. IHPS. Žalec, Contract nr.: 2311-09-000136. 2019. 14 p (Slovene).
- Kučera J., Krofta K. Mathematical model for prediction of alpha-acid contents from meteorological data for 'Saaz' aroma variety. *Acta Horticulturae*. 2009; 848: 131-139.
- Moir M. Hops – a millennium review. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 2000; 58: 131-146.
- Pavlovič, M., Čerenak, A., Pavlovič, V., Rozman, Č., Pažek, K., Bohanec, M. Development of DEX-HOP Multi-attribute Decision Model for Preliminary Hop Hybrids Assessment. V: *Computers and Electronics in Agriculture*. 2011; 75(1): 189.
- Srečec S., Kvaternjak I., Kaučič D., Špoljar A., Erhatic R. Influence of Climatic Conditions on Accumulation of alpha-acids in Hop Cones. *Agriculturae Conspectus Scientificus*. 2008; 73, 3: 161-166.
- Srečec, S., Čeh, B., Savić Ciler, T., Ferlež Rus, A. Empiric mathematical model for predicting the content of alpha-acids in hop (*Humulus lupulus* L.) cv. Aurora. *Springer Plus*; 2013, 2: 59.
- Steenackers B., De Cooman L., De Vos D. (2015): Chemical transformations of characteristic hop secondary metabolites in relation to beer properties and the brewing process: a review. *Food Chemistry*. 2015; 172: 742-756.

## MODELNO VREDNOTENJE ŽLAHTNITELJSKE KAKOVOSTI KRIŽANCEV HMELJA

Martin PAVLOVIČ<sup>1</sup>, Manja KUMER<sup>2</sup>, Karmen PAŽEK<sup>3</sup> in Andreja ČERENAK<sup>4</sup>

Izvirni znanstveni članek / original scientific article

Prispelo / received: 28. 9. 2020

Sprejeto / accepted: 9. 11. 2020

### Izvleček

Raziskava vključuje modelno oceno tržne vrednosti križancev hmelja z Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS) v Žalcu. Večkriterijski model v programu DEXi vsebuje 4 glavne atribute: (i) tržna perspektivnost, (ii) habitus, (iii) eterična olja in (iv) grenčice, skupno 20 kriterijev. Dvajset vključenih križancev je razvrščenih v 3 skupine - z 'odlično', 'dobro' in 'slabo' žlahtniteljsko kakovostjo upoštevajoč navedene atribute. Križanec hmelja 207/205 je bil modelno ocenjen kot tržno najperspektivnejši za nadaljevanje postopka priznanja v novo komercialno sorto hmelja z visoko vsebnostjo alfa-kislin in visoko odpornostjo na verticilijsko uvelost hmelja.

**Ključne besede:** večkriterijski model, DEXi, žlahtnjenje hmelja.

## MODEL EVALUATION OF BREEDING AND MARKET QUALITY OF HOP HYBRIDS

### Abstract

The research includes a market value model assessment of the hop hybrids from the Slovenian Institute of Hop Research and Brewing (IHPS) in Žalec. The multicriteria model in the DEXi program contains 4 main attributes: (i) market perspective, (ii) habitus, (iii) essential oils, (iv) bitterness, and a total of 20 criteria. Twenty analyzed hybrids are classified into 3 groups – with 'excellent', 'good' and 'poor' breeding quality. The hop hybrid 207/205 was model-rated as the most market-promising for the continuation of the recognition procedure for a new commercial high alpha-acid hop variety with verticillium wilt resistance.

**Key words:** multicriteria model, DEXi, hop breeding.

---

<sup>1</sup> Prof. dr., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije in Fakulteta za kmetijstvo in biosistemske vede Univerze v Mariboru, e-pošta: martin.pavlovic@ihps.si

<sup>2</sup> Fakulteta za kmetijstvo in biosistemske vede Univerze v Mariboru, e-pošta: manja.kumer124@gmail.com

<sup>3</sup> Prof. dr., Fakulteta za kmetijstvo in biosistemske vede Univerze v Mariboru, e-pošta: karmen.pazek@um.si

<sup>4</sup> Dr., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, e-pošta: andreja.cerenak@ihps.si

## 1 UVOD

V letu 2020 je Slovenija globalno (62.111 ha) s 1.480 ha na 6. mestu po površinah pridelave hmelja (IHGC, 2020). Na 125 posestvih v Savinjski dolini, na območju Slovenj Gradca in Radelj ob Dravi ter v okolici Ptuja, Ormoža, in Celja pridelujejo hmeljarji pretežno 4 tržno najzanimivejše sorte hmelja. Te so: Aurora (558 ha, 38 %), Celeia (465 ha, 31 %), Savinjski golding (157 ha, 11 %) in Bobek (141 ha, 10 %). Ostalih 15 sort hmelja je v pridelavi v manjšem obsegu (IHPS, 2020). Žlahtnjenje hmelja poteka na IHPS v Žalcu že od ustanovitve v letu 1952. Poleg tradicionalne sorte Savinjski golding, 11 domačih sort poimenovanih z začetnicami A, B in C iz obdobja prvih 40 let obstoja IHPS, je val dišavnega hmelja naplaval od 2007 dalje še 9 uradno priznanih sort, 8 z imensko oznako Styrian, od tega 6 aromatično-dišavnih.

Pri izboru številnih potencialno perspektivnih križancev za postopek priznavanja v novo sorto in nadaljnjo komercialno pridelavo je lahko ekspertnemu timu v pomoč tudi večparametrsko modelno odločanje. Cilj pričujoče raziskave je bil modelno oceniti žlahtniteljsko kakovost analiziranih križancev glede na njihovo tržno perspektivnost. Razviti model predstavlja možnost razvoja dodatnega orodja za izbiro tržno perspektivnih križancev v postopku njihovega potrjevanja v nove komercialne sorte.

## 2 VEČKRITERIJSKO MODELIRANJE DEX V KMETIJSTVU

Večkriterijsko modelno ocenjevanje z metodo DEX je že dve desetletji v uporabi na področju kmetijstva. Metoda DEX je kvalitativna in temelji na izgradnji odločitvenih modelov, ki vsebujejo hierarhijo kriterijev in odločitvena pravila za združevanje diskretnih opisnih vrednosti kriterijev (Bohanec in Rajkovič, 2020). Na vzorčni ekološki kmetiji so s pomočjo programa KARSIM 1.0 analizirali pet različnih poslovnih možnosti, kamor so vključili različne proizvodne stroške in finančni rezultat. V raziskavo so vključili tudi metodo DEX, oz. računalniški program DEXi (Pažek in sod., 2006). Bohanec in sod. (2008) so s pomočjo večkriterijskega modeliranja ocenjevali ustreznost uporabe gensko spremenjenih in nespremenjenih sort koruze. Večkriterijski odločitveni model po metodah DEX in AHP (analitično hierarhični proces) je na podlagi rezultatov predhodne anketne analize baziral raziskavi ocene kakovosti ponudbe storitev turističnih kmetij in posledično njihovega rangiranja po kakovosti njihove ponudbe (Rozman in sod. 2009). Za primerjalno oceno tržne perspektivnosti križancev hmelja so v sodelovanju IHPS in Fakultete za kmetijstvo in biosistemske vede (FKBV) razvili model z metodo DEX, kjer so na podlagi kriterijev biologija, kemija, morfologija in pivovarska vrednost primerjali slovenske križance hmelja z nemško referenčno sorto Hallertauer Magnum (Pavlovič in sod., 2011). Rezultati vrednotenja travniških nasadov z metodo DEX, posebej razvitim točkovnim sistemom (TB

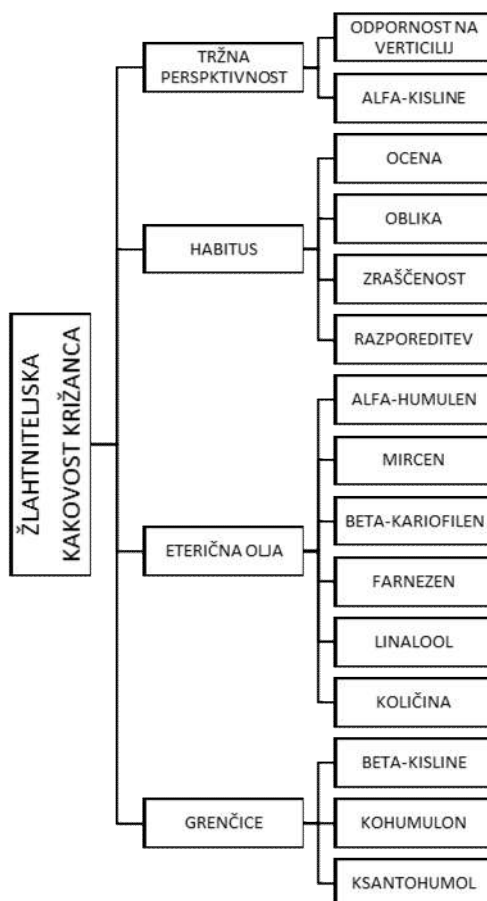


metoda) in AHP metodo na območju vzhodnega Pomurja ilustrirajo medsebojno uspešno dopolnjevanje metod pri interpretaciji rezultatov (Antolin, 2010; Pamič, 2014). Pozderek (2012) je s pomočjo razvitih simulacijskih modelov ocenjeval ekonomske parametre za pridelavo zelenjave na integrirani način, obdobje v preusmeritvi in uporabnost za ekološko pridelavo v zaščitenem prostoru. Z večkriterijskim modelom ekspertnega sistema DEXi so ocenjevali prehranske izdelke z gorsko-hribovskih območij, vključili 10 različnih prehranskih izdelkov in prikazali rezultate za faze proizvodnje in trženja (Prišenk in sod., 2014). S pomočjo ekspertnega sistema DEXi so preliminarно analizirali štiri različne komercialne mlečne izdelke, raziskavo pa kombinirali tudi ekonometričnim modeliranjem odziva potrošnikov na povišanje cen mleka z nizko vsebnostjo maščob (Pažek in sod., 2014). Kandal (2015) je za končno izbiro pri nakupu traktorja z metodologijo DEX primerjalno ocenjeval tehnološke in ekonomske parametre 4 različnih znamk vozil. V Bosni in Hercegovini so z metodo DEX analizirali kmetije z različnim številom molznic: 5, 15, 25 ter 45 in ugotovili, da se pričakovano ekonomsko najbolje izkaže kmetija z največjim številom krav (Rozman in sod., 2016). Na podlagi anketne analize in ekspertnega sistema DEXi so ocenjevali možnosti preusmeritve 68 kmetij v Sloveniji v vrtnarstvo (Nikoloski in sod., 2017). S pomočjo predhodno razvitih orodij (DEXi in FisPro) so v Franciji razvili novejšo orodje CONTRA, ki se uporablja za večkriterijsko modeliranje v kmetijstvu (Bockstaller in sod., 2017). Z ekspertnim sistemom DEXi so v Iranu tudi modelno ocenjevali okoljske, ekonomske in socialne vidike različnih sistemov pridelave krompirja (Rezaei in sod., 2018).

### **3 MATERIALI IN METODE DE LA**

#### **3.1 Vhodni podatki križancev za modelno ocenjevanje**

V raziskavo modelne ocene žlahtniteljske kakovosti oz. tržne perspektivnosti smo vključili 20 izbranih križancev hmelja z IHPS: 284/81, 50/84, 66/61, 69/199, 75/42, 79/80, 109/27, 112/58, 116/130, 137/159, 143/98, 160/79, 160/147, 163/13, 167/107, 168/104, 173/4, 174/58, 204/11 in 207/205. Določili smo vhodne podatke za večkriterijski model, s katerimi smo določili osnovne modelne parametre in njihovo pomembnost pri vrednotenju: tržna perspektivnost, habitus, eterična olja, grenčice. Opredelili smo tudi parametre drugega nivoja. Cilj izbora je bil križanec z visoko vsebnostjo alfa-kislin in visoko odpornostjo na verticilijsko uvelost hmelja ob primernem habitusu rastline.



**Slika 1:** Drevo kriterijev modela za ocenjevanje žlahtniteljske kakovosti križancev hmelja.

Prvi kriterij (tržna perspektivnost) je vključeval 2 parametra: odpornost na verticilijsko uvelost in vsebnost alfa-kislin. Pri drugem (habitus) smo ocenjevali splošno oceno habitusa, obliko, zraščenoost storžkov in razporeditev storžkov po rastlini. Tretji vir vhodnih podatkov je predstavljala količina in sestava eterična olja. V preglednici 1 so prikazani povprečni rezultati analiz eteričnega olja iz večletne pridelave za posameznega križanca, dobljeni s plinsko kromatografijo. Četrta vir podatkov so v modelu predstavljale grenčice, z ocenami večletnih povprečnih vsebnosti (v %) beta-kislin v suhi snovi storžkov, delež (%) kohumulona znotraj alfa-kislin in ksantohumola v suhi snovi storžkov.

**Preglednica 1:** Podatki za modelni kriterij 'eterična olja' v mL/100 g hmelja.

KRIŽANEC	OCENA	ALFA-HUMULEN	MIRCEN	BETA-KARIOFILEN	FARN EZEN	LINALOOL	KOLIČINA (mL/100 g)
<b>284/81</b>	nadpovprečna	19,09	48,26	9,91	0,22	0,74	2,84
<b>50/84</b>	neizrazita	17,71	42,98	5,96	10,57	0,26	1,84
<b>66/61</b>	povprečna	23,17	47,63	7,99	5,89	0,95	2,18
<b>69/199</b>	povprečna	0,53	67,08	2,16	6,00	0,88	2,15
<b>75/42</b>	neizrazita	17,81	50,18	7,37	9,02	0,56	3,53
<b>79/80</b>	nadpovprečna	8,67	62,87	2,67	6,27	0,80	2,16
<b>109/27</b>	povprečna	16,28	44,93	7,29	14,32	0,28	2,54
<b>112/58</b>	neizrazita	9,97	46,97	3,54	5,24	0,49	1,72
<b>116/130</b>	povprečna	18,71	51,65	8,77	2,48	0,63	1,65
<b>137/159</b>	neizrazita	20,03	37,36	8,34	17,61	0,28	1,30
<b>143/98</b>	neizrazita	0,99	29,40	4,36	4,93	0,26	1,00
<b>160/79</b>	povprečna	17,27	53,99	7,05	0,76	0,55	1,86
<b>160/147</b>	povprečna	15,65	36,92	9,91	9,49	0,26	0,93
<b>163/13</b>	neizrazita	12,32	50,67	4,19	10,87	0,65	2,30
<b>167/107</b>	neizrazita	15,08	50,01	6,43	0,03	0,67	3,64
<b>168/104</b>	neizrazita	17,25	59,23	5,19	0,16	0,95	2,61
<b>173/4</b>	neizrazita	19,99	57,04	5,70	0,03	0,57	3,40
<b>174/58</b>	neizrazita	19,63	37,76	11,63	6,45	0,22	3,11
<b>204/11</b>	nadpovprečna	8,31	52,97	4,51	3,29	0,54	1,63
<b>207/205</b>	povprečna	10,00	49,43	5,79	6,66	0,34	1,23

### 3.2 Razvoj večparametrskega odločitvenega modela

Večkriterijski model temelji na metodi DEX, v programu DEXi 5.02 in v 5 korakih: (1) identifikacija odločitvenega problema, (2) identifikacija kriterijev, (3) definicija funkcije koristnosti, (4) opis variant ter (5) vrednotenje in analiza variant (Bohanec in Rajkovič, 2020).

Modelno smo ocenjevali žlahtniteljsko kakovost analiziranih križancev glede na njihovo tržno perspektivnost. Določili smo osnovne kriterije (slika 1): tržna perspektivnost, habitus, eterična olja in grenčine, kriterije drugega nivoja, jim določili smiselne zaloge vrednosti (slika 2) in jih s tem prekategORIZIRALI v attribute.

Kriterij	Zaloqa vrednosti
ŽLAHTNITELJSKA KAKOVOST KRIŽANCA	SLABA; DOBRA; <b>ODLIČNA</b>
TRŽNA PERSPEKTIVNOST	SLABA; DOBRA; <b>ODLIČNA</b>
—ODPORNOST NA VERTICILIJ	<b>visoko občutljiv</b> ; občutljiv; srednje; <b>odporen</b> ; <b>visoko odporen</b>
—ALFA-KISLINE	nizka; srednja; <b>visoka</b>
HABITUS	SLABO; DOBRO; <b>ODLIČNO</b>
—OCENA HABITUSA	<b>podpovprečen</b> ; povprečen; <b>nadpovprečen</b>
—OBLIKA RASTLINE	<b>manj zaželen</b> ; srednje zaželen; <b>najbolj zaželen</b>
—ZRAŠČENOST STORŽKOV	<b>najmanj zaželen</b> ; srednje zaželen; <b>najbolj zaželen</b>
—RAZPOREDITEV STORŽKOV	<b>manj zaželen</b> ; srednje zaželen; <b>najbolj zaželen</b>
ETERIČNA OLJA	nizka; srednja; <b>visoka</b>
—ALFA-HUMULEN	nizka; <b>visoka</b>
—MIRCEN	nizka; <b>visoka</b>
—BETA-KARIOFILEN	nizka; <b>visoka</b>
—FARNEZEN	nizka; <b>visoka</b>
—LINALOOL	nizka; <b>visoka</b>
—KOLIČINA ETERIČNEGA OLJA	nizka; <b>visoka</b>
—AROMA	<b>neizrazita</b> ; povprečna; <b>nadpovprečna</b>
GREŃČICE	nizka; srednja; <b>visoka</b>
—BETA-KISLINE	nizka; srednja; <b>visoka</b>
—KOHUMULON	<b>visoka</b> ; srednja; <b>nizka</b>
—KSANTOHUMOL	nizka; srednja; <b>visoka</b>

*Slika 2: Zaloge vrednosti za oceno žlahtniteljske kakovosti križancev.*

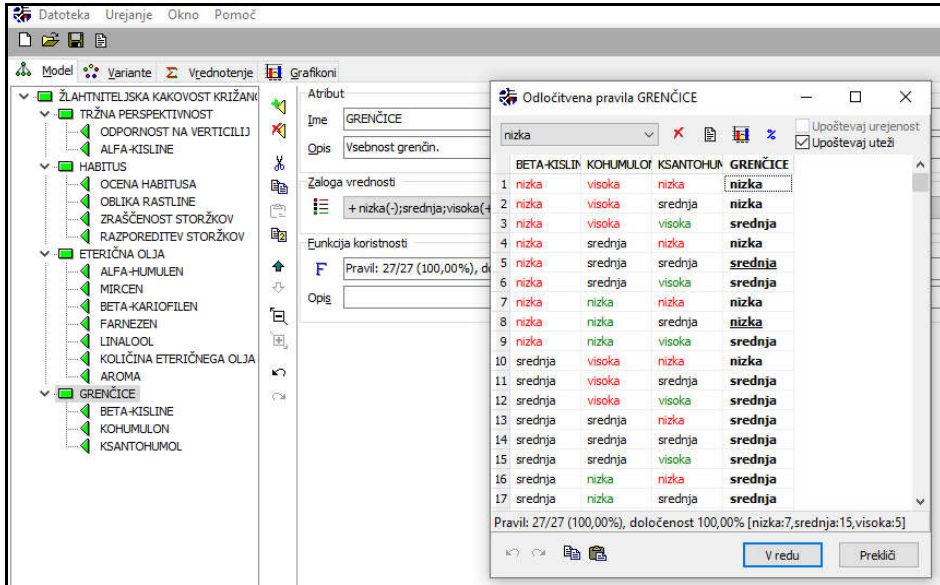
Z definicijo funkcij koristnosti opredelimo funkcije, kjer nižji kriteriji vplivajo na višje ležeče vse do končne ocene. Funkcijo koristnosti sestavljajo odločitvena pravila. Z njimi določimo izračun kriterijev nižjega nivoja in posledično še izračun kriterijev višjega nivoja. Primer odločitvenih pravil v programu je prikazan na sliki 3. Funkcije koristnosti za posamezni kriterij smo določili s pomočjo vnaprej določenih uteži. Z utežmi v modelu smo ciljno definirali stopnje pomembnosti kriterijev, ki vplivajo na našo končno odločitev. Uteži v modelu so upošteevane v obliki funkcije, ki je prikazana spodaj. Kriteriji so označeni z »x«, uteži pa z »w« (Bohanec, 2015).

$$f(X_1, X_2, \dots, X_n) = w_0 + w_1 \times X_1 + w_2 \times X_2 + \dots + w_n \times X_n \quad (1)$$

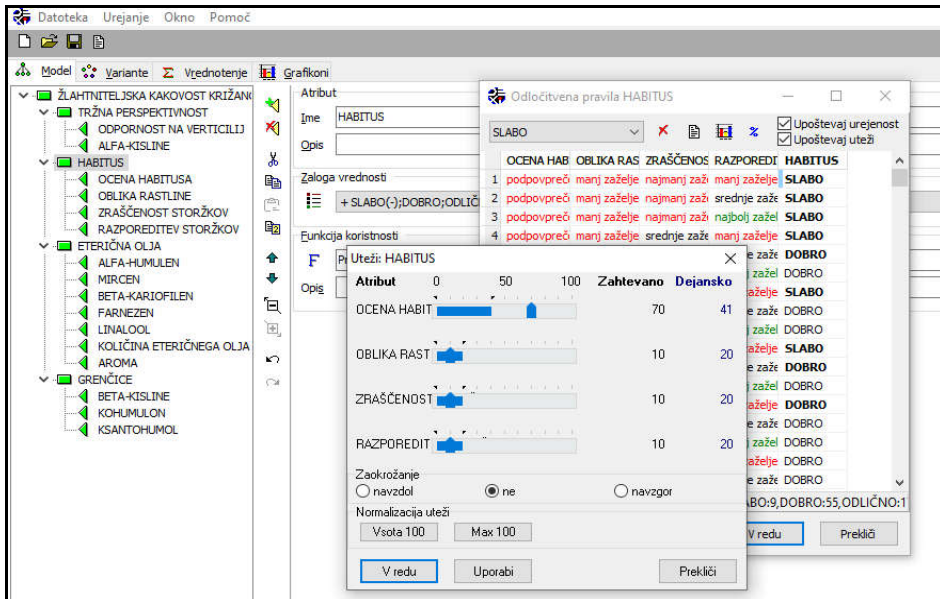
Uteži smo nato upoštevali pri sami izgradnji modela v programu DEXi, kot je prikazano na sliki 3. Na podlagi izbire normalizacije uteži (»Vsota 100« ali »Max 100«) nam je program sam izbral upošteevano vrednost uteži.

Z modelom definiramo t.i. lokalne in globalne vrednosti uteži kriterijev ter tudi normalizirane uteži na lokalni ter globalni ravni. Bohanec (2015) je lokalne povprečne uteži definiral kot uteži, ki neposredno vplivajo na kriterij višje ravni. Globalne povprečne uteži pa vplivajo na vrednost, ki jo ima najvišji kriterij. Primer: Kriterij »oblika rastline« ima 20-% vpliv na nadrejeni kriterij »habitus« (lokalni učinek) in 5-% vpliv na žlahtniteljsko kakovost križanca (globalni učinek).

Kriterij »vsebnost kohumulona« ima 19-% vpliv na nadrejeni kriterij »grenčice« (lokalni učinek) in 5-% vpliv na žlahtniteljsko kakovost križanca (globalni učinek).



Slika 3: Okno za določitev odločitvenih pravil pri kriteriju »grenčice«.



Slika 4: Okno za določitev uteži modelnim kriterijem.

V programu DEXi smo opisali vsak scenarij posebej z zalogo vrednosti naših osnovnih kriterijev in na podlagi vhodnih podatkov ocenili končno oceno variant. Npr. pri kriteriju »tržna perspektivnost« smo križance ocenili s slabo, dobro ali odlično oceno. Pri tem kriteriju smo upoštevali odpornost na verticilij in vsebnost alfa-kislin (v %) za vsakega križanca. Pri odpornosti na verticilij smo križance označili z: visoko občutljiv, občutljiv, srednje odporen, odporen in visoko odporen. Glede na vsebnost alfa-kislin (%) smo križance razdelili v tri skupine: nizka, srednja in visoka vrednost, itd.

## 4 REZULTATI Z RAZPRAVO

### 4.1 Ocena križancev hmelja glede na različne kriterije

Pri vsakem križancu smo analizirali vse štiri glavne kriterije, in sicer tržno perspektivnost, habitus, vsebnost eteričnih olj in grenčic. Na podlagi rezultatov glavnih kriterijev smo ocenili tudi samo žlahtniteljsko kakovost za vseh 20 izbranih križancev hmelja, kar je predstavljalo tudi cilj raziskave. Rezultati delijo analizirane križance v tri skupine, in sicer: križanci, ki imajo slabo žlahtniteljsko kakovost, križance, ki imajo dobro žlahtniteljsko kakovost in križance z odlično žlahtniteljsko kakovostjo upoštevajoč zastavljene kriterije raziskave.

V prvo skupino križancev z odlično žlahtniteljsko kakovostjo (visoka vsebnost alfa-kislin, visoka odpornost na verticilijsko uvelost hmelja) se je uvrstil le križanec 207/205. V drugo skupino (dobra žlahtniteljska kakovost) spada največ primerkov iz naše raziskave (18), in sicer: 284/81, 50/84, 66/61, 69/199, 75/42, 79/80, 109/27, 112/58, 116/130, 137/159, 143/98, 160/79, 163/13, 167/107, 168/104, 173/4, 174/58 in 204/11. V tretjo skupino (slaba žlahtniteljska kakovost) pa križanec hmelja 160/147.

Na sliki 5 so prikazani rezultati vrednotenja naključno izbranih križancev hmelja. Križanec 207/205 po modelnih kriterijih izstopa in ga ocenjujemo kot križanca, ki ima odlično žlahtniteljsko kakovost. Vse ostale zgoraj omenjene križance uvrščamo v skupino z dobro žlahtniteljsko kakovostjo. V članku predstavljamo opisne ocene osnovnih kriterijev najbolje ocenjenega križanca.

Kriterij	168/104	173/4	174/58	204/11	207/205
<b>ŽLAHNTITELJSKA KAKOVOST KRIŽANCA</b>	DOBRA	DOBRA	DOBRA	DOBRA	<b>ODLIČNA</b>
—TRŽNA PERSPEKTIVNOST	<b>SLABA</b>	<b>SLABA</b>	DOBRA	DOBRA	<b>ODLIČNA</b>
—ODPORNOST NA VERTICILIJ	<b>občutljiv</b>	<b>občutljiv</b>	srednje	<b>odporen</b>	<b>odporen</b>
—ALFA-KISLINE	srednja	<b>visoka</b>	<b>visoka</b>	srednja	<b>visoka</b>
<b>HABITUS</b>	DOBRO	DOBRO	DOBRO	DOBRO	<b>ODLIČNO</b>
—OCENA HABITUSA	povprečen	povprečen	povprečen	povprečen	<b>nadpovprečen</b>
—OBLIKA RASTLINE	<b>manj zaželjen</b>	srednje zaželjen	<b>najbolj zaželjen</b>	<b>najbolj zaželjen</b>	<b>najbolj zaželjen</b>
—ZRAŠČENOST STORŽKOV	srednje zaželjen	<b>najbolj zaželjen</b>	srednje zaželjen	<b>najbolj zaželjen</b>	srednje zaželjen
—RAZPOREDITEV STORŽKOV	<b>manj zaželjen</b>	<b>najbolj zaželjen</b>	srednje zaželjen	srednje zaželjen	srednje zaželjen
<b>ETERIČNA OLJA</b>	srednja	<b>nizka</b>	<b>nizka</b>	srednja	<b>nizka</b>
—ALFA-HUMULEN	<b>nizka</b>	<b>visoka</b>	<b>visoka</b>	<b>nizka</b>	<b>nizka</b>
—MIRCEN	<b>visoka</b>	<b>visoka</b>	<b>nizka</b>	<b>visoka</b>	<b>visoka</b>
—BETA-KARIOFILEN	<b>nizka</b>	<b>nizka</b>	<b>visoka</b>	<b>nizka</b>	<b>nizka</b>
—FARNEZEN	<b>nizka</b>	<b>nizka</b>	<b>visoka</b>	<b>nizka</b>	<b>visoka</b>
—LINALOOL	<b>visoka</b>	<b>nizka</b>	<b>nizka</b>	<b>nizka</b>	<b>nizka</b>
—KOLIČINA ETERIČNEGA OLJA	<b>visoka</b>	<b>visoka</b>	<b>visoka</b>	<b>visoka</b>	<b>nizka</b>
—AROMA	<b>neizrazita</b>	<b>neizrazita</b>	<b>neizrazita</b>	<b>nadpovprečna</b>	povprečna
<b>GREŇČICE</b>	srednja	srednja	<b>visoka</b>	srednja	<b>visoka</b>
—BETA-KISLINE	srednja	<b>visoka</b>	<b>visoka</b>	srednja	<b>visoka</b>
—KOHUMULON	<b>nizka</b>	srednja	<b>nizka</b>	srednja	<b>nizka</b>
—KSANTOHUMOL	srednja	srednja	srednja	srednja	srednja

**Slika 5:** Rezultati vrednotenja dela križancev hmelja.

## 4.2 Vpliv kriterijev na oceno žlahtniteljske kakovosti križancev

Na podlagi rezultatov raziskave je bil križanec hmelja 207/205 edini, ki je bil ocenjen z odlično žlahtniteljsko kakovostjo (slika 6). K temu so pripomogli skoraj vsi rezultati glavnih kriterijev, in sicer: »tržna perspektivnost«, »habitus« in »vsebnost grenčic«. Za vse našteje kriterije je bil križanec ocenjen kot »odličen«. Izjema je bila pri kriteriju »eterična olja«, kjer je bil ocenjen kot križanec z nizko vsebnostjo eteričnih olj. Ta ocena je bila posledica nizkih vsebnosti alfa-humulena, beta-kariofilena, linaloola in majhnih količin eteričnega olja. Vendar to ni vplivalo na končno najboljšo modelno oceno v raziskavi, za katero je bila sestava in količina eteričnih olj ciljno manj pomembna.



**Slika 6:** Ocena žlahtniteljske kakovosti osnovnih kriterijev križanca 207/205.

### 4.2.3 Uporabna vrednost modela

Pričujoča raziskava ilustrira možnosti uporabe metode DEX pri modeliranju variantnih scenarijev za odločitve pri žlahtnjenju hmelja. Velja izpostaviti, da je za podrobnejšo analizo žlahtniteljske vrednosti križancev nujno potrebna nadaljnja nadgradnja modela. Prikazani primer je upošteval le manjši del kriterijev, ki jih sicer žlahtnitelj uporablja pri odločitvah v okviru razvoja novih sort. Prednost modela se je izkazala v možnosti hitre pridobitve mnenja o posameznih križancih v kolikor se uteži posameznih atributov spremenijo (npr. manjša pomembnost vsebnosti alfa-kislin pri izbiri aromatičnih sort), kar je iz vidika registracije sort in njihove nadaljnje pridelave lahko različnega pomena (odpornost na verticilijsko uvelost je ključnega pomena za posamezna območja pridelave, za določena območja pa manj). V kolikor bi model v prihodnje omogočal procesiranje bistveno večjega števila podatkov, kot so jih sposobni analizirati človeški možgani, bi bil lahko zelo uporaben pripomoček v žlahtniteljskih programih različnih kmetijskih rastlin.

## 5 VIRI

Antolin, D. Ocenjevanje travniških nasadov z metodama TB in DEX na področju vzhodnega Pomurja (diplomsko delo). Univerza v Mariboru, Fakulteta za kmetijstvo in



- biosistemske vede, Maribor. 2010. Dostopno na: <https://dk.um.si/Dokument.php?id=13218> [2. 3. 2020].
- Bockstaller, C., Beauchet, S., Manneville, V., Amiaud, B. in Botreau, R. A tool to design fuzzy decision trees for sustainability assessment. *Environmental Modeling & Software*. 2017; 97: 130-144.
- Bohanec, M., Messean, A., Scatata, S., Angevin, F., Griffiths, B., Henning Krogh, P., Džerovski, S. A qualitative multi-attribute model for economic and ecological assessment of genetically modified crops. 2008. Dostopno na: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.lib.ukm.si/science/article/pii/S0304380008001063> [24. 8. 2020].
- Bohanec, M. DEXi: Program for multi-attribute decision making user's manual. 2015. Dostopno na: <https://kt.ijs.si/MarkoBohanec/pub/DEXiManual500.pdf> [7. 3. 2020].
- Bohanec, M., Rajkovič, V. Večparametrsko odločanje. 2020. Dostopno na: <https://kt.ijs.si/MarkoBohanec/org95/index.html> [7. 3. 2020].
- IHGC. Economic Commition - Summay Reports. International Hop Growers' Convention. Video call meeting. 9. 11. 2020. 27 p.
- IHPS. Podatki o hmeljnih površinah v Republiki Sloveniji iz RKG, po sortah. Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije. 4. 8. 2020; 2 s.
- Kandal, Z. Uporaba metodologije DEX pri odločitvi o nakupu traktorja (magistrsko delo). Univerza v Mariboru, Fakulteta za kmetijstvo in biosistemske vede, Maribor. 2015. Dostopno na: <https://dk.um.si/Dokument.php?id=70714> [2. 3. 2020].
- Nikoloski, T., Udovč, A., Pavlovič, M., Rajkovič, U. Farm reorientation assessment model based on multi-criteria decision making. *Computers and electronics in agriculture*. 2017; 140: 237-243.
- Pamič, S. Večparametrski modeli ocenjevanja travniških nasadov (magistrsko delo). Univerza v Mariboru, Fakulteta za kmetijstvo in biosistemske vede, Maribor. 2014. Dostopno na: <https://dk.um.si/Dokument.php?id=67644> [2. 3. 2020].
- Pavlovič, M., Čerenak, A., Pavlovič, V., Rozman, Č., Pažek, K., Bohanec, M. Development of DEX-HOP multi-attribute decision model for preliminary hop hybrids assessment. *Computers and electronics in agriculture*. 2011; 75(1): 181-189.
- Pažek, K., Rozman, Č., Borec, A., Turk, J., Majkovič, D., Bavec, M., Bavec, F. The use of multi criteria models for decision support on organic farms. *Biol. Agric. Hort*. 2006; 24(1): 73-89.
- Pažek, K., Turk, J., Hari, S., Rozman, Č., Prišenk, J. Multi-criteria and econometric evaluation of dairy products. 2014. Dostopno na: [https://www.researchgate.net/publication/262698034\\_Multi-criteria\\_and\\_econometric\\_evaluation\\_of\\_dairy\\_products](https://www.researchgate.net/publication/262698034_Multi-criteria_and_econometric_evaluation_of_dairy_products) [4. 3. 2020].
- Pozderec, S. Razvoj večkriterijskega modela za oceno načina pridelave zelenjave v zaščitenem prostoru (magistrsko delo). Univerza v Mariboru, Fakulteta za kmetijstvo in biosistemske vede, Maribor. 2012. Dostopno na: <https://dk.um.si/Dokument.php?id=48030> [2. 3. 2020].
- Prišenk, J., Rozman, Č., Pažek, K., Turk, J., Bohak, Z., Borec, A. A multi-criteria assessment of the production and marketing systems of local mountain food. *Renewable agriculture and food systems*. 2014; 29(4): 345-354.
- Rezaei, M.E., Barmaki, M., Veisi, H. Sustainability assessment of potato fields using the DEXI decision support system in Hamadan Provice, Iran. *Journal of integrative agriculture*. 2018; 17(11): 2583-2595.

- Rozman, Č., Potočnik, M., Pažek, K., Borec, A., Majkovič, D., Bohanec, M. A Multi-criteria assesment of tourist farm service quality. *Tourism management*. 2009; 30: 629-637.
- Rozman, Č., Grgić, Z., Maksimović, A., Čejvanović, F., Puška, A., Šakić Bobić, B. Multiple-criteria approach of evaluation of milk farm models in BiH. *Mljekarstvo: proizvodnja proučavanje i tehnologija mlijeka i mliječnih proizvoda*. 2016; 66(3): 206-214.

## PRIMERJAVA FEROMONSKIH IN SVETLOBNIH VAB ZA SPREMLJANJE KORUZNE VEŠČE (*Ostrinia nubilalis* Hübner)

Magda RAK CIZEJ<sup>1</sup> in Franček POLIČNIK<sup>2</sup>

Strokovni članek / professional article

Prispelo / received: 22. 10. 2020

Sprejeto / accepted: 7. 12. 2020

### Izvleček

Koruzna vešča (*Ostrinia nubilalis*) je nočni metulj, katerega let uspešno spremljamo s svetlobno vabo, za katero potrebujemo vir električne energije. Populacija koruzne vešče je glede na zastopanost gostiteljskih rastlin mikrolokacijsko zelo različna. V poskusu smo želeli preveriti učinkovitost prenosljive, energetske neodvisne, avtomatske svetlobne vabe Trapview AURA, opremljene z LED diodami in nadgrajeno s stožčasto pastjo iz žične mreže ter uporabo feromona seva E (trans) 11-tetradecenil acetat, ki je spolni feromon in privablja samčke koruzne vešče. V letu 2019 smo v hmeljišču na lokaciji Roje pri Žalcu s klasično svetlobno vabo, na katero se lovita oba spola koruzne vešče, ulovili skupno 1340 koruzne vešče, od tega je bilo 467 (34,8 %) samic in 873 (65,2 %) samčkov. Z vabo Trapview AURA skupaj s feronomom E se lovijo samo samci koruzne vešče. Z nadgrajeno vabo Trapview AURA smo ulovili 55 samcev (6,3 % samcev v primerjavi s klasično svetlobno vabo). Z nadgrajeno svetlobno vabo Trapview AURA, ki smo jo v letu 2020 preizkušali v treh hmeljiščih, je bil ulov samcev v primerjavi s klasično svetlobno vabo med 4,0 % in 4,9 %, kar je odličen rezultat glede na delta trap feromonsko vabo, kjer nismo ulovili nobenega samca koruzne vešče.

**Ključne besede:** *Ostrinia nubilalis*, *Humulus lupulus*, svetlobna vaba, feromoni

## COMPARISON OF PHEROMONE AND LIGHT TRAPS FOR EUROPEAN CORN BORER (*Ostrinia nubilalis* Hübner) MONITORING

### Abstract

The corn borer, *Ostrinia nubilalis*, is a night moth, whose flight is successfully monitored with light trap, for which need a source of electricity. The population of corn borer is very different depending on the representation of host plants in different microlocation. In the experiment, we wanted to test the effectiveness of a mobile, energy-independent, automatic light trap Trapview AURA improved with

<sup>1</sup> Dr., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Oddelek za varstvo rastlin, Cesta Žalskega tabora 2, SI-3310 Žalec, e-pošta: magda.rak-cizej@ihps.si

<sup>2</sup> Mag. inž. hort., prav tam, e-pošta: franci.policnik@ihps.si

LEDs and with wire mesh cone trap and the use of pheromone strain E (trans) 11-tetradecenyl acetate, which is a sex pheromone and attracts male of corn borer.

In 2019, we caught 1340 butterflies of ECB at the location Roje by Žalec with a classical light trap which caught both sex of European corn borer; 467 females (34.8%) and 873 males (65.2%). Trapview AURA with the pheromone E caught only males of European corn borer. In 2019, we caught 55 males of ECB in Roje by Žalec on improved Trapview AURA (6.3% of males like on the classical light trap). With the improved Trapview AURA, which we tested in three hop gardens in 2020, the catch of males was between 4.0% and 4.9% compared to the classic light traps, which is an excellent result compared to the delta pheromone bait, where we didn't catch European corn borer males.

**Key words:** *Ostrinia nubilalis*, *Humulus lupulus*, light trap, pheromone

## 1 UVOD

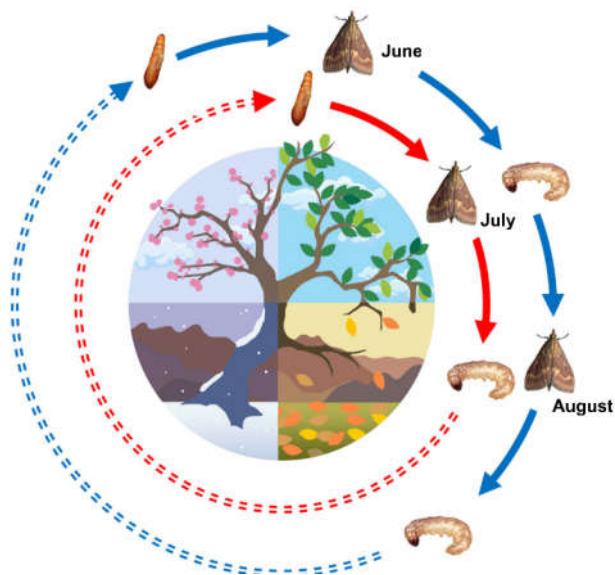
Koruzna vešča (*Ostrinia nubilalis* Hbn.) je polifagna vrsta (Bengtsson in sod., 2006), ki se prehranjuje s približno 200 rastlinskimi vrstami. V Sloveniji povzroča največjo škodo predvsem na koruzi in hmelju, čeprav jo vse pogosteje srečujemo tudi pri pridelavi zelenjave (npr. paprike, paradižnika, fižola) in na okrasnih rastlinah (npr. dalijah, krizantemah, gladijolah) (Rak Cizej in sod., 2010). Koruzna vešča je škodljivec hmelja v večjem delu Savinjske doline, ki povzroča izgube pridelka in vpliva na kakovost hmelja. V zadnjih 5 letih se je prisotnost škodljivca znatno povečala, opažena je tudi povečana gospodarska škoda na gostiteljskih rastlinah, zlasti na hmelju in koruzi (Rak Cizej in Trematerra, 2017).

Vešča je nočni metulj, katere odrasli metulji začnejo leteti, ko je temperatura zraka nad 13 °C. Podnevi se nahaja v gosti podrasti ali visoki travi, kjer je visoka relativna zračna vlaga. Visoka relativna zračna vlaga ugodno vpliva na njeno parjenje. Samice oddajo v nočnem času feromon, ki privlači samce. Značilnost koruzne veščice je, da se večkrat pariyo. Samice odlagajo jajčeca na spodnjo stran listov gostiteljskih rastlin. Poleg koruze in hmelja, ki sta glavni gostiteljski rastlini, napada tudi samonikle rastline, in sicer zelo pogosto navadni pelin (*Artemisia vulgaris* L.) (Bontemps in sod., 2004; Leniaud in sod., 2006; Leppik, 2011).

Na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije že preko 40 let spremljamo dinamiko leta koruzne veščice. Koruzna vešča ima v osrednjem delu Slovenije dve generaciji letno. Prva generacija se pojavi v začetku maja in traja do sredine meseca junija. Gosenice prve generacije povzročajo poškodbe na hmelju in koruzi z vrtanjem v stebela in listne peclje. Sledi druga generacija, ki doseže vrh konec julija in v začetku avgusta. Ličinke te generacije povzročajo poškodbe predvsem na storžkih hmelja in koruznih storžih (Rak Cizej in Trematerra, 2017). Ob večjem napadu koruzne veščice se zmanjša količina in kakovost pridelka gojene rastline.

Poleg tega lahko škodljivec skupaj z visokimi temperaturami in pomanjkanjem padavin povzroči popoln propad rastline (Rak Cizej in Trematerra, 2017).

Koruzna večča je razdeljena na dve feromonski rasi, za katere je značilna glavna komponenta feromonskega stereoizomera, Z (cis) ali E (trans) 11-tetradecenil acetat, ki ga izločajo samice koruzne večče za iskanje partnerjev. Zhukovskaya in sod. (2020) navajajo, da feromonska rasa (Z) napada predvsem koruzo, medtem ko se feromonska rasa E naseli in poškoduje tudi druge rastline. Poleg dveh znanih feromonskih ras obstajajo tudi trije ekotipi koruzne večče, kateri se razlikujejo po voltinizmu (uni-voltilna ima eno generacijo letno, bi-voltilna ima dve generaciji letno in multi-voltilna, ki ima več generacij letno). V Sloveniji prevladuje bi-voltilni ekotip koruzne večče feromonske rase E, katera napada predvsem hmelj, poškodbe pa povzroča tudi na koruzi (Rak Cizej in Trematerra, 2017; Tóth in sod., 2017; Leppik, 2011; Wadsworth in sod., 2020).



**Slika 1:** Prikaz razvoja dveh različnih ekotipov koruzne večče (*Ostrinia nubilalis* Hbn.) glede na letni čas. V notranjosti krožnice je označen razvojni krog ekotipa uni-voltilne koruzne večče (feromonska rasa Z, ki se pari v sredini julija). V zunanji krožnici je prikazan razvoj ekotipa bi-voltilne koruzne večče (feromonska rasa E), kjer je čas prvega parjenja v začetku junija, drugo pa pozno v avgustu (Wadsworth in sod., 2020).

Nočne metulje, kamor sodi tudi koruzna večča (*Ostrinia nubilalis*) je mogoče spremljati s svetlobnimi ali feromonskimi vabami. Svetlobna vaba se je izkazala za najbolj zanesljivo metodo spremljanja metuljev koruzne večče (Pelozuelo in Frerot,

2007), na katero se ulovita ob spola (samičke kot tudi samci), po dosedanjih podatkih so feromoni namreč manj zanesljivi. Slabost svetlobne vabe je vir električne energije, katerega ni mogoče imeti na vsaki opazovani lokaciji ter intenzivnost dela. Pri svetlobni vabi je potrebno vsak dan dodajati kemikalijo, npr. kloroform, ki omamlja ulovljene žuželke, ter dnevno pobirati ulovljene žuželke. Če koruzno veščo spremljamo s feromonskimi vabami, je potrebno najprej vedeti, katero raso koruzne vešče imamo na določenem območju in izbrati najprimernejšo obliko vabe (Pelozuelo in Frerot, 2006; Pelozuelo in Frerot, 2007). Na feromonsko vabo se ulovijo samo samci, ki jih privabi spolni feromon samic. Pasti s feromonskimi vabami se uporabljajo za spremljanje leta koruzne vešče. Kot najbolj učinkovita vaba vešče se je izkazala uporaba feromona s stožčasto pastjo iz žične mreže (Pelozuelo in Frerot, 2007). Poleg oblike vabe je pomembna tudi njena postavitev, kar je odvisno od višine gostiteljske rastline. Najbolje je, da je feromonska vaba postavljena 10 cm nad višino rastline (Pelozuelo in Frerot, 2007). Pri hmelju je težje postaviti vabo višje od 6 m, ki je običajno maksimalna višina hmelja. Kljub temu pa je potrebno pristopiti k raziskavam uporabe in optimizacije različnih vab za spremljanje populacije koruzne vešče v hmelju. S pomočjo feromonskih vab bi lahko spremljali njeno populacijo na več lokacijah, saj je zastopanost koruzne vešče različna glede na mikrolokacijo. Če bi imeli več opazovanih točk spremljanja koruzne vešče, bi doprinesli k zanesljivi in natančni uporabi sredstev za zatiranje gosenic koruzne vešče na posamezni gostiteljski rastlini.

Metulje koruzne vešče na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije spremljamo s klasično svetlobno vabo, opremljeno z živosrebrno žarnico, že štiri desetletja. Ker želimo razširiti mrežo spremljanja koruzne vešče na posamezne mikrolokacije, smo zadnjih nekaj let pričeli s testiranjem avtomatske svetlobne vabe Trapview AURA (Rak Cizej in sod., 2015). Omenjena avtomatska svetlobna vaba je opremljena z UV led diodami, ki oddajajo polarizirano svetlobo, ki jo zazna koruzna veščica (Rak Cizej in sod., 2014). Vaba je za razliko od klasične vabe popolnoma neodvisna od električnega napajanja, saj ima svoj solarni panel za polnjenje baterije. Prav tako na ulove na avtomatski svetlobni vabi ne vplivajo vremenske razmere (predvsem dež).

Namen naše raziskave v letih 2019 in 2020 je bilo ugotoviti, kako uspešni smo lahko pri spremljanju populacije samcev koruzne vešče s pomočjo avtomatske svetlobne vabe Trapview AURA in uporabe feromona, glede na dejstvo, da vemo, da imamo na območju Savinjske doline E raso koruzne vešče (Rak Cizej in sod., 2010). Vaba Trapview AURA je opremljena z lepljivo podlago, katera je v obliki lepljive role in jo je mogoče zavrteti na daljavo preko računalnika, ter kamero, ki sliko ulovov koruzne vešče pošlje na strežnik. Tako je zjutraj na strežniku že mogoče preveriti ulove koruzne vešče, ulovljenih v pretekli noči. V nasprotju s klasično svetlobno vabo, pri vabi Trapview AURA, ni potrebno dnevno - fizično

pobiranje ulovov ter štetje, ker jih računalniški program določi in prešteje samodejno.

## **2 MATERIALI IN METODE**

### **2.1 Spremljanje metuljev koruzne vešče v letu 2019**

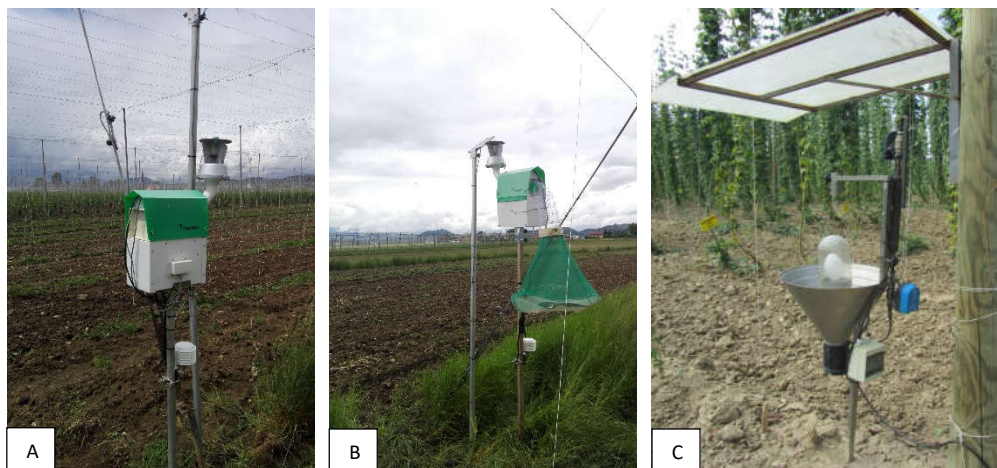
V letu 2019 smo na lokaciji Roje pri Žalcu v hmeljišču (D48/GK; X:512306, Y: 511479) spremljali let koruzne vešče s klasično svetlobno vabo z živosrebrno žarnico moči 160 W (slika 2C). Višina klasične svetlobne vabe je bila 1 meter od tal. V oddaljenosti 200 metrov od klasične svetlobne vabe smo na robu hmeljišča na lokaciji Roje pri Žalcu postavili avtomatsko svetlobno vabo Trapview AURA (D48/GK; X:5123009, Y:511674), proizvajalca EFOS d.o.o. Vaba Trapview AURA je bila postavljena na višini 1 meter od tal. Na vrhu vabe Trapview AURA, smo dodali feromon za spremljanje koruzne vešče seva E (slika 2A). Na drugi rob hmeljišča na Rojah pri Žalcu (D48/GK; X:5123494, Y:511305) smo postavili avtomatsko svetlobno vabo Trapview AURA, ki smo jo nadgradili s stožčasto pastjo iz žične mreže, v katero smo dodali feromon seva E za spremljanje koruzne vešče (slika 2B), saj je znano, da je najbolj učinkovita vaba za koruzno veščo, uporaba feromona skupaj s stožčasto pastjo iz žične mreže (Pelozuelo in Frerot, 2007). Proizvajalec feromona seva E je bil IPM Russels iz Anglije.

Avtomatski svetlobni vabi Trapview AURA, opremljeni z UV led diodami na vrhu in v notranjosti vabe, so svetile od 21. ure in do 2. ure zjutraj (dolžina svetlobe: 5 ur). Namreč glede na omejene možnosti akumulatorske baterije ni mogoč daljši čas. Klasična svetlobna vaba, opremljena z živosrebrno 160 W žarnico, je svetila od 21. ure do 5. ure zjutraj (dolžina svetlobe: 8 ur). Glede na poznavanje bionomije leta koruzne vešče, ki intenzivno leti med 23. uro in 2. uro zjutraj, je bila dolžina trajanja svetlobe na obeh vabah ustrezna.

Na klasični svetlobni vabi je dodan mehanizem za avtomatsko doziranje kemikalije kloroform, ki omamlja ulovljene osebkke na vabi. Kloroform se avtomatsko doda v vabo, ko se svetlobna vaba prižge. Dnevna količina dodanega kloroforma je 35–50 ml, odvisno od temperature zraka; večja količina se doda, ko je bolj toplo. Ulovljene metulje koruzne vešče smo na klasični svetlobni vabi pregledovali dnevno in določevali tudi spol.

Na avtomatskih svetlobnih vabah Trapview AURA smo tedensko spremljali ulove preko spletnega strežnika, kamor je mehanizem s pomočjo GPRS mobilnega prenosa podatkov pošiljal fotografije. Lepljivo rolo, ki jo ima avtomatska svetlobna vaba Trapview AURA za ulov škodljivcev v notranjosti mehanizma, smo samoočistili preko strežnika oziroma mobilne povezave na daljavo. Kljub temu da ima avtomatska vaba možnost štetja osebkov, smo preko kamere preverjali

pravilnost determinacije ulovljenih osebkov koruzne vešče. Menjava feromona E je bila na 14 dni. Spremljanje leta koruzne vešče v letu 2019 je potekalo od prve dekade maja do sredine septembra.



**Slika 2:** A - vaba Trapview AURA s feromonom E na zgornjem delu, B - vaba Trapview AURA (nadgrajena) s stožčasto pastjo iz žične mreže in uporabo feromona E na dnu stožca, C - klasična svetlobna vaba z živosrebrno žarnico za spremljanje koruzne vešče (*Ostrinia nubilalis*)

## 2.2 Spremljanje metuljev koruzne vešče v letu 2020

Glede na pozitivne izkušnje z avtomatsko svetlobno vabo Trapview AURA, nadgrajeno s stožčasto pastjo iz žične mreže in uporabo feromonom E za spremljanje koruzne vešče, smo z validacijo te vabe nadaljevali v letu 2020, in sicer na Rojah pri Žalcu (D48/GK; X:512306, Y: 511479) in v Žalcu (D48/GK; X:5122767, Y:512780), kjer sta bili postavljeni tudi klasični svetlobni vabi. Spremljanje koruzne vešče z vabo Trapview AURA s stožčasto pastjo iz žične mreže in feromonom E je potekalo na dveh mestih na lokaciji Roje pri Žalcu in sicer v hmeljišču Jošt (D48/GK; X:511176, Y:123107) in hmeljišču Ribič (D48/GK; X:510842, Y:123236). Na lokaciji Žalec smo v oddaljenosti 200 metrov od klasične svetlobne vabe ob rob hmeljišča Leskošek (D48/GK; X:512989, Y:122444) postavili vabo Trapview AURA, opremljeno s stožčasto pastjo iz žične mreže in feromonom E. Zaradi zanesljivega in kontinuiranega ulova koruzne vešče, smo feromon na vabah tudi v letu 2020 menjavali na 14 dni, kljub navodilu proizvajalca, da je menjava feromona priporočljiva na en mesec.

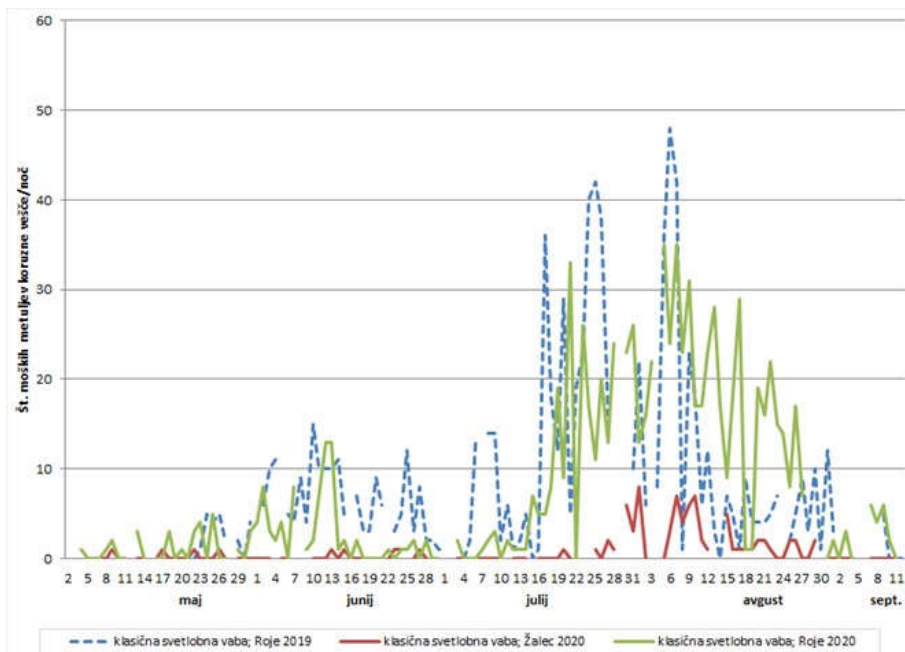


Pridobljene podatke o ulovu metuljev koruzne večče iz avtomatske svetlobne vabe Trapview AURA in Trapview AURA, nadgrajene s stožčasto pastjo iz žične mreže, smo primerjali z ulovi na klasični svetlobni vabi.

### 3 REZULTATI IN RAZPRAVA

#### 3.1 Ulov metuljev koruzne večče na klasični svetlobni vabi in avtomatski vabi Trapview AURA (nadgrajena) v letih 2019 in 2020

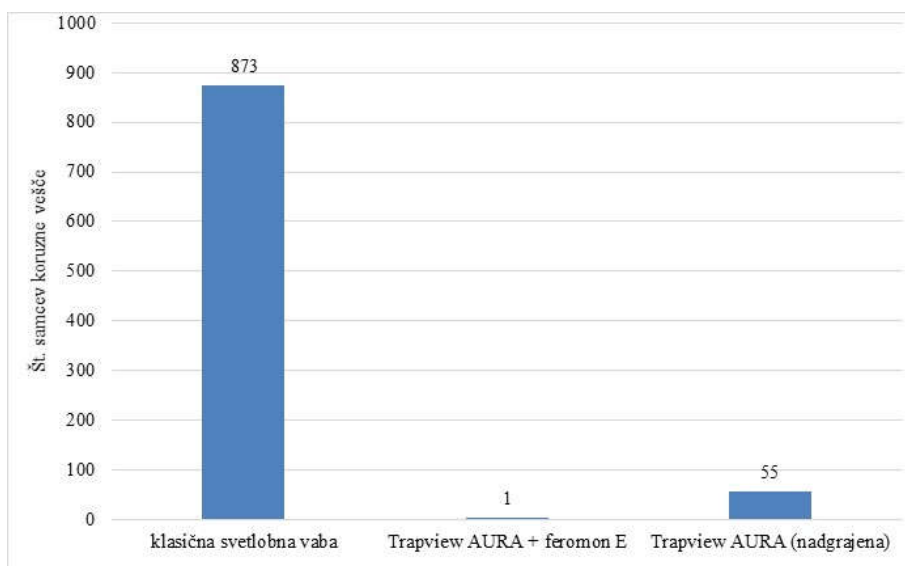
Na klasično svetlobno vabo lovimo tako moške kot ženske osebkke koruzne večče. Na vabi Trapview AURA so se ulovili samo moški osebki, kar je posledica feromona, ki privablja zgolj samce, namreč polarizirana svetloba na svetlobni vabi ni imela večjega vpliva na ulov metuljev koruzne večče. Posledično na sliki 3 prikazujemo ulove metuljev koruzne večče samo moških osebkov, ulovljenih na klasični svetlobni vabi na Rojah pri Žalcu in v Žalcu v letih 2019 in 2020. Na klasični svetlobni vabi je običajno delež ulovljenih moških metuljev od 60 do 80 %. Na klasični svetlobni vabi na lokaciji Roje pri Žalcu je bil ulov koruzne večče večji kot v Žalcu, kar je že dlje časa znano dejstvo, ker gre za popolnoma drugo mikrolokacijo, ki ima vpliv na ulov koruzne večče.



**Slika 3:** Ulovi moških osebkov koruzne večče (*Ostrinia nubilalis*) na klasični svetlobni vabi v Rojah pri Žalcu v letih 2019 in 2020 ter v Žalcu v letu 2020

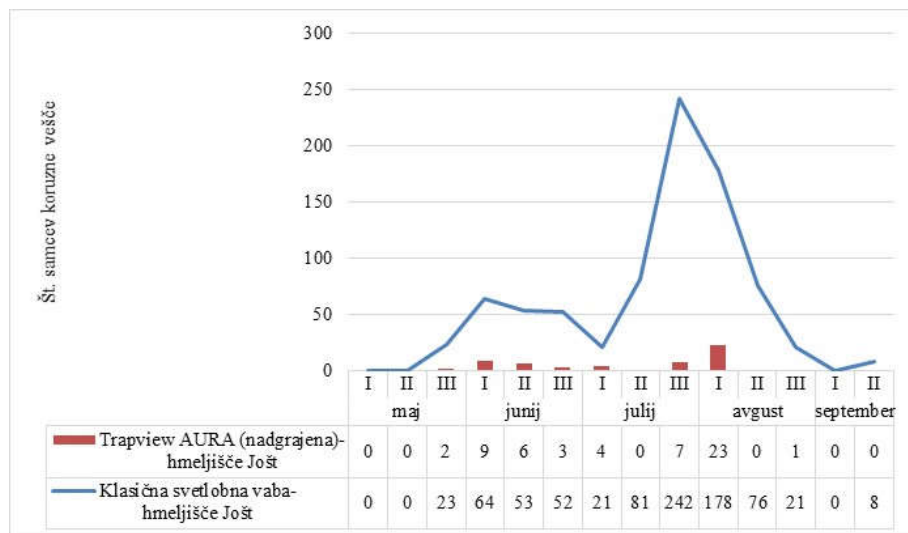
V letu 2019 smo na klasični svetlobni vabi na Rojah pri Žalcu ulovili skupno 873 moških osebkov, v letu 2020 pa 861 (slika 3), kar je 90 % več kot na lokaciji Žalec, ko smo na klasični svetlobni vabi v letu 2020 ulovili 81 moških osebkov koruzne vešče (slika 3).

V letu 2019 smo na lokaciji Roje pri Žalcu preverjali učinkovitost avtomatske svetlobne vabe Trapview AURA z dodanim feromonom E ter vabo Trapview AURA (nadgrajena), ki je bila nadgrajena s stožčasto pastjo iz žične mreže, kamor smo dodali feromon E. Kot standard glede ulovov koruzne vešče nam je služila klasična svetlobna vaba, ki je bila postavljena na lokaciji Roje pri Žalcu v bližini avtomatskih svetlobnih vab. Na svetlobni vabi Trapview AURA, z uporabo feromona E za spremljanje koruzne vešče, smo ulovili zgolj 1 samčka, kljub temu da se je na klasični svetlobni vabi v letu 2019 ulovilo 873 samcev (slika 4). Z vabo Trapview AURA (nadgrajena) smo v letu 2019 na Rojah pri Žalcu ulovili 55 moških metuljev koruzne vešče, kar predstavlja 6,3 % samcev v primerjavi z ulovi samcev na klasično svetlobno vabo (slika 4). Moč in domet svetlobe na klasični svetlobni vabi je v primerjavi z avtomatsko svetlobno vabo Trapview AURA zelo velik. Posledično imamo na klasični svetlobni vabi tudi večji ulov. Ker smo avtomatski svetlobni vabi dodali tudi feromon, je ulov samcev koruzne vešče v približno 5 % deležu v primerjavi s klasično svetlobno vabo zelo obetajoč podatek.



**Slika 4:** Ulov samcev koruzne vešče (*Ostrinia nubilalis*) na klasični svetlobni vabi in vabah Trapview AURA v Rojah pri Žalcu v letu 2019

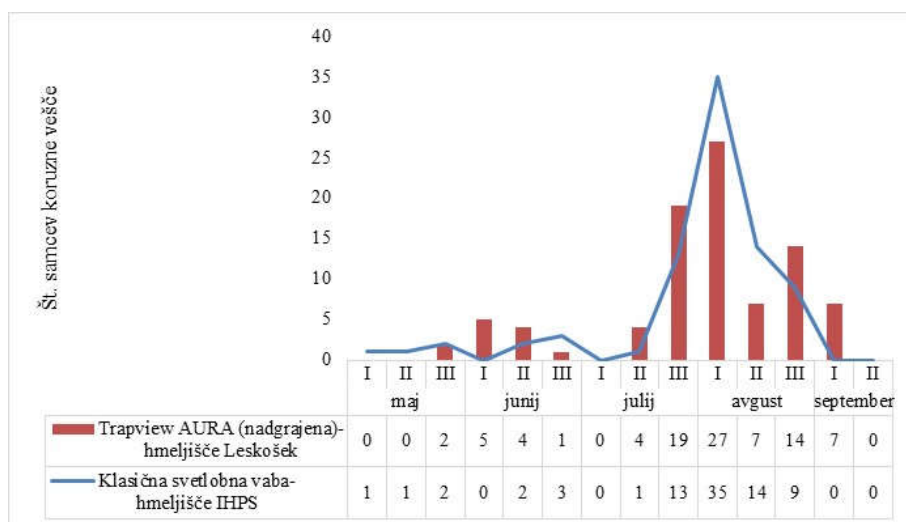
Poleg številčnosti ulova koruzne vešče z vabo Trapview AURA (nadgrajena) je pomembna tudi dinamika ulova. V letu 2019 smo na Rojah pri Žalcu na vabi Trapview AURA (nadgrajena) imeli podobne vrhove ulovov samcev koruzne vešče kot na klasični svetlobni vabi (slika 5). Na obeh vabah (klasični in avtomatski) je bil vrh 1. generacije konec maja in v začetku junija, pri 2. generaciji pa konec julija in v začetku avgusta (slika 5).



**Slika 5:** Dinamika populacije samcev koruzne vešče (*Ostrinia nubilalis*) na klasični svetlobni vabi in svetlobni vabi Trapview AURA nadgrajeni s stožčasto pastjo iz žične mreže in uporabo feromona E v hmeljišču na Rojah pri Žalcu, leto 2019

V letu 2020 smo razširili mrežo spremljanja koruzne vešče z nadgrajeno vabo Trapview AURA s stožčasto pastjo iz žične mreže in uporabo feromona E na 3 lokacije. Dve sta bili postavljeni na robu hmeljišč v bližini svetlobne vabe na Rojah pri Žalcu (hmeljišče Jošt in hmeljišče Ribič), ena pa v neposredni bližini svetlobne vabe v Žalcu, na robu hmeljišča Leskošek.

V letu 2020 smo na avtomatski svetlobni vabi Trapview AURA, locirani v letu 2020 v hmeljišču Leskovšek, ki je bila od klasične svetlobne vabe oddaljena okrog 200 metrov, ulovili 90 moških osebkov, kar je bilo kar za 11 % več kot na klasični svetlobni vabi, kjer smo ulovili 81 samcev (slika 6). Pri tem je potrebno opozoriti, da je bila v letu 2020 klasična svetlobna vaba v Žalcu postavljena v hmeljišče v premeni, kjer ni bilo hmelja, in je to lahko eden od vplivov na rezultat.



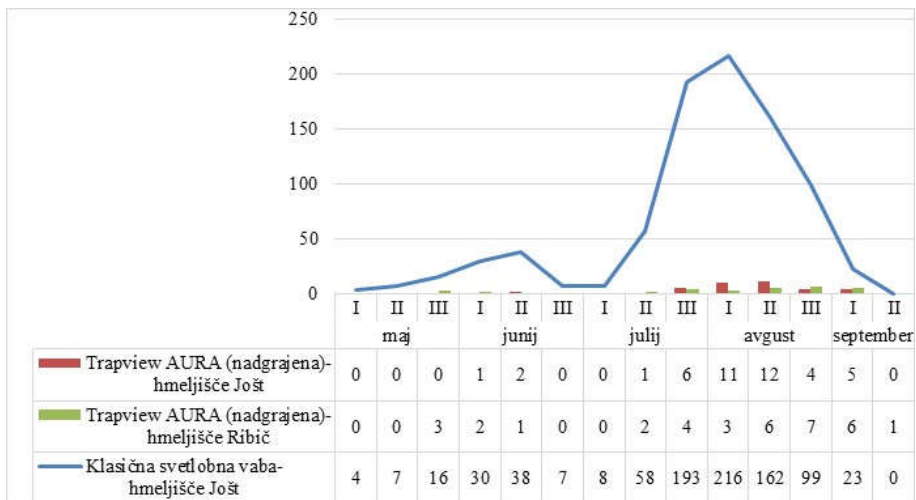
**Slika 6:** Ulov samcev koruzne vešče (*Ostrinia nubilalis*) na klasični svetlobni vabi in vabi Trapview AURA nadgrajeni s stožčasto pastjo iz žične mreže in uporabo feromona E, v Žalcu v letu 2020

Avtomatska vaba Trapview AURA, nadgrajena s stožčasto pastjo iz žične mreže skupaj s feromonom E, daje optimizem tudi za spremljanje koruzne vešče prve generacije, ki je številčno manjša kot druga generacija. Na Rojah pri Žalcu smo v letu 2020 na klasično svetlobno vabo skupno ulovili 1047 metuljev koruzne vešče, od tega 861 samcev, kar je predstavljajo 82 % celotne populacije (slike 3, 5 in 7). Drugo nadgrajeno vabo Trapview AURA smo postavili na rob hmeljišča Jošta, ki je bila le 300 metrov oddaljena od klasične svetlobne vabe. Na omenjeni vabi smo tekom celotne sezone ulovili 42 samcev (slika 7), kar je predstavljalo 4,9 % delež ulova samcev v primerjavi s klasično svetlobno vabo. Moč in domet svetlobe na klasični svetlobni vabi je zelo velika, posledično tudi večji ulov. Kljub dejstvu, da se s pomočjo nadgrajene avtomatske svetlobne vabe Trapview AURA skupaj s stožčasto pastjo iz žične mreže in feromonom E, v povprečju ulovi približno 5 % moških osebkov koruzne vešče, so rezultati zelo obetajoči, saj se običajno na delta trap feromonsko vabo ulovi zgolj posamičen organizem ali nobeden, kar smo ugotovili že v predhodnih raziskavah (Rak Cizej in sod., 2010).

Tretjo avtomatsko svetlobno vabo Trapview AURA smo postavili na drugo mikrolokacijo na Rojah, za katero vemo na podlagi izkušenj iz preteklih let, da je populacija koruzne vešče manjša kot na lokaciji, kjer je postavljena klasična svetlobna vaba. Velikost populacije koruzne vešče je namreč odvisna od mikrolokacije (vremenskih razmer, bližina gostiteljskih rastlin, agrotehničnih ukrepov, idr.). Tretjo vabo Trapview AURA smo postavili na rob hmeljišča Ribič. Vaba je bila od klasične svetlobne vabe oddaljena okrog 700 metrov. Na omenjeni

vabi Trapview AURA smo v letu 2020 ulovili 4 % delež moških osebkov (35 samcev) v primerjavi s klasično svetlobno vabo, kjer se je ulovilo 863 samcev. Glede na takšno velikost populacije so rezultati pridobljeni s pomočjo nadgrajene vabe Trapview AURA s stožčasto pastjo iz žične mreže in uporabo feromona E obetajoči, namreč v primeru uporabe delta trap feromonske vabe, kjer nismo ulovili nobenega samčka (Rak Cizej s sod., 2010).

Zelo pomemben podatek je, da je bila ne glede na številčnost ulova samčkov koruzne vešče na avtomatskih svetlobnih vabah dinamika leta tako prve kot druge generacije popolnoma primerljiva z dinamiko ulovljenih metuljev koruzne vešče na obeh klasičnih svetlobnih vabah, tako na Rojah pri Žalcu kot v Žalcu (slika 7).



**Slika 7:** Ulov samcev koruzne vešče (*Ostrinia nubilalis*) na klasični svetlobni vabi in vabah Trapview AURA na Rojah pri Žalcu v letu 2020

#### 4 ZAKLJUČEK

Dvoletno spremljanje koruzne vešče s pomočjo avtomatske svetlobne vabe Trapview AURA v primerjavi s klasično svetlobno vabo z živosrebrno žarnico smo pridobili spodbudne rezultate. Ker je moč svetlobe na avtomatski svetlobni vabi Trapview AURA bistveno manjša, smo želeli povečati ulove koruzne vešče z nadgradnjo vabe s stožčasto pastjo iz žične mreže ter uporabo feromona E.

V letu 2019 smo uporabili avtomatsko svetlobno vabo Trapview AURA skupaj s feromonom E in nadgrajeno svetlobno vabo Trapview AURA, kateri je bil v enem primeru dodan samo feromonom E, v drugem pa smo jo nadgradili s stožčasto pastjo iz žične mreže, kamor smo dodali feromon E. Z vabo Trapview AURA, na

kateri ni bila narejena nadgradnja, nismo dobili uporabnega rezultata, to je isto kot navadna delta trap vaba. Nadgrajena avtomatska svetlobna vaba Trapview AURA se je v letu 2019 izkazala za obetajočo, saj smo na lokaciji Roje pri Žalcu ulovili 55 samcev, kar je predstavlja 6,3 % v primerjavi z ulovi na klasični svetlobni vabi in predstavlja odličen rezultat kot v primeru uporabe delta trap feromonske vabe, kjer pri podobni populaciji nismo ulovili nobenega samčka koruzne vešče (Rak Cizej s sod., 2010). V letu 2020 smo na 3 lokacijah ponovno dobili zanesljive ulove, saj smo z nadgrajeno vabo Trapview AURA skupaj s feromonom E ulovili od 4,0 do 4,9 % samcev koruzne vešče primerjalno na ulov koruzne vešče na klasični svetlobni vabi.

Vrhovi leta samcev koruzne vešče so bili isti kot na klasični svetlobni vabi, vendar številčno v manjšem deležu. S pomočjo nadgrajene vabe Trapview AURA so se prvi samci koruzne vešče ulovili v zadnji dekadi maja in vse do druge dekade junija. Let metuljev druge generacije se je pričel v drugi dekadi julija in vse do sredine septembra. Druga generacija je bila številčnejša od prve, kar je znano dejstvo že nekaj desetletij (Rak Cizej in Trematerra, 2017).

Številčno so ulovi samčkov na avtomatski svetlobni vabi Trapview AURA manjši za približno 96 % kot v primerjavi s klasično svetlobno vabo. Na klasično svetlobno vabo poleg samcev ulovimo tudi odrasle samice koruzne vešče. Sicer pa se na klasično svetlobno vabo ulovi med 60 in 80 % delež samcev. V prihodnje bo potrebno nadaljevati s spremljanjem leta koruzne vešče ter izračunati korelacijski faktor med ulovi koruzne vešče na klasični svetlobni vabi in nadgrajeni avtomatski svetlobni vabi Trapview AURA skupaj s feromonom E. Z uporabo avtomatske svetlobne vabe lahko precej poenostavimo spremljanje leta koruzne vešče in le-to spremljamo na daljavo s pomočjo računalniškega programa in GPRS povezljivosti med vabo in računalnikom. Poleg tega je ta avtomatska svetlobna vaba opremljena s solarnim panelom za polnjenje baterije in lepljivo rolo, ki se lahko s pomočjo elektromotorja samoočisti. Posledično je tako avtomatsko vabo Trapview AURA mogoče uporabljati na različnih mikrolokacijah, ker vaba Trapview AURA ni odvisna od električnega napajanja.

Rezultati ulova metuljev koruzne vešče na avtomatski vabi Trapview AURA so spodbudni, kar nas navdaja z optimizmom, da bomo lahko avtomatske vabe za spremljanje koruzne vešče v prihodnje uporabljali v več pridelovalnih območjih hmelja. Zavedamo se, da bo vzporedno z ulovi metuljev na vabi Trapview AURA potrebno preveriti in ugotoviti dejanske poškodbe, ki jih povzročajo gosenice koruzne vešče na hmelju.

**Zahvala.** Za sodelovanje se zahvaljujemo podjetju Efos d.o.o., ki je proizvajalec avtomatske svetlobne vabe Trapview AURA ter lastnikom hmeljišč (g. Leskošku,

go. Jošt in g. Ribiču), ki so nam omogočili spremljanja koruzne vešče v njihovih hmeljiščih.

## 5 VIRI IN LITERATURA

- Agrometeorološki portal Slovenije (<http://agromet.mkgp.gov.si/APP/Home/METEO/-1>), november 2020
- Bengtsson M., Karpati Z., Szöcs G., Reuveny H., Yang Z., Witzgall P. Flight tunnel responses of Z strain European corn borer females to corn and hemp plants. *Environmental Entomology*, 2006;35(5). 1238–1243.  
[https://doi.org/10.1603/0046-225X\(2006\)35\[1238:FTROZS\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0046-225X(2006)35[1238:FTROZS]2.0.CO;2)
- Bontemps A., Bourguet D., Pélozuelo L., Bethenod M. T., Ponsard S. Managing the evolution of *Bacillus thuringiensis* resistance in natural populations of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*: Host plant, host race and pherotype of adult males at aggregation sites. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2004: 271(1553), 2179–2185. <https://doi.org/10.1098/rspb.2004.2851>
- Leniaud L., Audiot P., Bourguet D, Frérot B., Genestier G., Fai Lee S., Malausa T., Le Pallec A.H., Souqual M.C., Ponsard S. Genetic structure of European and Mediterranean maize borer populations on several wild and cultivated host plants. *Entomologia Experimentalis et Applicata, Wiley*. 2006: 120 (1); pp.51-62. 10.1111/j.1570- 7458.2006.00427.x . hal-02669032
- Leppik E. Reproductive isolation and host plant specialization in European corn borer pheromone strains. *Animal biology*. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. English. NNT : 2011PA11T066 . tel-00980568
- Pelozuelo, L., Frerot, B. Behaviour of male European corn borer, *Ostrinia nubilalis* Hübner (Lep.; Crambidae) towards pheromone-baited delta traps, bucket traps and wire mesh cone traps. *Journal of Applied Entomology*, 2006, 130(4): 230 - 237
- Pelozuelo, L., Frerot, B. Monitoring of European corn borer with pheromone-baited traps: Review of trapping system basics and remaining problems. *Journal of economic entomology*, 2007, 100(6): 1797-1807
- Rak Cizej M., Kárpáti Z., Leskošek G., Radišek S. Določitev rase koruzne vešče (*Ostrinia nubilalis* Hübner ) v Savinjski dolini; Preliminaren poskus spremljanja moških s feromonsko vabo. *Hmeljarski bilten*. 2010; 17: 65–73
- RAK CIZEJ, Magda, ŠPORAR, Katja, ŠTEFANČIČ, Mateja, ŠTEFANČIČ, Matej, BELUŠIČ, Gregor. Preizkus LED svetlobne vabe pri spremljanju pojava koruzne vešče (*Ostrinia nubilalis* Hübner). *Hmeljarski bilten*, 2014; 14-26
- RAK CIZEJ, Magda, ŠTEFANČIČ, Mateja, ŠTEFANČIČ, Matej, BELUŠIČ, Gregor. Monitoring of European corn borer (*Ostrinia nubilalis* HÜBNER) with Trapview AURA. V: Mission possible: food for all through appropriate plant protection: abstracts. XVIII. International Plant Protection Congress, 24. - 27. avgust 2015, Berlin, Nemčija; 35-36.
- Rak Cizej M., Trematerra P. T. Flight patterns of the European corn borer , *Ostrinia nubilalis* , in Slovenian hop gardens in 1999-2016. *Bulletin of Insectology* 2017; 70 (2): 299–305
- Tóth M., Szarukán I., Nagy A., Furlan L., Benvegnù I., Rak Cizej M., Tamás A., Tamás K., Körösi S., Pogonyi A., Tshova T., Velchev D., Atanasova D., Kurtulus A., Mehmet Kaydani B., Signorid A. European corn borer (*Ostrinia nubilalis* Hbn., Lepidoptera:

- Crambidae): Comparing the performance of a new bisexual lure with that of synthetic sex pheromone in five countries. *Pest Management Science*, 2017; 73: 2504–2508
- Wadsworth C. B., Okada, Y., Dopman E. B. Phenology-dependent cold exposure and thermal performance of *Ostrinia nubilalis* ecotypes. *BMC Evolutionary Biology*. 2020; 20(1): 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12862-020-1598>
- Zhukovskaya M. I., Selitskaya O. G., Shchenikova A. V., Frolov, A. N. Pheromone responses of *Ostrinia nubilalis* (Hübner) from north of its range in Europe. *BIO Web of Conferences*, 2020; 18(00031): 1 - 5, <https://doi.org/10.1051/bioconf/20201800031>



## VPLIV APNENEGA DUŠIKA NA RAST IN RAZVOJ HMELJA, REAKCIJO TAL IN TALNO MIKROFLORO

Barbara ČEH<sup>1</sup>, Sebastjan RADIŠEK<sup>2</sup>, Bojan ČREMOŽNIK<sup>3</sup> in Andrej ŠUŠEK<sup>4</sup>

Izvirni znanstveni članek / Original scientific article

Prispelo / received: 20. 10. 2020

Sprejeto / accepted: 7. 12. 2020

### Izvleček

Gnojilo apneni dušik (AD), ki ga kemično imenujemo kalcijev cianamid ( $\text{CaCN}_2$ ), vsebuje 19,8 % dušika in 50 % CaO. Dušik se nahaja v cianamidni obliki, ki se pri razgradnji v tleh postopoma pretvori do rastlinam dostopne amonijske oblike dušika ( $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ ). Pri tem se tvori tudi dicianamid ( $(\text{H}_2\text{N})_2\text{C}=\text{N}-\text{CN}$ ), ki je zaviralec nitrifikacije. Dušik tako ostaja dlje časa v amonijski obliki in v območju korenin. Znan je tudi pozitiven vpliv AD na vzdrževanje pH tal in na talno mikrofloro. V začetni fazi hidrolize in nepravilni uporabi pa lahko povzroči tudi fitotoksičnost. V poskusu smo želeli ugotoviti vpliv AD na rast in razvoj hmelja, določiti njegovo potencialno fitotoksičnost, ovrednotiti vpliv na pridelek in vsebnost nitratov v storžkih, ter časovno ustrezno umestiti to gnojilo v program gnojenja hmelja. Fitotoksičnost se je pokazala v primeru rastlin v ukorenišču in v loncih pri odmerkih 800 in 1000 kg/ha AD. V poljskem poskusu smo aplicirali po 400 kg/ha AD in to v nobeni kombinaciji ni povzročilo fitotoksičnosti. Nakazal se je pozitiven vpliv AD na preprečevanje zakisanja tal, medtem ko vpliva na talno mikrofloro nismo zaznali. Glede na količino pridelka ob hkratnem podatku, da gnojilo AD deluje pozitivno na mikrobiološko dejavnost tal, sta se nakazali dobri kombinaciji obravnavanji GO3 (AD ob rezi + 2× KAN) in GO6 (AD ob rezi + 1× urea + 1× KAN). Gnojilo AD (400 kg/ha) je bolje aplicirati v marcu ob rezi in ne šele v maju. Glede vsebnosti nitratov v storžkih je bolje, da za tretje dognojevanje uporabimo KAN in ne uree ali AD.

**Ključne besede:** *Humulus lupulus*, gnojenje, dušik, pridelek, mikrobiološka aktivnost tal

<sup>1</sup> Dr., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Cesta Žalskega tabora 2, 3310 Žalec, Slovenija, e-pošta: barbara.ceh@ihps.si

<sup>2</sup> Dr., isti naslov, e-pošta: sebastjan.radisek@ihps.si

<sup>3</sup> Dipl. inž. agr. in hort., isti naslov, e-pošta: bojan.cremoznik@ihps.si

<sup>4</sup> Izr. prof. dr., Fakulteta za kmetijstvo in biosistemske vede Univerze v Mariboru, e-pošta: andrej.susek@um.si

## INFLUENCE OF CALCIUM CYANAMIDE ON GROWTH AND DEVELOPMENT OF HOP, SOIL REACTION AND SOIL MICROFLORA

### Abstract

Calcium cyanamide ( $\text{CaCN}_2$ ) is a nitrogen fertilizer which contains 19.8 % nitrogen and 50 % CaO. Nitrogen, which is in the cyanamide form, is gradually converted to plant-accessible ammonium ( $\text{NH}_4$ ) $_2$ CO $_3$  when decomposed in the soil. Dicyanamide ( $(\text{H}_2\text{N})_2\text{C} = \text{N} - \text{CN}$ ) which is a nitrification inhibitor is also formed. For this reason nitrogen remains for a longer time in the ammonium form and therefore in the root zone. The positive effect of calcium cyanamide (AD) on the maintenance of soil pH and on soil microflora is also known, while in the initial phase of hydrolysis in an improper use it can cause phytotoxicity. In the experiments, we wanted to determine the impact of AD on the growth and development of hop, determine its potential phytotoxicity, evaluate its impact on the yield and nitrate content in hop cones, and place this fertilizer in the hop fertilization program. Phytotoxicity was detected in the case of plants in the low trellis and in pots at rates of 800 and 1000 kg/ha AD. In the field experiment, 400 kg/ha AD was applied and this did not cause phytotoxicity in any combination. A positive impact of AD on soil pH maintenance was indicated, but no significant influence to soil microflora. As superior fertilization combinations in terms of hop yield AD at hop cutting in the spring + 2 × KAN and AD hop cutting in the spring + 1 × urea + 1 × KAN were indicated. AD (400 kg/ha) is better to be applied in March during pruning compared to May application. Regarding the nitrate content in the cones, it is better to use KAN for the third top dressing and not UREA or AD.

**Key words:** *Humulus lupulus*, fertilization, nitrogen, yield, soil microbiological activity

### 1 UVOD

Apneni dušik (AD), ki ga kemično imenujemo kalcijev cianamid ( $\text{CaCN}_2$ ), je bil prvič sintetiziran leta 1898. Uvršča se med najstarejša dušična mineralna gnojila. Vsebuje 19,8 % dušika in 50 % CaO (Hall, 1905). Zaradi njegovega značilnega delovanja ga uvrščamo v skupino specialnih, počasi delujočih gnojil. Na počasno sproščanje dušika vpliva več dejavnikov: (1) dušik se nahaja v cianamidni obliki, ki za rastline ni dostopna, zato se mora prej v tleh razgraditi; (2) razgradnja poteka pod vplivom talnih mikroorganizmov in njihove aktivnosti, na katero pa vplivajo talne razmere (temperatura, vlaga, pH idr.); (3) pri razgradnji apnenega dušika se tvori dicianamid ( $(\text{H}_2\text{N})_2\text{C} = \text{N} - \text{CN}$ ), ki je v Evropski skupnosti registriran kot zaviralec nitrifikacije (direktiva 02003/2003; amandma iz 8. nov. 2008) (Bjälffve, 1957; Cornforth, 1971; Dixon in Williamson, 1985). Dicianamid deluje na nitrifikacijske bakterije (*Nitrosomonas*), ki pretvarjajo amonijski dušik v nitritnega.

Dušik tako ostaja dalj časa v amonijski obliki v primerjavi z ostalimi običajnimi dušičnimi gnojili (Lan in sod., 2013). Zaradi amonijske oblike, ki se veže na talne delce, je zavarovan pred izpiranjem in zato dalj časa ostaja v območju korenin (Pleysier in sod., 1987; Villsmeier in Amberger, 1978; Rathsack, 1978). Sproščanje dušika se podaljša za 6 do 8 tednov.

V gnojilu je več kot 50 % kalcija, od katerega je 1/3 v obliki kalcijevega oksida (CaO), 2/3 pa vezanega v kalcijev cianamid. Ob stiku s talno vlago AD razpade na cianamid in kalcijev hidriksid (Ca(OH)<sub>2</sub>), ki postane dostopen rastlinam. Kalcij ima pomemben vpliv na rast rastlin, saj ima pomembno vlogo pri rasti celic in je pomemben element, ki vpliva na sestavo celične stene. Pomanjkanje kalcija v tleh zmanjša dostopnost fosforja, bora in molibdena. Prost in vezan kalcijev oksid ohranja tla strukturna in preprečuje zakisanost tal (v kislih tleh je razvoj določenih škodljivih mikroorganizmov povečan) Dixon (2009; 2012). Vpliv apnenega dušika na pH tal ugotavlja tudi Miranda (1975), v poskusih, ki so potekali 15 let (1958–1972) na Portugalskem, kjer so primerjali vpliv različnih dušikovih gnojil (amonijev nitrat, amonijev sulfat, apneni dušik, kalcijev nitrat in ureo ter negnojeno površino) na reakcijo tal. V tem dolgotrajnem poskusu so parcele gnojene z apnenim dušikom ostale značilno bolj alkalne v primerjavi s parcelami, ki so bile gnojene z ostalimi gnojili, ki so povečala zakisanost tal. Poskus je potekal na območju, kjer je bila letna količina padavin 1100 mm. Uporaba apnenega dušika se je izkazala v večjem zadrževanju izmenljivega kalcija v primerjavi z ostalimi vključenimi gnojili. S tem se ustvarja naravno stimulatívno okolje za delovanje in razvoj koristnih mikroorganizmov, ki zatirajo oziroma omejujejo delovanje škodljivih organizmov.

Poleg ugodne hranilne vrednosti in počasnega sproščanja hranil številni avtorji poročajo o vplivu apnenega dušika na mikrobiološko dejavnost v tleh (Müller, 1955) in s tem na rodovitnost tal. Že raziskave Alison (1924) in Mukeri (1932) dokazujejo, da apneni dušik značilno poveča število mikroorganizmov v tleh. Bosch in Amberger (1983) iz Tehnične univerze v Münchnu navajata, da je biološka aktivnost tal, ki je merjena z encimsko aktivnostjo, povečana, če uporabljamo apneni dušik. Prav tako pa Shi in sod. (2009) ugotavljajo, da so mikroorganizmi različno dovzetni na apneni dušik. Znano je, da lahko glive vrste *Aspergillus* in *Penicillium* koristijo molekule cianamida kot vir dušika pri razgradnji organskih snovi (celuloze) v tleh. Zaradi tega se bodo ti mikroorganizmi v prisotnosti cianamida v tleh razmnožili, povečala se bo biodiverziteteta in njihova množina, s tem pa bodo po naravni poti preprečevali razvoj talnih patogenih gliv in plesnivk (Klasse, 1999; Dixon, 2017). Nekatere rastlinske vrste kot kuštrava grašica (*Vicia villosa*) ali akacija (*Robinia pseudoacacia*), same sintetizirajo cianamid v listih za zaščito pred boleznimi in pred konkurenčnimi rastlinami.

V literaturi lahko najdemo veliko objav o vplivu apnenega dušika na pridelek in manjšo vsebnost dušika v rastlinah oz. njegovo kakovost. Na inštitutu za hortikulturo v Wellesbournu v Veliki Britaniji so ugotovili, da so rastline zelja, gnojene z apnenim dušikom, dosegle za skoraj 20 % večjo maso glave. Povečanje pridelka se opaža tudi pri drugih kapusnicah, kakor tudi pri krompirju, korenju idr. Na testni postaji na Spodnjem Saškem so v dvoletnem poskusu na krompirju ugotovili 10 % povečanje pridelka. Na testni postaji Rebstain (St. Gallen, Švica) so v triletnem poskusu na korenju ugotovili povečanje tržnega pridelka za 10 %, če so rastline gnojili z AD v primerjavi z običajnim NPK gnojilom. Di Gioia in sod. (2017) poročajo, da se je vsebnost nitratov v rastlinah solate zmanjšala od 18 do 21 %, če so bile gnojene z AD v primerjavi z običajnimi gnojili. Do podobnih rezultatov so prišli tudi Willumsen in McCall (1997), Venter (1978) ter Venter in Fritz (1979).

Pri razgradnji apnenega dušika se tvori cianamid, ki pa je ob nepravilni uporabi lahko fitotoksičen tudi za rastline. V času od enega do dveh tednov se cianamid v tleh popolnoma spremeni v dušikovi obliki urea in amonij, zato se nevarnost fitotoksičnosti preneha. Zaradi cianamidne faze je potrebno upoštevati čakalno dobo pred setvijo oz. sajenjem mladih rastlin. Čakalni čas je odvisen od uporabljene količine gnojila, talne vlage in talne temperature. Pri gnojenju odraslih rastlin hmelja se priporoča dodajanje apnenega dušika kot prvi obrok dognojevanja z dušikom. Pomembno je, da gnojilo po trošenju ostane enakomerno razporejeno na površini tal oz. da se prepreči njegovo premeščanje v primeru močnih površinskih vod. Če se gnojilo trosi na zaskorjena tla, kjer se granule lahko sperejo in se koncentrirajo v depresijah, se zaradi prevelike koncentracije gnojila na površino, nevarnost fitotoksičnosti poveča.

Znano je, da se rodovitnost tal pri intenzivni pridelavi rastlin zmanjšuje predvsem zaradi stalne uporabe kislih mineralnih gnojil (amonsulfat, urea, AN idr.), fitofarmaceutskih sredstev, časovno neprimerne obdelave tal, prekomerne izsušitve ali prekomernega namakanja. Namen poskusa je bil proučiti uporabnost apnenega dušika pri gojenju hmelja. Želeli smo proučiti naslednje vplive: (1) določiti vpliv apnenega dušika na rast in razvoj hmelja ter določiti potencialno fitotoksičnost apnenega dušika; (2) ovrednotiti njegov vpliv na pridelek in vsebnost nitratov v storžkih; (3) ugotoviti časovno ustrezen umestitev tega gnojila v program gnojenja; (4) vpliv na reakcijo tal in talno mikrofloro.

## 2 MATERIAL IN METODE

### 2.1 Poljski poskus

Bločni poljski poskus v treh ponovitvah smo postavili v letih od 2017 do 2019 v hmeljiščih IHPS s sorto hmelja Bobek (2017) oziroma Celeia (2018 in 2019).

Proučevali smo osem različnih gnojilnih obravnavanj (GO), ki so bila sestavljena kot kombinacije gnojil apneni dušik (AD), urea in KAN. Gnojilo apneni dušik je bilo umeščeno za prvo dognojevanje (aplikacija pred rezjo hmelja ali konec maja) oziroma za vsa tri dognojevanja (preglednica 1). Vključeni sta bili kontroli – vsa tri dognojevanja z ureo oziroma vsa tri dognojevanja s KAN. Pri vseh obravnavanjih smo dušik razdelili na tri obroke in pri vsakem skupno pognojili enako količino dušika (180 kg/ha N). Velikost osnovne parcele je bila okrog 250 m<sup>2</sup>, torej je bila površina pod celotnim poskusom 6000 m<sup>2</sup>.

**Preglednica 1:** Termini gnojenja in gnojilna obravnavanja v poskusu v letih 2017 do 2019

Termin gnojenja	Gnojilna obravnavanja (GO)							
	GOK1 <sup>1</sup>	GOK2 <sup>2</sup>	GO3	GO4	GO5	GO6	GO7	GO8
Pred rezjo (marec)	/	/	400 kg/ha AD	/	400 kg/ha AD	400 kg/ha AD	/	/
Konec maja	185 kg/ha KAN	110 kg/ha urea	/	400 kg/ha AD	/	/	400 kg/ha AD	400 kg/ha AD
Sredina junija	300 kg/ha KAN	170 kg/ha urea	260 kg/ha KAN	260 kg/ha KAN	150 kg/ha urea	150 kg/ha urea	150 kg/ha urea	350 kg/ha AD
Začetek julija	185 kg/ha KAN	110 kg/ha urea	110 kg/ha KAN	110 kg/ha KAN	65 kg/ha urea	110 kg/ha KAN	65 kg/ha urea	150 kg/ha AD
skupaj N	pri vseh obravnavanjih se je dodalo 180 kg/ha N							

<sup>1</sup>GOK1: obravnavanje 1 se je uporabilo kot kontrolno obravnavanje, kjer smo uporabili gnojilo KAN.

<sup>2</sup>GOK2: obravnavanje 2 se je uporabilo kot kontrolno obravnavanje, kjer smo uporabili gnojilo urea.

Hmelj sorte Bobek, na katerem je potekal poskus (GKY:512856, GKX:122502), je bil sajen leta 2009, hmelj sorte Celeia (GKY:512054, GKX:123032) pa leta 2013. V preglednici 2 so prikazani rezultati analize tal pred postavitvijo poskusov. Nasad sorte Bobek je bil spomladi leta 2017 gnojen s hlevskim gnojem v količini 15 t/ha, med letom pa se ni uporabljalo nobeno gnojilo, ki bi vsebovalo fosfor ali kalij, le gnojila po protokolu poskusa (preglednica 1). Hmelj sorte Celeia je bil spomladi leta 2018 gnojen s hlevskim gnojem v količini 15 t/ha, jeseni 2018 in jeseni 2019 pa s kalijevim kloridom v količini 200 kg/ha. Po tretjem obsipanju (julija) so bile v obeh poskusih posejane podorine.

**Preglednica 2:** Parametri analize tal v poskusnih hmeljiščih pred postavitvijo poskusa

Sorta hmelja	pH v KCl	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg/100 g tal)	Razred preskrbljenosti	K <sub>2</sub> O (mg/100 g tal)	Razred preskrbljenosti	Organska snov (%)
Bobek	6,4	31,5	D	37,8	D	4,1
Celeia	6,3	39	D	21	C	2,6

## 2.2 Meritve v poljskem poskusu

Med rastno sezono smo opazovali rast in razvoj rastlin, morebitne znake fitotoksičnosti na rastlinah, merili mikrobiološko aktivnost tal, pH tal in vsebnost rastlinam dostopnega dušika v tleh, vrednotili pridelek ter analizirali vsebnost nitratov v storžkih po parcelah (preglednica 3).

### *Preglednica 3: Opravila na poskusu v letih 2017 do 2019*

<b>Datum</b>	<b>Opravilo</b>
22. 3. 2017	Na ustrezne parcele aplicirali gnojilo apneni dušik (AD)
23. 5. 2017	
16. 6. 2017	Na ustrezne parcele aplicirali gnojila AD, KAN in urea
4. 7. 2017	Vzorčenje tal za Nmin in pH
5. 7. 2017	Dognojevanje pri obravnavanjih, kjer je bilo to predvideno
1. 8. 2017	Namakanje z bobnastim namakalnikom v količini 30 mm
10. 8. 2017	Vzorčenje tal za mikrobiološko aktivnost, Nmin in pH
5. 9. 2017	Obiranje poskusa, tehtanje pridelka po parcelah, odvzem vzorcev storžkov za analizo na vsebnost vlage in nitratov
21. 4. 2018	Prvi obrok AN po rezi na predvidenih parcelah
18. 5. 2018	Prvo dognojevanje pri ostalih obravnavanjih, kjer je bilo predvideno. To je nekoliko prej kot običajno, saj je v tem letu hmelj prehiteval z rastjo.
6. 6. 2018	Drugo dognojevanje izvedli nekoliko prej kot običajno, saj je hmelj že dosegel višino 4 m.
2. 7. 2018	Vzorčenje tal za analizo na Nmin in pH, takoj za tem dognojevanje z dušikom po predvidenem planu
13. 8. 2018	Vzorčenje tal za pH in mikrobiološko aktivnost
6. 9. 2018	Obiranje poskusa, tehtanje pridelka po parcelah, odvzem vzorcev storžkov za analizo na vsebnost vlage in nitratov
1. 10. 2018	Vzorčenje tal za analizo na Nmin
25. 4. 2019	Prvi obrok z AN po rezi na predvidenih parcelah
25. 5. 2019	Prvo dognojevanje v okviru obravnavanj, kjer je predvideno prvo dognojevanje v tem času
22. 6. 2019	Dognojevanje pri ustreznih obravnavanjih
8. 7. 2019	Vzorčenje tal za Nmin in pH ter dognojevanje; predviden za začetek julija pri ustreznih obravnavanjih
27. 8. 2019	Vzorčenje za Nmin in pH ter mikrobiološko aktivnost
10. 9. 2019	Obiranje poskusa, tehtanje pridelka po parcelah, odvzem vzorcev storžkov za analizo na vsebnost vlage in nitratov

Razen opisanega gnojenja z dušikom smo poskus oskrbovali enako za vsa obravnavanja v skladu z načeli dobre agronomske prakse. Vsakič smo po trošenju dušikovih gnojil kultivirali območje celotnega poskusa oziroma gnojila zadelali v tla z obsipanjem hmelja pri tretjem dognojevanju. Meritve višine rastlin smo izvajali na 6 rastlinah na posameznem obravnavanju v enem bloku s teleskopskim metrom. Vzorčenje tal za analize Nmin in pH so se izvajale na vseh parcelah, torej

na vseh treh ponovitvah vsakega obravnavanja (skupno 24 parcel). Globina vzorčenja tal je bila 0–25 cm, vzorčil pa se je medvrstni in vrstni prostor, in sicer na 20 različnih mestih, ki so skupaj predstavljala en vzorec. Za vrednotenje pridelka je bilo na posamezni parceli vsakega obravnavanja analiziranih 30 rastlin sredinske vrste.

Mikrobiološko aktivnost tal smo merili na osnovi določanja splošne populacije gliv in bakterij. Pri tem smo vzorčenja tal izvedli v mesecu avgustu, teden dni pred obiranjem pridelka. Vzorčili smo vsako parcelo s sondo za vzorčenje tal (tip 04.01.SA, Eijkelkamp, Nizozemska) v globini 5–20 cm. Pred vbodom sonde smo odstranili površinskih 5 cm tal, ki je najbolj izpostavljen zunanjim razmeram. Za en vzorec (1 kg) smo skupaj opravili 10 vbodov po grobovih – v vrstnem prostoru ob 10 rastlinah sredinske vrste. Vzorci so bili do nadaljnjega procesiranja hranjeni pri temperaturi 4 °C, vendar ne več kot 2 dni. Mikrobiološko aktivnost smo določali z metodo serijskih redčitev na specifičnih gojiščih. Za analizo celokupnih bakterij smo uporabili osnovo TSA (tryptic soy agar) gojišče, za določanje gliv pa PDA (krompirjev dekstrozni agar) gojišče z ustreznimi selekcijskimi dodatki (Larkin in sod., 1993). Inkubacija bakterijskih analiz je trajala 4 dni pri temperaturi 25 °C, medtem ko pri glivah 7 dni pri sobni temperaturi. Rezultate analiz smo izrazili v enotah CFU/g tal.

### 2.3 Vremenske razmere v času poljskega poskusa

V letu 2017 smo zabeležili pomanjkanje padavin že v zimskih mesecih, ki se je nato tekom vegetacije samo še stopnjevalo. Od aprila do junija leta 2017 smo v Žalcu zabeležili 266 mm padavin. Največ dežja je padlo v aprilu (126 mm), v maju 38 mm, v juniju 102 mm. Pomanjkanje padavin smo beležili tudi v juliju (39 mm) in avgustu (73 mm). V aprilu smo bili priča velikim temperaturnim nihanjem. Prva dekada aprila je bila ekstremno topla. V Žalcu je povprečna dekadna dnevna temperatura za 4,1 °C preseгла vrednost dolgoletnega povprečje. Tudi prva polovica druge dekade aprila je bila topla, nato pa se je ohladilo. Od druge polovice maja do obiranja je bila povprečna temperatura ves čas nad dolgoletnim povprečjem. Poletje je zaznamovalo več vročinskih valov (kar 34 vročih dni) s kratkimi osvežitvami. To je bilo eno najtoplejših poletij od leta 1961. Posledice suše so konec druge dekade junija že ogrožale rast in razvoj kmetijskih rastlin.

V letu 2018 je bilo v prvih treh mesecih za 109 mm več padavin kot znaša dolgoletno povprečje (276 mm). Marec 2018 je bil eden izmed najhladnejših v zadnjih letih. Obdobje april – junij pa je zaznamovalo toplo vreme z veliko padavinami, predvsem v obliki pogostih nalivov in neurji s točo. Toplo in vlažno vreme v začetku vegetacije je vplivalo na zelo hiter fenološki razvoj hmelja. Tudi poletje je bilo bogato s padavinami. V obdobju junij – avgust smo zabeležil kar 380 mm dežja. Temperature so bile zelo blizu dolgoletnega povprečja (20,4 °C). Kljub

toplemu vremenu je avgusta padlo 109 mm dežja. Prvi dve dekadi avgusta sta bili zelo sušni, kar je lahko vplivalo na mikrobiologijo tal.

V letu 2019 je bilo v obdobju januar–marec malo padavin (139 mm, kar je 138 mm manj kot v letu 2018). Tudi snežna odeja je bila skromna. Pomanjkanje padavin se je nadaljevalo tudi v mesecu marcu (42,8 mm dežja). V aprilu je bilo toplo, s sorazmerno enakomerno razporejenimi padavinami, kar je spodbudilo rast in razvoj hmelja. V maju je bilo zelo hladno in deževno (povprečna temperatura zraka le 12,6 °C, za 2,7 °C nižja od vrednosti dolgoletnega povprečja; 159 mm dežja, 68 mm nad dolgoletnim povprečjem). Meteorološko poletje (junij – avgust) je bilo toplo (povprečna temperatura zraka v vseh treh mesecih višja od vrednosti dolgoletnega povprečja) in sorazmerno bogato s padavinami (388 mm dežja).

## 2.4 Poskusa za določanje fitotoksičnosti

*Poskus 1.* Z namenom ovrednotenja potencialne fitotoksičnosti smo opravili poskus izpostavitve rastlin različnim odmerkom apnenega dušika (AD) v letu 2017. Rastline smo gnojili z odmerki od 200 do 1000 kg AD/ha (odmerki 0, 20, 40, 60, 80, 100 g/m<sup>2</sup> apnenega dušika). Poskus je potekal na sortah Styrian Wolf in Celeia, in sicer v ukorenišču z rastlinami, ki so bile vzgojene iz ukoreninjenih sadik CSA in ne-ukoreninjenih sadik CSB (30 rastlin/odmerek/vrsto sadike). Rastline smo ustrezno posameznem obravnavanju 3-krat v vegetaciji dognojevali. Po vsakem dognojevanju smo gnojilo ročno zadelali v tla na globino 5-10 cm. V poskusu smo 10 dni po vsakem dognojevanju opravili vizualni pregled z namenom določanja morebitnih fitotoksičnih reakcij na rastlinah.

*Poskus 2.* Kot dopolnitev poskusa 1 smo na obeh sortah opravili tudi lončni poskus na rastlinah (10 rastlin/odmerek), vzgojenih iz ukoreninjenih sadik CSA. Pri tem smo izvedli gnojenje z enkratnim odmerkom gnojila glede na volumen lončkov (1 l) v koncentracijah, ki so simulirali naslednje odmerke: 0,01 % (= 200 kg/ha apnenega dušika), 0,02 % (= 400 kg/ha apnenega dušika), 0,03 % (= 600 kg/ha apnenega dušika), 0,04 % (= 800 kg/ha apnenega dušika) in 0,05 % (= 1000 kg/ha apnenega dušika). Pojav fitotoksičnosti smo vizualno ocenili teden dni po aplikaciji gnojila.

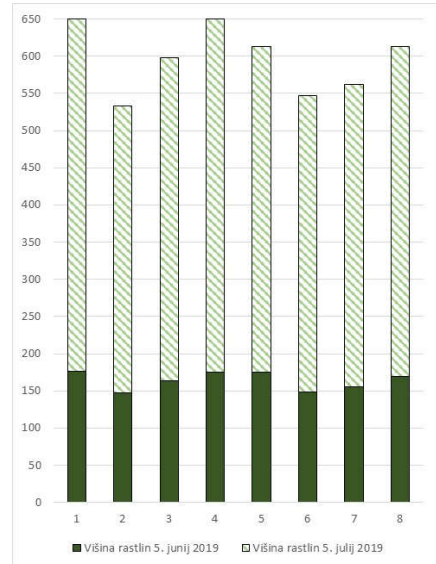
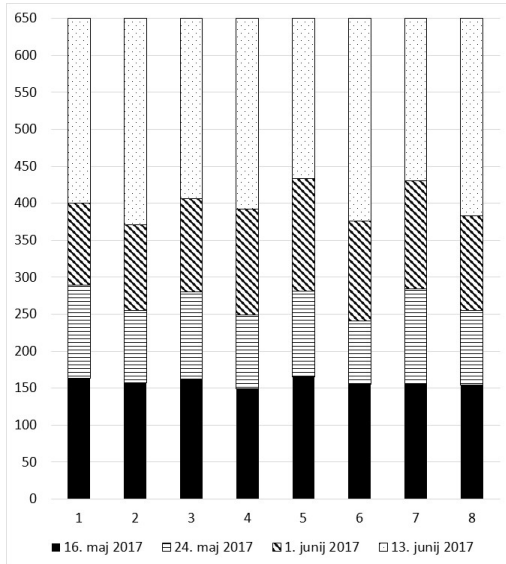
## 3 REZULTATI Z RAZPRAVO

### 3.1 Analiza vpliva apnenega dušika na rast rastlin in potencialno fitotoksičnost

V opazovanih letih v poljskem poskusu v razvoju rastlin ni bilo zaznati razlik med obravnavanji, prav tako ne drugih morfoloških znakov, ki bi nakazovali vpliv apnenega dušika na njihovo rast. Rastline so se nekoliko razlikovale v začetku



vegetacije le v višini, a so do sredine junija pri vseh obravnavanjih dosegle višino žičnice. Ne moremo torej reči, da je na višino rastlin po obravnavanjih vplival dotedanji način gnojenja z dušikom (sliki 1 in 2).



**Slika 1:** Višina rastlin hmelja sorte Bobek v poskusu glede na obravnavanje (1 do 8) in termin meritve (v cm) v letu 2017

**Slika 2:** Višina rastlin hmelja sorte Celeia glede na termin meritve in obravnavanje (v cm) v letu 2019

V poskusu določanje fitotoksičnosti so vizualna spremljanja v ukorenišču pokazala blago rumenenje spodnjih primarnih listov pri odmerkih 800 in 1000 kg/ha AD, kar pa ni bistveno prizadelo rasti in razvoja rastlin. V primeru lončnega poskusa, ki je simuliral enake odmerke, vendar v zaprtem sistemu lončka, smo podobno kot v ukorenišču zaznali fitotoksičnost le pri odmerkih 800 in 1000 kg/ha AD, vendar je bila ta veliko intenzivnejša in povzročila zaustavitev rasti rastlin in izrazito odmiranje listne mase. Rastline v nadaljevanju vegetacije niso odmrle, ampak so pogonale nove poganjke.

### 3.2 Vpliv gnojenja na reakcijo tal in vsebnost dostopnega dušika v tleh

V letu 2017 se povprečna vrednost pH tal (tako 4. julija kot 10. avgusta) med obravnavanji ni značilno razlikovala; pH bil je relativno visok, in sicer med 7,0 in 7,1 (preglednica 4). V letu 2018 se pH tal in količina rastlinam dostopnega dušika v tleh nista dokazljivo razlikovala med obravnavanji pri nobenem od terminov vzorčenja (preglednica 5). Pri vseh obravnavanjih je bil pH nekoliko nizek za pridelavo hmelja. V letu 2019 so bile vrednosti pH tal primerljive tako 8. julija kot

27. avgusta med vsemi ostalimi obravnavanji, razen pri GO8 (3 × v sezoni gnojilo AD), kjer je bil pH značilno višji (preglednica 6).

Pri primerjavi izmerjenega skupnega dostopnega dušika (skupni Nmin = nitratni + amonijski dušik) med obravnavanji v začetku julija 2017 ni bilo značilnih razlik, nakazane pa so višje vrednosti Nmin pri kontrolnem obravnavanju GOK2 (187 kg/ha Nmin) ter pri GO7 (206 kg/ha Nmin). Pri slednjem smo pognojili z AD šele konec maja, potem pa še pri drugem dognojevanju z UREO; iz obeh gnojil se N sprošča počasneje in je bolj ostal v tleh v sušnem obdobju. Tudi v začetku avgusta med obravnavanji ni bilo značilnih razlik. Najvišje N min vrednosti so izmerjene pri GOK1(193 kg/ha Nmin), GOK2(174 kg/ha Nmin), GO7 (175 kg/ha Nmin) in GO8 (174 kg/ha Nmin). Nižje vrednosti so bile zaznane pri obravnavanjih, kjer je bil kot zadnji obrok v začetku julija pognojen KAN v primerjavi z ureo. Povezave med pH in Nmin tako 4. julija kot 10. avgusta ni bilo. Tudi povezave med Nmin 4. 7. 2017 in Nmin 10. 8. 2017 ni bilo.

**Preglednica 4:** Rezultati analize vzorcev tal glede na parameter in datum meritve v poskusu v letu 2017 (pH ter Nmin - amonijski in nitratni N)

Gnojilno obravnavanje	Termin 4. 7. 2017		Termin 10. 8. 2017	
	pH tal	Skupni Nmin (kg/ha)	pH tal	Skupni Nmin (kg/ha)
GOK1	7,0 a*	174 a	7,0 a	193 a
GOK2	7,0 a	187 a	7,1 a	174 a
GO3	7,0 a	152 a	7,1 a	140 a
GO4	7,1 a	147 a	7,1 a	122 a
GO5	7,0 a	143 a	7,1 a	159 a
GO6	7,0 a	146 a	7,1 a	135 a
GO7	7,0 a	206 a	7,0 a	175 a
GO8	7,1 a	134 a	7,1 a	174 a

\*Enaka črka v stolpcu pomeni, da med obravnavanjema razlika ni statistično značilna ( $p=0,05$ , Duncanov test mnogoterih primerjav).

Najvišja vrednost dostopnega dušika je bila v letu 2018 izmerjena pri obravnavanju GO7 (preglednica 5). Povezava med pH tal in Nmin je bila 2. julija 2018 le neznatna ( $R^2 = 0,08$ ). Ugotovljamo, da so bile vsebnosti dostopnega dušika v letu 2018 še vedno zelo visoke v mesecu septembru (po toplen avgustu z dovolj padavin je bila mineralizacija očitno dobra), potem pa so se izgubile iz tega sloja do začetka oktobra.

**Preglednica 5:** pH tal in dostopni N v tleh (amonijski + nitratni = Nmin) na globini 0–25 cm

GO <sup>1</sup>	2. 7.	13. 8. 2018				13. 9. 2018	1. 10. 2018
	2018 pH	pH	Nitratni N (kg/ha)	Amonijski N (kg/ha)	Nmin (kg/ha)	Nmin (kg/ha)	Nmin (kg/ha) *
GOK1	5,4 a**	5,6 a	76 a	11 a	87a	87 a	37 a
GOK2	5,5 a	5,7 a	94 a	11 a	105a	90 a	36 a
GO3	5,3 a	5,6 a	88 a	12 a	100a	101 a	39 a
GO4	5,4 a	5,6 a	86 a	11 a	97a	97 a	38 a
GO5	5,4 a	5,7 a	99 a	10 a	109a	109 a	37 a
GO6	5,5 a	5,8 a	93 a	14 a	107a	108 a	40 a
GO7	5,7 a	5,6 a	105 a	11 a	116a	116 a	38 a
GO8	5,7 a	5,6 a	99 a	13 a	112a	112 a	36 a

<sup>1</sup>GO: gnojilno obravnavanje

\*Od tega pri vseh obravnavanjih 20 kg/ha v nitratni obliki.

\*\*Enaka črka v stolpcu pomeni, da med obravnavanjema razlika ni statistično značilna (p=0,05, Duncanov test mnogoterih primerjav).

Pri analizi vsebnosti nitratnega dušika v tleh v začetku julija 2019 ugotovljamo dokazljivo višjo vrednost pri obravnavanju GO7 (pred meritvijo: AD maja + urea junija) (preglednica 6). Večja vsebnost nitratnega dušika se je sicer nakazala tudi pri kontrolnem obravnavanju GOK2, kjer smo za vsa tri gnojenja uporabili UREO. Amonijskega N je bilo v tleh od 19 do 50 kg/ha, razlike med obravnavanji niso bile dokazljive, vendar opazamo višjo vsebnost amonijskega N pri obravnavanju GOK1, kjer smo za vsa tri gnojenja uporabili gnojilo KAN. Konec avgusta med obravnavanji ni bilo razlik v dostopnem dušiku v tleh. Povezave med pH tal in dostopnim dušikom v tleh ni bilo.

**Preglednica 6:** Rezultati analize tal 8. 7. 2019 in 27. 8. 2019 glede na obravnavanje (0-25 cm tal) na pH ter Nmin (nitratni + amonijski N = Nmin)

GO	Termin 8. 7. 2019				Termin 27. 8. 2019			
	pH tal	Nitr. N (kg/ha)	Amon. N (kg/ha)	Nmin (kg/ha)	pH tal	Nitr. N (kg/ha)	Amon. N (kg/ha)	Nmin (kg/ha)
GOK1	5,2 a	81 a	50 a	131 a	5,4 a	27 a	18 a	44 a
GOK2	5,2 a	94 a	24 a	118 a	5,4 a	33 a	14 a	47 a
GO3	5,2 a	84 a	34 a	118 a	5,4 a	27 a	16 a	43 a
GO4	5,3 a	53 a	28 a	81 a	5,5 a	27 a	18 a	45 a
GO5	5,3 a	61 a	21 a	82 a	5,5 a	24 a	17 a	41 a
GO6	5,5 a	54 a	19 a	73 a	5,5 a	21 a	16 a	37 a
GO7	5,5 a	105 b	28 a	133 a	5,5 a	23 a	16 a	39 a
GO8	5,8 b	46 a	23 a	69 a	5,8 b	25 a	17 a	42 a

<sup>1</sup>GO: gnojilno obravnavanje

### 3.3 Mikrobiološka aktivnost tal

Vpliv apnenega dušika in ostalih dušičnih gnojil na celokupno populacijo gliv in bakterij v tleh smo ugotavljali z vzorčenji po opravljenih vseh terminih gnojenja oz. teden dni pred obiranjem pridelka. Rezultati so v vseh treh letih pokazali primerljiv nivo populacije gliv med posameznimi obravnavanji (preglednica 7). Izjema je obravnavanje GO4 v letu 2019, pri katerem smo ugotovili statistično značilno višjo populacijo gliv od vseh ostalih obravnavanj. Pri tem tega ne povezujemo z načinom gnojenja ali z uporabljenimi gnojili, ampak pripisujemo to vplivu vzorčenja, kjer je lahko prišlo do točkovnega zajetja dela tal z bogatejšim deležem organske mase v razpadanju. Med leti izstopajo rezultati leta 2018, ko smo pri vseh obravnavanjih zaznali približno 3–5× nižjo populacijo gliv kot v letih 2017 in 2019. Takšen odklon pripisujemo predvsem nadpovprečno vročem in suhem obdobju v zadnji dekadi julija in prvih dveh dekadah avgusta, kar je najverjetneje vplivalo na znižano mikrobiološko aktivnost tal.

V primeru bakterijske populacije prav tako nismo zaznali statističnih razlik med obravnavanji, ki bi nakazovale na neposredni vpliv posameznega tipa ali kombinacije gnojil na razvoj bakterij. Edina statistično značilna razlika med obravnavanji je bila zaznana v letu 2018 med GO1 in GO7, vendar ta rezultat pripisujemo predvsem heterogenosti tal poskusnega polja in vremenskim razmeram v letu 2018.

**Preglednica 7:** Rezultati določanja talne celokupne populacije gliv in bakterij v obdobju 2017-2019 v poskusu preskušanja različnih gnojilnih obravnavanj dušičnih gnojil

GO*	2017		2018		2019	
	Glive (CFU/g tal) x 10 <sup>4</sup>	Bakterije (CFU/g tal) x 10 <sup>6</sup>	Glive (CFU/g tal) x 10 <sup>4</sup>	Bakterije (CFU/g tal) x 10 <sup>6</sup>	Glive (CFU/g tal) x 10 <sup>4</sup>	Bakterije (CFU/g tal) x 10 <sup>6</sup>
GO1	2,5 a	33,68 a	0,55 a	20,76 b	4,11 a	47,76 a
GO2	2,8 a	7,18 a	0,61 a	9,36 ab	3,33 a	57,03 a
GO3	2,6 a	15,42 a	0,73 a	8,36 ab	3,26 a	62,7 a
GO4	3,3 a	5,61 a	0,74 a	12,03 ab	6,26 b	36,96 a
GO5	2,9 a	5,13 a	0,81 a	12,63 ab	3,61 a	54,7 a
GO6	2,7 a	8,85 a	0,83 a	12,56 ab	3,67 a	25,86 a
GO7	2,4 a	28,94 a	0,92 a	4,9 a	3,57 a	29,56 a
GO8	2,6 a	12,81 a	0,92 a	8,66 ab	3,85 a	43,53 a

\*GO – gnojilno obravnavanje (za podrobnosti glej Preglednico 1)

\*\*Enaka črka v stolpcu pomeni, da med obravnavanjema razlika ni statistično značilna (p=0,05, Duncanov test mnogoterih primerjav).

### 3.4 Pridelek hmelja in vsebnost nitratov v storžkih

V pridelku hmelja med obravnavanji so bile značilne razlike v letu 2018. Zaradi velikih razlik med ponovitvami in posledično velike variabilnosti med izmerjenimi vrednostmi, značilnih razlik v letih 2017 in 2019 ni bilo. Se pa tudi v teh letih nakazujejo pomembni trendi v velikosti pridelka (preglednica 7).

**Preglednica 7:** Priderek hmelja (kg suhe snovi) in vsebnost nitratov v storžkih glede na čas meritve in obravnavanje v poskusu v letih 2017 do 2019

GO	Pridelek (kg/ha suhe snovi)	Pridelek/rastlino (kg suhe snovi)	Nitrati v storžkih (g/kg)	2017			2018			2019		
				Pridelek (kg/ha suhe snovi)	Pridelek/rastlino (kg suhe snovi)	Nitrati v storžkih (g/kg)	Pridelek (kg/ha suhe snovi)	Pridelek/rastlino (kg suhe snovi)	Nitrati v storžkih (g/kg)	Pridelek (kg/ha suhe snovi)	Pridelek/rastlino (kg suhe snovi)	Nitrati v storžkih (g/kg)
GOK1	1792 a	0,63 a*	11,10 a	1708 a	0,53 a	10,50 a	1837 a	0,57 a	10,00 bcd			
GOK2	1897 a	0,64 a	11,27 a	1701 a	0,57 a	10,30 a	1830 a	0,60 a	11,60 d			
GO3	2150 a	0,72 a	11,78 a	1998 b	0,61 a	10,30 a	1796 a	0,55 a	7,90 a			
GO4	1720 a	0,63 a	11,35 a	1859 ab	0,56 a	9,40 a	1840 a	0,55 a	9,20 abc			
GO5	1705 a	0,56 a	12,94 a	1770 ab	0,59 a	10,70 a	1942 a	0,64 a	9,00 ab			
GO6	1523 a	0,55 a	9,69 a	1983 b	0,59 a	10,20 a	2019 a	0,63 a	9,70 abcd			
GO7	1594 a	0,62 a	9,82 a	1891 ab	0,64 a	10,50 a	1772 a	0,55 a	10,50 bcd			
GO8	1763 a	0,60 a	11,20 a	1917 ab	0,56 a	10,50 a	1975 a	0,58 a	11,20 cd			

\*GO – gnojilno obravnavanje

\*Enaka črka v stolpcu pomeni, da med obravnavanjema razlika ni statistično značilna ( $p=0,05$ , Duncanov test mnogoterih primerjav).

Glede na pridelek sta se dobro nakazali obravnavanji GO3 (AD ob rezi + 2× KAN) in GO6 (AD ob rezi + 1× urea + 1× KAN), kjer ugotovljamo sledeče:

- V sušnem in toplem letu 2017 je bil največji povprečni pridelek (2150 kg/ha) izmerjen pri obravnavanju GO3 (sicer ne značilno največji). Pridelek je bil večji za 20 % v primerjavi s kontrolnim obravnavanjem GOK1 (1792 kg/ha) in za 13 % v primerjavi s kontrolnim obravnavanjem GOK2 (1897 kg/ha).
- V letu 2018 je bil pridelek storžkov značilno večji pri GO3 (1998 kg/ha) in GO6 (1983 kg/ha) kot pri kontrolnih obravnavanjih GOK1 in GOK2. Pridelek je bil večji pri GO3 za 17 % pri GO6 pa za 16 % v primerjavi s kontrolnima obravnavanjema.
- V letu 2019 je bil največji pridelek izmerjen pri GO6 (2019 kg/ha) (sicer ne značilno največji), ki je bil za 10 % večji kot pri kontrolnih obravnavanjih.

Če analiziramo podatke vseh treh let skupaj, je pridelek obravnavanja GO3 največji (1981 kg/ha), vendar razlika z ostalimi obravnavanji ni značilna. Sledita obravnavanji GO8 (1885 kg/ha) in GO6 (1841 kg/ha).

Tako pri obravnavanju GO3 kot GO6 smo kot prvi obrok dušika potrosili AD ob rezi v količini 80 kg/ha N. Če ti dve obravnavanji primerjamo z obravnavanji GO4

(AD v maju + 2 × KAN) in GO7 (AD v maju + 2 × urea), ugotovimo, da je bolje gnojilo AD aplicirati v marcu in ne šele v maju, saj sta obravnavanji GO4 in GO7 dosegali oziroma nakazali nižje pridelke. Če primerjamo obravnavanji GO5 (AD ob rezi + 2 × urea) in GO6 (AD ob rezi + urea + KAN) ugotovimo, da je bilo za tretje dognojevanje bolje uporabiti KAN, saj se je obravnavanje GO6 v letih 2018 in 2019 izkazalo z večjim pridelkom in nižjo vsebnostjo nitratov v storžkih. Če primerjamo obravnavanji GOK2 (3× urea) in GO7 (AD v maju + 2× urea), ugotovimo da dognojevanje samo z ureo vpliva slabše na pridelek, saj se je obravnavanje GO7 kar v dveh letih (2017 in 2019) nakazalo z najslabšim pridelkom. Če primerjamo obravnavanji GOK1 (3 × KAN), GO3 (AD ob rezi + 2 × KAN) in GO4 (AD v maju + 2 × KAN) ugotovimo, da je gnojilna kombinacija AD + KAN boljša kot uporaba samo KANa v vseh treh dognojevanjih. Pomemben je tudi čas uporabe AD. Večje pridelke smo izmerili, če smo uporabili AD ob rezi. Obravnavanje GO8, sestavljeno iz vseh treh obrokov N v obliki gnojila AD, je imelo pridelek med zgornjo polovico obravnavanj v vseh letih.

V vsebnosti nitratov v storžkih v dveh letih ni bilo značilnih razlik med obravnavanji, so pa bile le-te v letu 2019, ko je bila značilno najnižja vsebnost nitratov pri obravnavanju GO3 (AD ob rezi + 2× KAN). Vendar je v tem letu imelo to obravnavanje tudi majhen pridelek, kateri je bil v prejšnjih letih pri tem obravnavanju najvišji. Dokazljivo najvišja vrednost je bila ugotovljena pri obravnavanju GOK2, kjer smo vsa tri dognojevanja opravili z ureo. Visoke vsebnosti nitratov (Sicer ni natančne meje za vsebnost nitrata v storžkih, meje so v različnih delih sveta različne, se pa večina pivovarn drži meje 10 g/kg) v primerjavi z drugimi obravnavanji opažamo v tem letu tudi pri GO7 (AD v maju + 2 × urea) in GO8 (3× AD); vsem je skupno to, da so imeli zadnji obrok dušika pognojen z gnojilom, iz katerega se N sprošča počasneje. V poletju, sorazmerno bogato s padavinami, se je predvidoma gnojilo KAN raztopilo in se absorbiralo prej v primerjavi z ureo in AD, iz katerih se je N sproščal počasneje in se pozno absorbiral v rastline.

#### 4 ZAKLJUČKI

V okviru analize rezultatov večletnega poskusa, ki je potekal v hmeljiščih IHPS na sortah hmelja Bobek (v letu 2017) in Celeia (v letih 2018 in 2019) ugotavljamo, da uporaba AD ni vplivala zaviralno na rast in razvoj rastline hmelja (letni odmerek 400 kg/ha AD), ne glede na časovno razporeditev odmerkov. Pri ugotavljanju fitotoksičnosti apnenega dušika na sortah StyrianWolf in Celeia smo zaznali rahlo fitotoksičnost, če smo uporabili AD v količini 800 oziroma 1000 kg/ha AD v ukorenišču in fitotoksično delovanje pri teh dveh odmerkih v poskusu v loncih.

pH tal je bil v tretjem letu poskusa višji na parcelah, kjer smo gnojili samo z apnenim dušikom GO8 (povečal se je s pH 5,6 v letu 2018 na pH 5,8 v letu 2019).

Rezultati poskusa nakazujejo ugotovitve Miranda (1975), da se tla ne zakisajo, če se gnoji z apnenim dušikom. Če primerjamo vrednosti v avgustu absolutno in jih primerjamo med letoma 2018 in 2019, ugotovimo, da se je pH vrednost znižala na parcelah, kjer smo uporabljali gnojili KAN (s pH 5,6 na pH 5,4) in urea (s pH 5,7 na pH 5,4).

Pri ugotavljanju vsebnosti dostopnega dušika v tleh z hitrim nitratnim testom nismo ugotovili značilnih razlik med gnojilnimi obravnavanji, razen v enem terminu (8. julij 2019) je bila v tleh značilno večja vsebnost nitrata N pri obravnavanju GO7.

Rezultati poskusa so pokazali, da različni tipi in kombinacije dušičnih gnojil umerjeni na enak celoletni odmerek (180 kg/ha) niso vplivali na bistvene spremembe v celokupni populaciji gliv in bakterij. Pri tem seveda moramo izpostaviti, da bi lahko dodatne meritve posameznih tipov gliv in bakterij kot je skupina mikrobioloških indikatorjev rodovitnosti in zdravstvenega stanja tal (npr. glive iz rodu *Trichoderma*, *Gliocladium* in bakterije iz rodov *Pseudomonas* in *Bacillus*) (Berg in sod., 2006; Fravel, 2005) pokazala pozitiven ali negativen vpliv posameznih GO na mikrobiologijo tal. Poudariti je potrebno tudi relativno kratek čas izvajanja poskusa na obeh lokacijah in primerljive pH vrednosti med vsemi GO v vseh treh letih, kar prav tako pomembno vpliva na mikrobiološko aktivnost tal (Lauber in sod., 2009).

Glede na količino pridelka ob hkratnem podatku, da gnojilo AD deluje pozitivno na mikrobiološko dejavnost tal, sta se nakazali dobri kombinaciji obravnavanji GO3 (AD ob rezi + 2× KAN) in GO6 (AD ob rezi + 1× urea + 1× KAN). Če pognojimo z AD ob rezi in za drugo dognojevanje uporabimo UREO, potem je glede pridelka in vsebnosti nitratov bolje, da za tretje dognojevanje uporabimo KAN in ne uree. Gnojilo AD (400 kg/ha) je bolje aplicirati v marcu in ne šele v maju. Gnojilna kombinacija AD + 2x KAN se je nakazala kot boljša v primerjavi z uporabo 3x KAN. Obravnavanje GO8, sestavljeno iz vseh treh obrokov N v obliki gnojila AD, je imelo pridelek med zgornjo polovico obravnavanj v vseh letih. Rezultati nakazujejo, da je glede vsebnosti nitratov uporaba gnojil urea in AD za tretje dognojevanje manj primerna. Dušik se iz uree in AD počasneje sprošča kot iz KANa, zato je bolje, da se za tretje dognojevanje uporabi KAN.

Na osnovi rezultatov poskusa ugotavljamo, da je vključevanje gnojila AD v pridelavo hmelja smiselno, saj se je v določenih kombinacijah nakazalo s pozitivnim vplivom na pridelek in ugodnim vplivom na reakcijo tal. Pri tem je potrebno poudariti, da bo potrebno smotrnost uporabe v bodoče AD analizirati tudi na nivoju ekonomike pridelave z upoštevanjem še ostalih agronomskih dejavnikov, kot so vpliv AD na preprečevanje talnih povzročiteljev bolezni in škodljivcev,

prednosti počasnega sproščanja hranil in vsebnost kalcija, ki vpliva na uravnavanje reakcije tal.

## 5 LITERATURA

- Allison F. E. The effect of Cyanamid and related compounds on the number of microorganisms in soil. *Journal of Agricultural Research*. 1924; 28 (11): 1159-1166.
- Berg G., Hallmann J. Control of plant pathogenic fungi with bacterial endophytes. V: Schulz BJE., Boyle CJC., Sieber TN, (ur), Springer-Verlag, Berlin. *Microbial Root Endophytes*, 2006. 53–69.
- Bjälfrve, G. The nitrification of calcium cyanamide and its effects on the soil microflora. *Annals of the Agricultural College of Sweden*. 1957; 23: 423-456.
- Bosch M; Amberger, A. Influence of long-term fertilising with different forms of nitrogen fertiliser on pH, humic fractions, biological activity and dynamics of nitrogen of an arable brown earth (Einfluß langjähriger Düngung mit verschiedenen N-Formen auf pH-Wert, Humusfraktionen, biologische Aktivität und Stickstoffdynamik einer Acker-Braunerde). *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde*. 1983; 146: 714-724.
- Bruggen A. H. C. Van Semenov A. M., Diepeningen A. D. Van Vos O. J. De Blok W. J. Relation between soil health, wave-like fluctuations in microbial populations and soil-borne plant disease management. *European Journal of Plant Pathology*. 2006; 115(1): 105-122.
- Cornforth, I. S. Calcium cyanamide in agriculture. *Soils and Fertilisers*. 1971; 34, 463-468.
- Di Gioia F; Gonnella M; Buono V; Ayala O; Cacchiarelli J; Santamaria P. Calcium Cyanamide Effects on Nitrogen Use Efficiency, Yield, Nitrates, and Dry Matter Content of Lettuce *Agronomy Journal*. 2017; 109(1): 354-362.
- Dixon G. R. Managing clubroot disease (caused by *Plasmodiophora brassicae* Wor.) by exploiting the interactions between calcium cyanamide fertilizer and soil microorganisms. *Journal of Agricultural Science*. 2017; 155 (4): 527-543.
- Dixon G. R. Calcium cyanamide-a synoptic review of an environmentally benign fertiliser which enhances soil health. *Acta Horticulturae*. 2012; 938, 211-217.
- Dixon, G. R. (2009). Calcium cyanamide -100 years of successful integrated control. *Plant Protection Science* 45, 37-38.
- Dixon G.R., Williamson, C.J. Factors affecting the use of calcium cyanamide for Control of *Plasmodiophora brassicae*. Proceedings Better Brassicas 1984 Conference, St. Andrews. Dundee: Scottish Crop Research Institute, (now the James Hutton Institute). 1985; 238-244.
- Fravel, D. R. Commercialization and implementation of bio control. *Annual review of Phytopathology*. 2005. 43: 337-359.
- Hall A. D. Calcium cyanamide. *Journal of Agricultural Science, Cambridge* 1905; 1: 146-148.
- Harling R., Klasse H. J. Calcium cyanamide-a unique source of nitrogen promoting healthy growth and improving crop quality of vegetables. *Improved crop quality by nutrient management*. 1999; 233-235.
- Klasse H. J. Calcium cyanamide-a unique source of nitrogen promoting healthy growth and improving crop quality of vegetables. *Improved crop quality by nutrient management*. 1999; 233-235.



- Lan T., Han Y., Roelcke M., Nieder R., Cai Z. Effects of the nitrification inhibitor dicyandiamide (DCD) on gross N transformation rates and mitigating N<sub>2</sub>O emission in paddy soils. *Soil Biology and Biochemistry*. 2013; 67:174-182.
- Lauber, CL, Hamady, M, Knight, R, & Fierer, N (2009). Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 5111–5120
- Miranda, V. H. B. Influence of nitrogenous fertilisers upon some soil characteristics. *Landwirtschaftliche Forschung*. 1975; 29 (1): 21-27.
- Mukerji B. K. Studies on calcium cyanamide. II. Microbiological aspects of nitrification in soils under varied environmental conditions. *Journal of Agricultural Science*. 1932; 22 (2): 335-347.
- Müller, H. Untersuchungen über die Wirkung des Cyanamids im Kalkstickstoff auf pathogene und nichpathogene Mikroorganismen des Bodens. *Archive für Mikrobiologie*. 1955; 22: 285-306.
- Pleysier J.L., Arora Y., Juo A.R.S. Nitrogen leaching and uptake from calcium cyanamide in comparison to urea and calcium ammonium-nitrate in an ultisol from the humid tropics. *Fertilizer research*. 1987; 12(3): 193-199.
- Rathsack K. Die nitrificide Wirkung des Dicyanamides. *Landwirtschaftliche Forschung*. 1978; 31: 347-358.
- Shi K., Wang L., Zhou Y.H. Yu Y.L., Yu J.Q. Effects of calcium cyanamide on soil microbial communities and *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. *Chemosphere*. 2009; 75: 872-877.
- Venter F. Einflüsse auf den Nitratgehalt von Kopfsalat (*Lactuca sativa* L. var. *capitata* L.). *Landw. Forsch., Sonderheft*. 1978; 35: 616–622.
- Venter F., Fritz P.D. Nitrate contents of kohlrabi (*Brassica oleracea* L. var. *Gongylodes* Lam.) as influenced by fertilization. *Qualitas Plantarum — Plant Foods for Human Nutrition*. 1979; 29(1-2): 179–186
- Vilsmeier K., Amberger A. Model experiments concerning the breakdown of powdered and granulated calcium cyanamide fertilisers. *Journal of Agronomy and Crop Science*. 1978; 147: 68-77.
- Willumsen A.J., McCall D. Kalkkvaelstof til salat. *Gartner tidende, arg*. 1997; 113(6): 6–7.

## UPORABNOST HMELJEVINE ZA PROIZVODNJO CELULOZNIH VLAKEN IN PAPIRJA

Janja ZULE<sup>1</sup> in Ema FABJAN<sup>2</sup>

Izvirni znanstveni članek / original scientific article

Prispelo / received: 23. 10. 2020

Sprejeto / accepted: 28. 11. 2020

### Izvleček

V raziskavi smo ovrednotili tehnološki potencial hmeljevine za proizvodnjo papirja in embalažnih izdelkov. Določili smo kemijsko sestavo biomase, in sicer vsebnost celuloze, hemiceluloze, lignina, ekstraktivnih snovi in pepela. Delež celuloze se je v povprečju gibal med 30 in 35 %. Hmeljevino smo laboratorijsko delignificirali po sulfatnem oz. kraft postopku z 38 % izkoristkom. Dobljena vlakna smo pregledali pod mikroskopom in jim izmerili optične ter mehanske lastnosti. Vlakna so zelo temna (ISO belina 16,2 %), nehomogena in imajo slabšo jakost (utržna dolžina 2942 m pri stopnji mletja 39 °SR) kot lesna in konopljina. S primerno predobdelavo hmeljevine ter z optimiranjem delignifikacije in mletja lahko tudi na pilotnem nivoju proizvedemo vlakna in papir iz hmeljevine za embalažne namene.

**Ključne besede:** hmeljevina, kemijska sestava, delignifikacija, lastnosti vlaken, proizvodnja embalažnega papirja

## USE OF HOP BIOMASS FOR PRODUCTION OF CELLULOSE FIBERS AND PAPER

### Abstract

Technological potential of hop biomass for paper and packaging production has been evaluated. Chemical composition of raw biomass including cellulose, hemicellulose, lignin, extractives and ash has been determined. Average portion of cellulose has ranged between 30 and 35 %. Hop biomass has been delignified on laboratory level according to sulphate or kraft procedure with 38 % pulp yield. The produced fibers have been examined under microscope after which optical and mechanical properties have been determined. Fibers are very dark (ISO whiteness 16,2 %), inhomogeneous and have lower strength (breaking length 2942 m at 39 °SR drainability) compared to wood and hemp. By implementation of appropriate pretreatment of hop biomass as well as optimisation of delignification and refining

---

<sup>1</sup> Dr., Inštitut za celulozo in papir, Bogišičeva 8, 1000 Ljubljana,  
e-pošta: janja.zule@icp-lj.si

<sup>2</sup> Dipl. inž. kem. teh., Inštitut za celulozo in papir, Bogišičeva 8, 1000 Ljubljana,  
ema.fabjan@icp-lj.si

processes it is possible to produce fibers and paper for packaging purposes on pilot level.

**Key words:** hop biomass, chemical composition, delignification, fiber properties, packaging paper production

## 1 UVOD

Lignocelulozna biomasa, ki sestavlja različna rastlinska tkiva, predstavlja bogat vir tehnološko uporabnih komponent, ki so potencialna surovina za posamezne gospodarske panoge, kot so papirna, tekstilna, kemična in farmacevtska industrija. Najpomembnejši je sicer les, ki se uporablja v gradbeništvu, pohištveni industriji ter za proizvodnjo celuloze in papirja, vendar pa imajo podobno kemijsko sestavo tudi oleseneli deli drugih rastlin. V kmetijstvu nastajajo po žetvi kulturnih rastlin in obrezovanju sadnih dreves velike količine odpadne biomase, ki jo večinoma sežigajo, kompostirajo ali uporabijo za steljo in krmilo v živinoreji pri čemer surovinski potencial materiala ni optimalno izkoriščen (Ashori, 2006).

Lignocelulozno biomaso sestavljajo trije strukturni polimeri, in sicer celuloza, hemiceluloza in lignin, poleg teh pa najdemo v njej še nizkomolekularne ekstraktivne spojine ter anorganske soli. Prevladujoča komponenta je celuloza, ki je najbolj razširjena organska snov v naravi. Sestavljena je iz velikega števila glukoznih enot, ki se povezujejo v ravne verige, te pa preko vodikovih vezi v večje strukturne enote, imenovane fibrile, ki sestavljajo celične stene vlaken. Hemiceluloza je razvejan polisaharid, ki ga sestavljajo pentozne (ksiloza, arabinoza) in heksozne (glukoza, manoza, galaktoza) monomerne enote in se prav tako nahaja v celičnih stenah. Lignin je v nasprotju z ogljikovimi hidrati tridimenzionalni, aromatski polimer, ki veže posamezna vlakna v trdno strukturo. Sestavljajo ga fenil-propanske enote, ki se med sabo povezujejo preko različnih kemijskih vezi. Posamezne vrste lignocelulozne biomase vsebujejo različne vsebnosti omenjenih strukturnih komponent. Običajno prevladuje celuloza, in sicer znaša njena vsebnost od 25 do 55 %, koncentracija hemiceluloz se giblje od 25 do 50 % in lignina od 15 do 40 % v suhi masi snovi. Največji delež celuloze se nahaja v lesu, in sicer več kot 40 % (Fengel in Wegener, 1984; Stenius, 2000, Alen, R., 2011).

Celulozna vlakna oz. olesenele celice so osnovna surovina za proizvodnjo papirja. Vlakna izoliramo iz biomase s kemijskim postopkom delignifikacije, pri katerem se pri visoki temperaturi in tlaku ob dodatku ustreznih reagentov lignin pretvori v topno obliko in se izloči v obliki ligninske lužnice. Danes je v svetu najbolj razširjen tehnološki postopek pridobivanja celuloze alkalni sulfatni oz. kraft postopek, pri katerem se kot reagent uporablja zmes NaOH in Na<sub>2</sub>S. Ligninske molekule se med delignifikacijo cepijo v manjše fragmente, ki se v obliki natrijevih

soli raztopijo v lužnici. Pri delignifikaciji se običajno odstrani tudi velik del hemiceluloze in ekstraktivnih snovi. Pridobljeno surovo celulozno pulpo je treba še temeljito sprati, razvlakniti in prebrati, da ločimo trske od vlaken. Za proizvodnjo različnih vrst papirja se izvaja mletje oz. defibriliranje, pri čemer vlaknom povečamo aktivno površino in s tem omogočimo boljšo vezavo v papirno strukturo in višje mehanske lastnosti. Po potrebi vlakna tudi belimo. Ligninska lužnica se po zgostitvi običajno uporablja kot energent, je pa tudi vir aromatskih spojin, ki imajo visoko tržno vrednost (Gullichesen in Fogelholm, 1999; Kopania in sod., 2012; Ververis in sod., 2003).

Primernost odpadne biomase za proizvodnjo celuloznih vlaken ni odvisna zgolj od zadostnega deleža vlaken ampak tudi od njihovih morfoloških (dolžina, širina, debelina celične stene) in mehanskih (utržni, raztržni in razpočni indeks) lastnosti. Vlakna iglavcev, ki so najpomembnejša za proizvodnjo papirja so relativno dolga in ozka in bistveno vplivajo na mehansko jakost, medtem ko so vlakna listavcev krajša in širša zato prispevajo k voluminoznosti, mehko in hkrati izboljšujejo tiskovne lastnosti papirja. Običajno uporabljamo pri izdelavi papirja mešanico dolgih in kratkih vlaken, poleg teh pa tudi anorganska polnila, škrob, klejivo in druga ustrezna pomožna sredstva. Za proizvodnjo 1 tone papirja potrebujemo 3 tone lesa oz. 17 dreves, ki v povprečju postanejo primerna za sečnjo šele po 50 in več letih rasti. Zaradi počasnega prirasta lesne biomase in njenih omejenih zalog postajajo vse bolj zanimivi alternativni viri, npr. ostanke stebel po žetvi ali obiranju pridelka (Karlsson, 2006). Med take ostanke prištevamo tudi hmeljevino.

Hmelj (*Humulus lupulus* L.) pripada družini konopljev, pri katerih stebelno biomaso sestavljata dve vrsti vlaken, in sicer dolga likova (ličje) v skorji in kratka lesna v sredici. Ličje vsebuje visok odstotek celuloze (> 70 %) in malo lignina (< 10 %), medtem ko ima sredica podobno kemijsko sestavo kot les. Pri tehnološkem pridobivanju vlaken iz hmeljevine je obe vrsti zelo težko oz. skoraj nemogoče mehansko ločiti med seboj, zaradi kompaktne strukture stebel (Reddy in Yang, 2009; Gašparič in sod. 2012). Medtem, ko so vlakna sorodne konoplje tradicionalna surovina v papirništvu (Zule in sod., 2013), pa o uporabnosti hmeljevine v literaturi nismo našli relevantnih podatkov. Namen naše raziskave je bil karakterizacija kemijske sestave hmeljevine in ocena njenega tehnološkega potenciala za pridobivanje celuloznih vlaken in proizvodnjo papirja.

## 2 MATERIALI IN METODE

### 2.1 Vzorci

Vzorci hmeljevine smo prejeli direktno iz nasadov hmelja v Savinjski regiji, in sicer v mesecu septembru 2017, 2018 in 2019, takoj po žetvi stebelne biomase. Najprej smo odstranili listje, preostali del pa posušili na zraku. Nekaj stebel smo

narezali na 1 cm velike fragmente, ki smo jih nato zmleli v laboratorijskem mlinu RETSCH ZM 200 do velikosti delcev 0,5 mm, Tako pripravljene vzorce smo nato uporabili za določitev kemijske sestave. Pred delignifikacijo smo zračno suha stebela hmeljevine narezali na približno 5 cm velike fragmente.

## 2.2 Kemijska analiza

Določili smo vsebnost celuloze, hemiceluloze, lignina, lipofilnih in hidrofilnih ekstraktivov ter pepela. Analize smo izvajali v skladu s standardnimi ali uveljavljenimi gravimetričnimi metodami.

Suhoto smo določili v skladu s SIST EN 14346 s sušenjem zmletih vzorcev pri 105 °C do konstantne mase.

Pepel smo določili s sežigom suhih vzorcev pri 525 °C v skladu s TAPPI T211 om-12. Vsebnost pepela (anorganske snovi) smo podali kot % v suhi masi

Vsebnost ekstraktivov (heksanski in etanolni ekstrakt - lipofilni in hidrofilni ekstraktivi) smo določili v skladu s standardom TAPPI T204. 5 g vzorca smo 8 ur ekstrahirali s heksanom v Soxhlet ekstraktorju. Dobljeni ekstrakt smo posušili na vakuumskem uparjalniku in nato še pri 105 °C do konstantne mase in stehali. Ekstrakcijo smo nadaljevali z etanolom pri enakih eksperimentalnih pogojih. Vsebnost heksanskega ekstrakta (lipofilni ekstraktivi) in etanolnega ekstrakta (hidrofilni ekstraktivi) smo podali kot % v suhi masi.

Vsebnost celuloze smo določili s Kürschner –Hofferjevo metodo. 1 g vzorca, ki smo ga predhodno ekstrahirali z etanolom smo zmešali s 25 mL nitracijske zmesi (20 mL 65 % HNO<sub>3</sub> in 80 mL etanola) in 1 uro segrevali na vodni kopeli pod reflusom. Postopek smo ponovili trikrat z enakim volumnom nitracijske zmesi, na to pa zmes odstranili in dodali 100 mL destilirane vode in pustili vreti 30 minut. Po tem smo vzorec prefiltrirali skozi steklen filterni lonček srednje gostote, trden preostanek pa temeljito sprali z etanolom in vročo vodo, posušili pri 105 °C in stehali. Vsebnost celuloze smo izračunali kot % v suhi masi vzorca (Kürschner in sod., 1931).

Hemicelulozo smo določili v skladu s kloritno metodo. 0,5 g predhodno ekstrahiranega vzorca smo dodali 60 mL vode, 100 µL ledocetne kisline in 0,5 g natrijevega klorita in stresali 1 uro pri 70 °C. Po tem času smo dodali 100 µL ledocetne kisline in 0,5 g natrijevega klorita ter ponovno segrevali pri enakih pogojih z občasnim mešanjem. Po treh zaporednih ponovitvah smo zmes ohladili in trden preostanek (holoceluloza) prefiltrirali skozi steklen filterni lonček srednje gostote. Izolirano holocelulozo (celuloza + hemiceluloza) smo sprali z vročo vodo, posušili pri 105 °C in stehali. Vsebnost hemiceluloze smo izračunali tako, da smo

od vsebnosti holoceluloze odšteli predhodno določeno celulozo. Vrednost smo izrazili kot % v suhi masi (Wise in sod., 1946).

Lignin smo določili kot Klasonov lignin po predhodni ekstrakciji z etanolom, v skladu s TAPPI T222-om11. 1 g vzorca smo dodali 15 mL 72 % žveplene kisline, ki pri sobni temperaturi hidrolizira celulozo in hemicelulozo do enostavnih sladkorjev. Po 2 urah smo vzorcu dodali toliko vode, da se je koncentracija kisline znižala na 3 %. Zmes smo pustili vreti 4 ure, nakar smo jo prefiltrirali skozi steklen filterni lonček srednje gostote. Filterni preostanek smo sprali z vročo vodo, posušili pri 105 °C in stehtali. Vsebnost lignina smo podali kot % v suhi masi.

Vse analize smo izvedli v 3 paralelkah. Dobljeni rezultati so povprečne vrednosti vseh meritev.

Sestavo posameznih izoliranih frakcij smo preverjali s pomočjo FTIR spektroskopske analize.

Infrardeče spektre visoke ločljivosti smo posneli na aparatu Perkin Elmer Spectrum Two v ATR tehniki, in sicer v območju med 400 in 4000  $\text{cm}^{-1}$ .

### **2.3 Delignifikacija biomase**

400 g suhe biomase smo v laboratorijskem delignifikatorju zmešali z 2 litra vodne raztopine NaOH in  $\text{Na}_2\text{S}$ , katerih koncentracija je bila 18 % in 6 % glede na suho maso vzorca. Delignifikacija je potekala pri 160 °C 3 ure pri tlaku 7 bar. Uporabili smo delignifikator proizvajalca UECIN s prostornino 5 litrov. Po končani delignifikaciji smo odstranili nastalo ligninsko lužnico, izolirano celulozno pulpo pa temeljito sprali z vodo, da smo odstranili ostanke kemikalij in lignina ter določili vlakninski izkoristek. Groba celulozna vlakna smo nato pomleli v Valley mlinu do ustrezne stopnje, ki smo jo določili po standardu ISO 5267-1.

### **2.4 Mikroskopija vlaken**

Vlakna smo pregledali pod optičnim mikroskopom Nikon pri 40 kratni povečavi.

### **2.5 Mehanske in optične lastnosti**

Stopnjo mletja smo določili iz vlakninske suspenzije po ISO 5267-1. Mehanske lastnosti smo določili iz vlakninskih listov, ki smo jih pripravili v skladu s standardom ISO 5269-2 na laboratorijskem oblikovalniku Rapid-Köthen. V skladu s standardnimi metodami smo ovrednotili naslednje parametre: gramaturo (ISO 536), debelino in specifični volumen (ISO 534), utržne lastnosti (ISO 1924-2), raztržni indeks (ISO 1974), razpočni indeks (ISO 2758), togost (2493-1), poroznost

(ISO 5636-3), gladkost (ISO 5627), hrapavost (8791-2), ISO belino (ISO 2470-1) in opaciteto (ISO 2471).

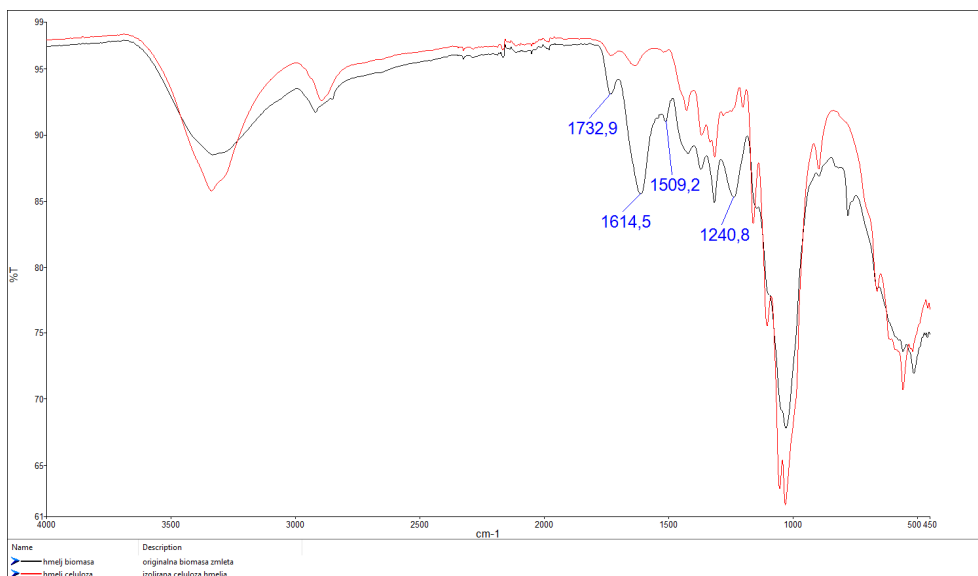
### 3 REZULTATI

Rezultati kemijske analize stebelne biomase so zbrani v preglednici 1. Prevladujoča komponenta je celuloza, katere vsebnosti so se gibale med 30 in 35 %, kar je v primerjavi z lesom (40 - 45 %) znatno manj. Nekoliko manj je tudi lignina, medtem ko so koncentracije pepela in ekstraktivnih komponent sorazmerno visoke. Med slednjimi prevladujejo hidrofilne, v etanolu topne nizkomolekularne spojine, med katerimi običajno najdemo tudi bioaktivne, fenolne komponente, ki predstavljajo zaščito tkiv proti mikrobom in insektom, medtem ko se v heksanskem ekstraktu olesenelih rastlinskih tkiv nahajajo predvsem maščobne kisline, steroli, voski in trigliceridi (Stenius, 2000). Natančnejše sestave ekstraktivnih snovi v sklopu projekta nismo določali.

*Preglednica 1. Kemijska sestava stebelne biomase hmelja*

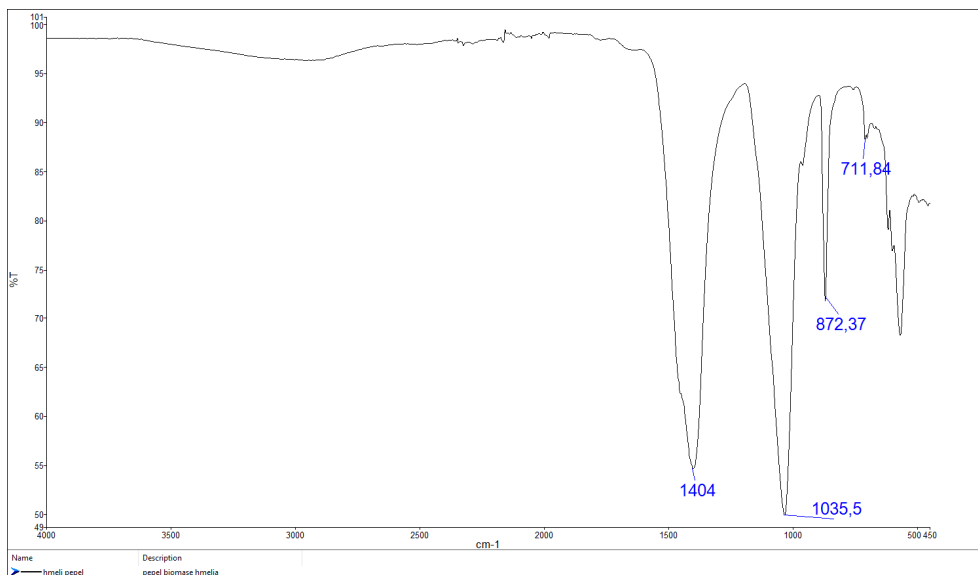
leto vzorčenja	suha snov (%)	pepel (%)	heksanski ekstrakt (%)	etanolni ekstrakt (%)	celuloza (%)	hemi-celuloza (%)	lignin (%)
2017	95	6,3±0,3	0,80±0,04	7,8±0,4	30±2	28±1	18±1
2018	95	5,4±0,3	0,55±0,03	7,9±0,4	35±2	32±2	20±1
2019	97	6,7±0,4	0,96±0,05	9,8±0,5	32±2	29±2	19±1

Vse omenjene komponente smo kvantitativno ovrednotili po izolaciji iz biomase. Čistost posameznih izoliranih frakcij smo preverjali s pomočjo FTIR spektrov. Slika 1 prikazuje spektra zmlete hmeljevine in izolirane celuloze. Prvi vsebuje karakteristične absorpcijske vrhove celuloze (897, 1031, 1054, 1160, 1104, 1315, 1368, 1428 in 1634  $\text{cm}^{-1}$ ), hemiceluloze (1732 in 1240  $\text{cm}^{-1}$ ) in lignina (1614 in 1509  $\text{cm}^{-1}$ ), medtem ko na spektru celuloze ni več absorpcijskih vrhov slednjih dveh (Xu in sod., 2013).



**Slika 1:** FTIR spektra hmeljevine in izolirane celuloze

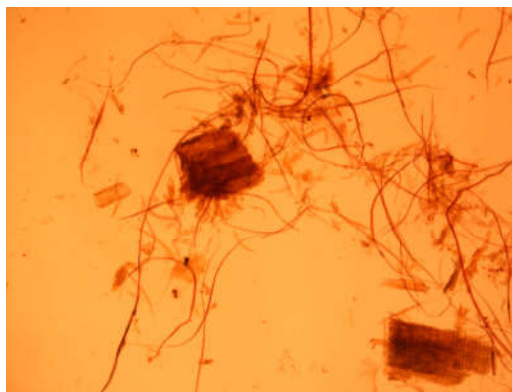
Posneli smo tudi FTIR spekter pepela (slika 2), ki ima karakteristične absorpcijske vrhove kalcijevega karbonata ( $1404$ ,  $872$  in  $711$   $\text{cm}^{-1}$ ) in silikata ( $1035$   $\text{cm}^{-1}$ ) (Kalembkiewicz in sod., 2018).



**Slika 2:** FTIR spekter pepela hmeljevine



Pri delignifikaciji narezane, zračno suhe biomase smo dobili 38 % izkoristek surove celulozne pulpe. Pridobljena vlakninska masa je bila temno obarvana in zelo nehomogena. Vsebovala je precejšen delež zelo dolgih vlakninskih prepletov, zato običajen laboratorijski postopek nadaljnje obdelave, vključujoč razvlaknjevanje, prebiranje (ločba vlaken od trsk) in homogenizacijo, ni bil mogoč zaradi dolgih, nitastih struktur, ki jih je bilo nemogoče ločiti na posamezna vlakna. Material se zapleta na strojni opremi, zato je nadaljnje procesiranje zelo oteženo. Temeljito sprano celulozno pulpo smo v nadaljevanju mehansko obdelali v Valley mlinu z namenom zrahljanja omenjenih, kompaktnih struktur. Mikroskopski pregled je pokazal, da tako pripravljeno maso sestavljajo dolga nitasta vlakna, poleg teh pa tudi drugi delci, npr. prevodne celice s perforirano površino in posamezne trske oz. skupki (slika 3).



**Slika 3:** Mikroskopija (40x povečava)



**Slika 4:** Hmeljevina, pulpa in vlakninski list

Iz celulozne pulpe smo pripravili vlakninske liste (slika 4) in izmerili najpomembnejše mehanske in optične lastnosti. Rezultati so zbrani v preglednici 2.

Listi so bili temno obarvani, saj je bila izmerjena belina zgolj 16,2 % (lestvica od 1 do 100). Izmerjena utržna dolžina 2942 m pri srednji stopnji mletja 39 °SR nakazuje slabšo mehansko jakost vlaken kot v primeru lesnih vrst pri enaki stopnji mletja, kjer vrednosti presegajo 6000 m. Utržna dolžina je dolžina papirnega traku, pri kateri se trak pretrga zaradi lastne teže. Primerjava s sorodno konopljo pokaže, da ima ta pri skoraj enaki stopnji mletja (36°SR) utržno dolžino, ki presega 8000 m. Poleg tega ima konoplja tudi višji razpočni indeks (3,86 kPam<sup>2</sup>/g) a manjši raztržni indeks (2,47 mNm<sup>2</sup>/g) (Zule, 2016).

**Preglednica 2:** *Mehanske in optične lastnosti vlaken hmelja*

Parameter	Vrednost
stopnja mletja [°SR]	39
gramatura [g/m <sup>2</sup> ]	65,5
debelina [μm]	154
specifični volumen [cm <sup>3</sup> /g]	2,35
utržni indeks [Nm/g]	28,9
utržna dolžina [m]	2942
raztržni indeks [mNm <sup>2</sup> /g]	3,42
razpočni indeks [kPam <sup>2</sup> /m]	1,3
togost L&V, 15° [mN]	63
gladkost Bekk [s]	6,8
poroznost Bendtsen [mL/min]	902
hrapavost PPS [um]	5,92
ISO belina [%]	16,2
opaciteta [%]	100,9

Iz hmeljevine, ki vsebuje v povprečju okrog 33 % celuloze, je z delignifikacijo možno pridobiti surovo, vlakninsko pulpo. Zaradi žilavosti materiala in prepletenosti vlakninskih svežnjev, je po običajnem laboratorijskem postopku, ki sledi delignifikaciji, praktično nemogoče izolirati homogeno maso, ki bi jo sestavljala posamezna vlakna. Z alternativnim postopkom mletja v Valley mlinu lahko celulozno pulpo sicer delno razvlaknimo, vendar pa material še naprej ostaja precej nehomogen. V vsakem primeru bi bilo treba celoten laboratorijski postopek od priprave biomase za delignifikacijo do razbitja nitastih struktur v surovi pulpi in izolacije posameznih vlaken optimirati (Oggiano in sod., 1997; Mohieldin, 2014).

Prenos na pilotni nivo je zaradi kompaktnosti materiala dokaj zahteven, vendar izvedljiv. Predvsem je treba hmeljevino mehansko čim bolj razcepiti pred delignifikacijo, da zagotovimo večjo stično površino za reakcijo z delignifikacijskim sredstvom. Posebno pomembna je tudi energetska zahtevna faza mletja surove pulpe. Za izdelavo papirja moramo vlaknom hmeljevine dodati še komercialno celulozo, škrob, karbonatno polnilo in klejivo. Delež hmeljevine v vlakninski sestavi bi lahko znašal med 20 % in 40 %. Na osnovi naših izkušenj pri pilotni izdelavi papirja iz invazivnih rastlin, paradižnikovih stebel in jutovine predvidevamo, da bi bil papir iz hmeljevine uporaben predvsem za izdelavo embalažnih izdelkov, kot so podstavki, pladnji, vrečke in škatle (Verweris in sod., 2004). Na pilotnem papirnem stroju na Inštitutu za celulozo in papir lahko iz 1 tone suhe biomase proizvedemo okrog 0,9 tone papirja. Iz 1 kg papirja v povprečju izdelamo okrog 50 embalažnih vrečk srednje velikosti. Proizvodnja papirja iz

»odpadne« stebelne biomase je tipičen primer krožnega gospodarstva, saj lahko izdelke po uporabi tudi recikliramo.

#### 4 ZAKLJUČKI

Raziskava primernosti hmeljevine za proizvodnjo celuloznih vlaken in papirja je pokazala, da bi tudi hmeljevina lahko postala ena od alternativnih surovin za pilotno proizvodnjo embalažnih vrst papirja. Njena kemijska sestava je primerljiva s stebelno biomaso nekaterih poljščin, s povprečno vsebnostjo celuloze okrog 35 %. V primerjavi s slamo, koruzovino in konopljo ima hmeljevina bolj kompaktno strukturo stebel, ki jo je težje delignificirati in razvlakniti, medtem ko so izolirana vlakna zelo temne barve. Tehnološki potencial je možno izboljšati s pravilnim izborom vhodne surovine, ki naj bo čim bolj olesenela, z optimizacijo celotne proizvodne sheme in pravilnim izborom končnih produktov, kot so npr. manj zahtevne vrste embalaže.

**Zahvala.** Delo je bilo opravljeno znotraj razvojno-raziskovalnega programa CELKROG »Izkoriščanje potenciala biomase za razvoj naprednih materialov in bio-osnovanih produktov«, ki je sofinanciran s strani Republike Slovenije, Ministrstvo za izobraževanje, znanost in šport in Evropske unije, Evropski sklad za regionalni razvoj 2016-2020.

#### 5 LITERATURA

- Alen, R. Biorefining of Forest Resources. Book 20 (Papermaking Science and Technology), Paperi ja Puu Oy, Porvoo, Finland, 2011: 29-50
- Ashori, A. Nonwood fibers a potential source of raw material in papermaking. Journal of Macromolecular Science: Part D- Reviews in Polymer Processing. 2006; 45 (10): 1133-1136
- Fengel, D. in Wegener, G. Wood Chemistry, Ultrastructure, Reactions, Walter de Gruyter, Berlin, New York, 1984: 66-226
- Gašparič, P., Urisk, Z., Križanec, A., Munda, M., Hribernik, S., Kurečič, M., Kreže, T., Sfiligoj Smole, M. Naravno obnovljiva rastlinska tekstilna vlakna. Tekstilec. 2012; 55(4): 302-313
- Gullichsen, J. in Fogelholm, C.J. Papermaking Science and Technology . Chemical Pulping 6A. Helsinki, Fapet Oy 1999: 493-573
- ISO 534: 2011 Paper and board - Determination of thickness, density and specific volume
- ISO 536: 2019 Paper and board - Determination of grammage
- ISO 1924-2: 2008 Paper and board - Determination of tensile properties -Part 2: Constant rate of elongation method (20 mm/min)
- ISO 1974: 2012 Paper - Determination of tearing resistance - Elmendorf method
- ISO 2470-1: 2016 Paper, board and pulps - Measurement of diffuse blue reflectance factor Part 1: Indoor daylight conditions (ISO brightness)
- ISO 2471: 2008 Paper and board - Determination of opacity (paper backing) — Diffuse reflectance method

- ISO 2493-1: 2010 Paper and board - Determination of bending resistance - Part 1: Constant rate of deflection
- ISO 2758: 2014 Paper - Determination of bursting strength
- ISO 5267-1: 1999 Pulps - Determination of drainability - Part 1: Schopper-Riegler method
- ISO 5269-2: 2004 Pulps - Preparation of laboratory sheets for physical testing - Part 2: Rapid-Köthen method
- ISO 5627: 1995 Paper and board - Determination of smoothness (Bekk method)
- ISO 5636-3: 2013 Paper and board - Determination of air permeance (medium range) -Part 3: Bendtsen method
- ISO 8791-2: 2013 Paper and board - Determination of roughness/smoothness (air leak method)
- Kalembkiewicz, J., Galas, D., Sitarz-Palczak, E. The Physicochemical Properties and Composition of Biomass Ash and Evaluating Directions of its Applications. Polish Journal of Environmental Studies. 2018; 27 (6): 1-11
- Karlsson, H. Fibre Guide. Fibre analysis and process applications in the pulp and paper industry. 1. izd., Kista: AB Lorentzen & Wettre 2006: 5-120
- Kopania, E., Wietecha, J., Ciechanska, D. Studies on isolation of Cellulose Fibres from Wast Plant Biomass. Fibres and Textiles in Eastern Europe. 2012; 20, 6B (96): 167-172
- Kürschner, K., Hoffer, A. Eine Neue quantitative cellulosebestimmung. Chemiker Zeitung. 1931; 17, 161-168
- Mohieldin, S.D. Pretreatment Approaches in Non-wood Plants for Pulp and Paper Production: A Review. Journal of Forest Products & Industries. 2014; 3(2): 84-88
- Oggiano, N., Angelini, L.G., Cappepetto, P. Pulping and paper properties of some fibre crops. Industrial Crops and Products. 1997; 7 (1): 59-67
- Reddy, N. in Yang, Y. Properties of natural cellulose fibers from hop stems. Carbohydrate Polymers. 2009; 77 (4): 898-902
- SIST EN 14346: 2007 Karakterizacija odpadkov - Izračun suhe snovi z določitvijo suhega ostanka ali vode
- Stenius, P. Forest Products Chemistry, Book 3 (Papermaking Science and Technology), Fapet Oy, Jyväskylä, Finland, 2000: 59-107
- TAPPI T204 Solvent extractives of wood and pulp
- TAPPI T211 om-12 Ash in wood, pulp, paper and paperboard: combustion at 525 °C
- TAPPI T222 om-02 Acid-insoluble lignin in wood and pulp
- Ververis, C., Georghiou, K., Christodoulakis, N., Santas, P., Santas, R. Fiber dimensions, lignin and cellulose content of various plant materials and their suitability for paper production. Industrial Crops and Products. 2004; 19: 245-254
- Wise, L.E., Murphy, M., D'Addieco, A.A. Chlorite holocellulose, its fractionation and bearing on summative wood analysis and studies on the hemicelluloses. Paper Trade Journal. 1946; 122 (2): 35-43
- Xu, F., Yu, J., Tesso, T., Dowell, F., Wang, D. Qualitative and quantitative analysis of lignocellulosic biomass using infrared techniques: A mini-review. Applied Energy, 2013, 104: 801-809
- Zule, J., Černič, M., Šuštaršič, M. Uporabnost konopljinih vlaken v papirništvu. Papir. 2013; 41(9): 34-36
- Zule, J. Uporaba vlaken iz odpadne konopljine biomase za proizvodnjo papirja. Poročilo projekta Poly4Emi. Inštitut za celulozo in papir, Ljubljana 2016

## DINAMIKA IN RAZPOREDITEV TEMPERATURE V KOMPOSTNIH KUPIH IZ HMELJEVINE

Lucija LUSKAR<sup>1</sup> in Barbara ČEH<sup>2</sup>

Izvirni znanstveni članek / original scientific article

Prispelo / received: 24. 10. 2020

Sprejeto / accepted: 6. 12. 2020

### Izveček

Kompostiranje na kmetiji je lahko učinkovit, ekonomičen in okoljsko varen proces reciklaže odpadne biomase. V projektu LIFE BioTHOP razvijamo biorazgradljivo vrvico za oporo hmelja, izdelano iz polimlečne kisline (PLA), ki pri kompostiranju pri visokih temperaturah (>50 °C) hidrolizira do netoksičnih snovi. Namen poskusa je bil ugotoviti dinamiko sprememb temperature v kompostnih kupih hmeljevine pri različnih načinih kompostiranja na kmetijah v povezavi z oceno razgrajenosti PLA vrvice. Vsi kompostni kupi so dosegli dovolj visoko temperaturo za začetek razgradnje PLA vrvice, vendar je v večini kupov temperatura prehitro padla. Nepokrit kup z majhnimi delci hmeljevine je visoko temperaturo (nad 55 °C) ohranjal najdlje, okoli 43 dni. Preveliki delci hmeljevine (večji od 10 cm) so pomenili prehitro sušenje kupov; v tem primeru bi bilo potrebno kup pogosto zalivati. Pokrivanje kupa s polprepustno folijo ni smiselno, saj se je kup prehitro osuševal, zalivanje pa je bilo zaradi folije oteženo. V kupu, pokritem z neprepustno folijo, se ne glede na velikost delcev dobro zadržuje vlaga. Črna folija sicer podaljša termofilno fazo, a ne v zunanjem sloju 30 cm, volumsko okrog 1/3 kupa. Najboljša razgradnja vrvice je bila v kupu, kjer je bila trta razrezana na delce, manjše od 5 cm, kup pa je bil nepokrit. Za uspešno razgradnjo večjih delcev PLA je potrebno zmanjšati velikost delcev trte na okoli 3 cm, izvajati vlaženje kupa in spremljati temperaturo kupa ter jo ohranjati na 55 °C vsaj 5 tednov oziroma čim dlje ter kup glede na meritve temperature večkrat premešati. Pridobljeni podatki bodo v pomoč pri oblikovanju smernic za enostavno kompostiranje, ki ga bodo hmeljarji izvajali sami na kmetijah.

**Ključne besede:** hmeljeovina, kompostiranje, temperature, PLA, vrvica, higienizacija

<sup>1</sup> Mag. biotehnol., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Cesta Žalskega tabora 2, 3310 Žalec, Slovenija, e-pošta: lucija.luskar@ihps.si

<sup>2</sup> Dr., isti naslov, e-pošta: barbara.ceh@ihps.si

## DYNAMICS AND DISTRIBUTION OF THE TEMPERATURE IN HOP BIOMASS COMPOST PILES

### Abstract

On-farm composting could be an efficient, cost-effective and environmentally safe biological process for the recycling of residual agricultural biomass. Project LIFE BioTHOP is developing biodegradable twine for hop plant support, made from polylactic acid (PLA). In composting at elevated temperatures ( $>50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) the PLA can hydrolyse to non-toxic substances. The research goal was to find out the course of temperature curves in compost piles of hop biomass after harvest (green waste that stays after cones harvest) in different on site compost treatments in correlation with PLA twine degradation assessments. All composts have reached the limit temperature for PLA degradation but in most of the piles the temperature dropped too soon. Uncovered pile with small particles of hop stems maintained high temperature (over  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) for the longest time (about 43 days). If the particles of hop stems were too long (over 10 cm), the pile dried out too soon, and in this case moisture should be maintained by regular watering. Covering of the pile with semipermeable cover wasn't efficient as the pile dried out fast and watering was difficult. If the pile was covered with impermeable foil, the particle size didn't play a role as the moisture conditions were good in airtight covered piles. Black impermeable foil extended the thermophilic phase of compost but not on the outer edge of pile (30 cm, 1/3 of the pile). For successful decomposition of larger PLA particles, it is necessary to reduce the size of stem particles to about 3 cm, mix the piles several times according to temperature measurements, perform humidification, monitor the temperature and keep it at  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$  for at least 5 weeks or as long as possible. The data obtained will help to formulate guidelines for easy composting, which will be carried out by hop growers themselves on farms.

**Key words:** hop biomass after harvest, composting, temperature, PLA, twine, hygienisation

### 1 UVOD

Kompostiranje na kmetiji je lahko učinkovit, ekonomičen in okoljsko varen proces reciklaže odpadne biomase (Maniatakis in sod., 2004). Kompostiranje je eksotermna razgradnja, ki je odvisna od mešanice materiala, vlage, prostornine, velikosti delcev in njihove razporeditve, mešanja in zračenja. Vsi parametri, ki so za kompostiranje pomembni, lahko vplivajo na temperaturo v kompostnem kupu. Temperatura pri kompostiranju nastaja zaradi procesov razgradnje in mikrobne aktivnosti, na katero ima tudi neposreden vpliv; mikrobi med razgradnjo proizvajajo toploto, le-ta pa vpliva na mikrobne populacije (Epstein, 1997). Kontrolirano kompostiranje se izvaja za vzdrževanje temperature, ki omogoča razmnoževanje različnim mikrobnim združbam. Le-te se delijo na psihrofilne

(delujejo pri 4–20 °C; bakterije, glive), mezofilne (delujejo pri 15–42 °C; bakterije, aktinomicete in glive) in termofilne (delujejo pri 45–75 °C; bakterije, aktinomicete, sporogene bakterije) (Amlinger in sod., 2009).

Kompostiranje je teoretično sestavljeno iz treh faz: mezofilne faze (do 45 °C), termofilne faze (do 70 °C) in faze stabilizacije (ohlajanje). Večina mikrobov, pomembnih za kompostiranje, najbolje uspeva pri temperaturah nad 50 °C (Epstein, 1997). Termofilna faza je pomembna za eliminacijo rastlinskih patogenov (Bollen in Volker, 1996). Če material vsebuje patogene, je v kompostnem kupu potrebno vzdrževati temperaturo nad 55 °C vsaj nekaj dni (Epstein, 1997). To najlažje dosežemo v začetku kompostiranja, ko je na voljo največ lahko dostopnega ogljika in je mikrobna aktivnost največja. Eradikacija patogenov je odvisna od temperature in časa. Kot navaja Uradni list Republike Slovenije (RS) (št: 99/2013), so pri odprtem kompostiranju z naravnim zračenjem potrebna daljša obdobja visokih temperatur kot pri zaprtem kompostiranju s kontinuirnim zračenjem. Iz preglednice v Uradnem listu RS (št: 99/2013) je razvidno, da je za ustrezno higienizacijo kupa, ki doseže 60 °C, kjer temperaturo merimo 1-krat dnevno, potrebno 2-krat obračanje/mešenje kupa, temperatura tega kupa pa mora biti vsaj 3-krat 3 dni na 60 °C. Postopek takšnega kompostiranja je sledeč: temperatura se najprej poveča do 60 °C, počakamo 3 dni (še vedno merimo temperaturo), in če je temperatura v vseh treh dneh višja od 60 °C, potem kup premešamo, počakamo, da se temperatura ponovno dvigne na 60 °C. Ko zabeležimo vsaj tri dni, ko je temperatura enaka ali višja 60 °C, potem ponovno premešamo. Ko se temperatura ponovno dvigne na 60 °C in pri tej ali višji temperaturi vztraja vsaj 3 dni, potem je kompost teoretično higieniziran (preglednica 1).

**Preglednica 1:** Možnosti režima temperatura/čas za zagotavljanje higienizacije (Ur. L. RS št: 99/2013)

minimalna temperatura	merjenje temperature z uporabo sonde	število obračanj	zahtevano minimalno časovno obdobje dosežene minimalne temperature po posameznem obračanju	število zaporednih dni pri minimalni temperaturi	minimalno obdobje merjenja (dni)
<b>odprto kompostiranje z naravnim ali prisilnim zračenjem</b>					
55 °C	kontinuirano	5	4 ure	–	14
55 °C	diskontinuirano dnevno	3	–	14 x 1 dan	14
60 °C	diskontinuirano dnevno	2	–	3 x 3 dni	14
65 °C	diskontinuirano dnevno	1	–	2 x 3 dni	14
<b>zaprto kompostiranje s prisilnim zračenjem</b>					
55 °C	kontinuirano	–	–	4	10
65 °C	kontinuirano	–	–	3	10

Hmeljevina je ostanek zelene mase rastlin hmelja, ki ostane po strojnem obiranju storžkov (listi in stebela, prepletena z vrvico, ki služi hmelju tekom rastne dobe kot opora). Ker se v času obiranja iz hmeljišča odpelje celotna nadzemna masa hmelja, predstavlja hmeljevina po obiranju storžkov dragocen vir organske mase in hranil za vračanje na kmetijske površine. Z enega hektarja dobimo zajeto v masi hmeljevine 21–22 kg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 50–71 kg K<sub>2</sub>O, 32–41 kg MgO, 5,5 kg S in 88–99 kg N, razmerje med C in N pa je 13 (Čeh in sod., 2019). Za mikrobnost rast potrebujemo 15–30 enot ogljika na enoto dušika (Epstein, 1997). Hmeljevina je z vidika hranil dovolj dober medij za rast mikrobov.

Za oporo pri rasti hmelja se najpogosteje uporabljajo polipropilenske vrvice, saj so enostavne za uporabo in cenovno ugodne. Vendar pa le-te pri kompostiranju hmeljevine predstavljajo velik problem, saj so biološko nerazgradljive.

V projektu LIFE BioTHOP za potrebe hmeljarstva razvijamo biorazgradljivo vrvico, izdelano iz polimlečne kisline (PLA), ki pri kompostiranju hidrolizira do netoksičnih snovi, in sicer CO<sub>2</sub>, vodo, biomaso in druge naravne snovi (Wilfred in sod., 2018). Cilj je izdelati vrvico, ki bo biorazgradljiva v procesu kompostiranja na kmetijah. PLA je sintetičen kompostabilni biopolimer, ki hidrolizira pri visokih temperaturah (>50 °C), kot produkt pa se izloča mlečna kislina (Drumright in sod., 2000; Garlotta 2002, Kawai, 2010). Za uspešno razgradnjo je pri kompostiranju pomembna toplota (>50 °C), vlaga in prisotnost mikrobov (Kale in sod., 2007; Karamanlioglu in Robson, 2013; Karamanlioglu in sod., 2017; Saadi in sod., 2012). Mikroorganizmi, ki so sposobni razgradnje PLA so: *Penicillium roquefort*, *Amycolatopsis* sp., *Bacillus brevis*, *Rhizopus delemar*, pomembni pa so tudi njihovi encimi, kot so proteinaze, lipaze in PLA depolimeraze (Pathak in Navneet, 2017). Potrebna višina temperature in dolžina trajanja višjih temperatur za uspešno razgradnjo se sicer od materiala do materiala razlikuje, v vsakem primeru pa ustrezne temperaturne razmere v kompostnem kupu vplivajo na stopnjo razgradnje PLA, zato je spremljanje le-te ključnega pomena.

Namen predstavljenega poskusa je bil ugotoviti temperaturne razmere v kompostnih kupih hmeljevine pri različnih načinih kompostiranja. Zanimala nas je tudi razgradnja PLA vrvice po štirih mesecih kompostiranja, s ciljem ugotoviti najbolj primerne postopke ravnanja s hmeljevino za dobro razgradnjo PLA vrvice.

## 2 MATERIAL IN METODE DELA

Poskus kompostiranja smo izvedli v sezoni 2019/2020 (od septembra 2019 do maja 2020) in je obsegal 5 kupov hmeljevine (preglednica 2). Štiri kupe smo postavili na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS) in enega pri hmeljarju. Vsak kup smo naredili tako, da smo po obiranju hmelja (1 ha) iz hmeljevine (okrog 15 ton), prepletene s PLA vrvico, z nakladačem oblikovali trapezoidni kompostni



kup višine 2 m. Vsi kupi so bili sestavljeni iz celotne mase hmeljevine (listi in trte), razlika pa je bila v dodatkih za kompostiranje, pogostosti mešanja kupa in uporabi pokrivke.

**Preglednica 2:** Lastnosti kompostnih kupov v poskusu

Oznaka	Lokacija	Velikost delcev	Dodatek	Pokrivka	Mešanje	Št. temp. sond v kupu
1	IHPS	10–30 cm	/	Toptex	1	3
2	IHPS	10–30 cm	EM	Toptex	3	2
3	IHPS	10–30 cm	EM	Črna folija	/	2
4	IHPS	10–30 cm	Biooglje in <i>Folsomia candida</i>	Črna folija	/	1
5	Hmeljar	2–20 cm	/	/	2	0

Kup 1 smo pokrili s Toptex, perforirano pokrivno folijo, ki po opisu proizvajalca ohranja optimalne razmere vlažnosti, odvaja padavinske vode s površine in preprečuje izsuševanje. Premešali smo ga enkrat, in sicer 4. dan, ko se je temperatura kupa v sredici povišala na 68 °C. Tega kupa nismo vlažili.

Kup 2 smo oblikovali tako, da smo med nasipom hmeljevine s traktorsko škropilnico nanesti 25 litrov učinkovitih mikroorganizmov (EM<sup>®</sup>, sestava: voda, melasa sladkornega trsa, mlečnokislinske bakterije, fotosintetske bakterije, kvasovke, morska sol; proizvajalčevo priporočilo o nanosu: 1 L /m<sup>3</sup>), da preverimo ali lahko z vnosom teh mikroorganizmov vplivamo na potek razgradnje (praksa na nekaterih kmetijah). Prekrili smo ga s TopTex pokrivko. Kup smo po šestih dneh, ko se je temperatura povišala na 60 °C, prvič premešali in zalili z vodo (80 litrov, do primerne omočenosti – test s pestjo). Po 13-ih dneh od začetka kompostiranja se je temperatura spet povišala na 60 °C in kup smo ponovno premešali in pustili odprtega, da je po njem deževalo, saj je bil zelo suh. Po 20-ih dneh smo ponovno opazili, da je kup suh, zato smo ga odkrili in pustili, da ga je omočil dež. Po 22-ih dneh smo kup tretjič premešali. Po dveh mesecih smo ga odkrili, da ga je ponovno omočil dež.

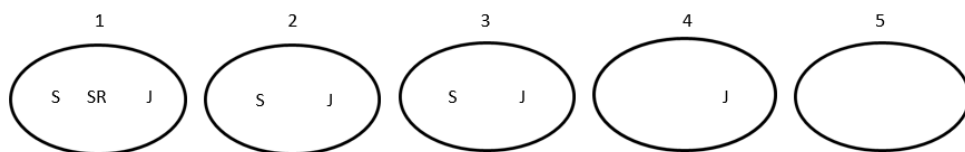
Za tretiranje kupa 3 smo uporabili 35 litrov EM, ker je bil ta kup volumsko večji v primerjavi s kupom 2. Mešanico smo tako kot pri kupu 2 nanesti s traktorsko škropilnico, kup pa prekrili s črno folijo in spremljali razgradnjo po sistemu bokashi – preverjanje sistema, ki se izvaja na nekaterih hmeljarskih kmetijah v praksi. Gre za siliranje oz. mlečno-kislinsko fermentacijo. To pomeni, da poteka fermentacija s pomočjo dodanih mikroorganizmov v odsotnosti oz. pri zelo nizkih koncentracijah kisika (Merfield, 2013). V takem sistemu teoretično do bistvenega pregrevanja naj ne bi prihajalo. Kupa nismo mešali.

Kupu 4 smo dodali 100 kg biooglja (navodila proizvajalca: na površino 1m<sup>2</sup> in debelino 10–20 cm kompostnega materiala dodamo 1–2 kg biooglja) in 10 kg biooglja, inokuliranega s kandido (členonožec – *Folsomia candida*), in ga pokrili s črno folijo. Biooglje je zaradi visoke poroznosti in velike površine dober absorbent, ki lahko zadrži pomembna hranila, kot so N, C in S pa tudi vlago (Guo in sod., 2016). Dodatek kandidate pomaga pri razgrajevanju organske snovi in uničevanju patogenih gliv (Fountain in Hopkin, 2005). Tega kupa nismo mešali.

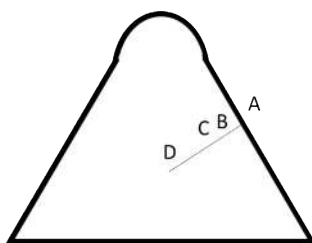
Kup 5 smo pustili nepokrit in ga dvakrat med kompostiranjem premešali, in sicer po enem mesecu, ko je bila temperatura kupa že dalj časa okoli 60 °C in po dveh mesecih, ko je temperatura začela padati.

Mešanje kupov je potekalo z nakladačem tako, da smo kup po delih prestavili na drugo lokacijo in s tem omogočili mešanje in zračenje kupa.

Za kontinuirano merjenje temperature v sredici kupa smo v štiri kupe (slika 1) vstavili TinyTag<sup>®</sup> temperaturne logerje s sondo v merilnem območju od -40 °C do +85 °C (Loggers, 2014). Logerji so podatke beležili vsakih 30 min. Temperaturo po globinah kupov smo merili tudi ročno, in sicer s prirejenim termometrom TFA<sup>®</sup> z merilnim območjem od -20 do +300 °C (slika 2). Ročne meritve smo izvajali enkrat dnevno, 5 dni na teden, 4 tedne, nato pa 1x tedensko. Temperaturni podatki iz sond TinyTag<sup>®</sup> zajemajo obdobje štirih mesecev (september–januar), razen za kup 4, kjer imamo podatke za 2 meseca (september in oktober). Tako logerji s sondami kot ročni termometer so bili pred začetkom izvajanja poskusov kalibrirani.



**Slika 1:** Tlorisni prikaz pozicije TinyTag temperaturnih sond v kupu. Legenda: S - sever, SR - sredina, J - jug



**Slika 2:** Kompostni kup v prerezu. Legenda: A - rob, B - 30 cm pod robom, C - 50 cm pod robom, D - sredica oz. 100 cm pod robom

Vlago kompostnih kupov smo preizkušali s testom s pestjo. V dlan smo vzeli kompost in ga stiskali v pesti 10 sekund. Če je med prsti pritekla tekočina, je pomenilo da je kup premoker in ga je potrebno dobro prezračiti, da se osuši, če pa so se delčki lomili in pokali, je pomenilo, da je kup bil presuh in ga bi bilo potrebno zaliti. Primerno navlažen kompost se je po stisku v pesti stisnil v kepo, vendar se je z lahkoto drobil.

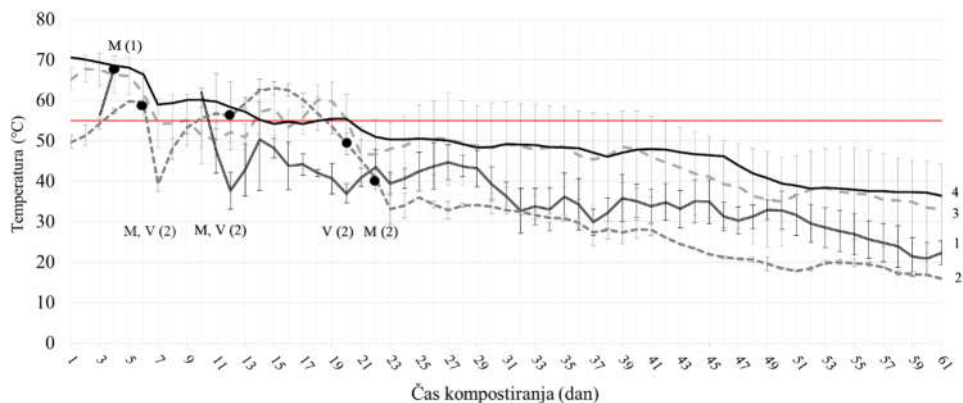
Po sedmih mesecih od postavitve kupov smo naredili vizualno oceno razgrajenosti PLA vrvice v vsakem kupu posebej in le to primerjali s pridobljenimi temperaturnimi podatki.

Podatke smo uredili z računalniškim programom Excel.

### 3 REZULTATI Z RAZPRAVO

#### 3.1 Temperatura v sredici kupov, izmerjena s TinyTag sondami

Slika 3 prikazuje povprečno maksimalno dnevno temperaturo posameznega kupa v sredici (merjeno s TinyTag). Zaradi preglednosti je prikazana krivulja le do 61. dne. Povprečna maksimalna dnevna temperatura kompostnega kupa v sredici, glede na čas meritve na sliki, prikazuje razpon maksimalnih temperatur iz različnih sond enega kupa. Linija na grafu je povprečje maksimalnih temperatur enega kupa, standardna deviacija pa je razlika med maksimalnimi temperaturami v določenem dnevu med vsemi sondami enega kupa (slika 1).



**Slika 3:** Povprečna maksimalna dnevna temperatura kompostnega kupa v sredici glede na čas meritve (dan kompostiranja 1 do 61) in kompostni kup (linija 1 = kup 1, linija 2 = kup 2, linija 3 = kup 3 in linija 4 = kup 4; črni krogi ponazarjajo aktivnost, in sicer: M (1) = mešanje kupa 1, M, V (2) = mešanje in vlaženje kupa 2, V (2) = vlaženje kupa 2, M (2) = mešanje kupa 2). Prikazan tudi razpon meritve – razlika med temperaturo na S in J strani kupa.

V preglednici 3 so prikazane povprečne standardne deviacije temperatur med sondami enega kupa in tudi posameznih sond v enem dnevu.

Razvidno je, da se temperatura v kompostnem kupu hmeljevine poviša zelo hitro, in sicer lahko že po enem dnevu na 70 °C, kar se je zgodilo v kupu 3 z dodanimi mikroorganizmi in pokritim s črno folijo in kupu 4 z dodanim bioogljem in *Folsomia candida* ter pokritim s črno folijo. Dodani mikroorganizmi in *Folsomia* najverjetneje pri tej temperaturi propadejo, a ker je temperatura tako visoka le v sredici, se lahko mikroorganizmi v drugih predelih ohranijo in razmnožijo. Prisotnosti mikroorganizmov tekom procesa sicer nismo spremljali.

Temperaturna grafa kupov 3 in 4 sta si zelo podobna, saj sta bila oba kupa pokrita s črno folijo. Temperatura v teh dveh kupih je bila skoraj ves čas višja kot v kupih, pokritih s TopTex pokrivko (kupa 1 in 2). Najdlje je uspelo temperaturo v sredici ohranjati višjo od 55 °C v kupu 4, in sicer 17 dni. Po tem času noben kup ni več presegel te temperature. Torej je zelo pomembno, da kompostni kup postavimo takoj po obiranju, saj je razgradnja najbolj intenzivna prve tri tedne; takrat je največ lahko dostopnih hranil in so obenem tudi zunanje temperature višje kot kasneje v letu. Vlažnost v kupih 3 in 4 je bila ugodna (pri testu s pestjo se delci niso lomili, temveč so se ob stisku oblikovali v krhko grudo), ker črna folija ne prepušča vlage. Kupa 3 in 4 prikazujeta anaerobno razgradnjo (bila sta zrakotesno zaprta). Po navedbah Epsona (1997) tudi v kupih z aerobno razgradnjo že 2 uri po prezračevanju pade koncentracija kisika v sredici kompostnega kupa na 0 %. To nakazuje dobre temperaturne pogoje za mikrobno aktivnost in higienizacijo v sredici kupa.

Tudi v kupu 2 (s TopTex pokrivko in trikratno mešanje) smo z mešanjem uspeli dalj časa ohraniti višjo temperaturo, a ne dlje kot v kupih, pokritih s črno folijo. V kupu 1 (TopTex pokrivka in enkratno mešanje) je temperatura padla najhitreje. Po pregledu smo ocenili, da je bil kup presuh (kup smo odkopali in naredili test s pestjo; vsebina je bila krhka), zaradi česar je bila mikrobna aktivnost onemogočena. Tudi pri kupu 2 smo opazili hitro izsuševanje zaradi mešanja, zato smo kup tudi zalivali. Kljub temu se je kup precej izsušil, kar pripisujemo precej velikim delcem, ki so omogočali boljši pretok zraka, s tem pa tudi sušenje. Tak način kompostiranja (samo enkratno mešanje in brez dodatkov) za tako velike delce hmeljevine (10–30 cm) ni najbolj primeren, oziroma bi bilo potrebno veliko truda vložiti v redno navlaževanje in preverjati temperaturno nihanje. Vsekakor se nakazuje velik pozitiven vpliv trikratnega mešanja v primerjavi z mešanjem kupa le enkrat. Som in sod. (2004) so kompostirali zeleni odpad in bio-odpad iz gospodinjstev v razmerju 4:1. Kup so vlažili in obračali vsakih 18 dni v termofilni fazi, ki je trajala 75 dni, kar nakazuje na to, da bi bilo v našem primeru bolje večkrat premešati kup. Milinkovič in sod. (2019) so kompostirali zeleni odpad iz parkov, ki so ga mešali na začetku procesa vsakih 10 dni, po termofilni fazi pa

enkrat na mesec. Večina poskusov nima priloženega temperaturnega grafa, kar otežuje primerjavo naših podatkov z drugimi.

**Preglednica 3:** Povprečno dnevno variiranje temperatur (standardna deviacija (°C)) glede na kompostni kup

	Vrsta variiranja temperature	Zajeto obdobje	Št. kompostnega kupa			
			1	2	3	4
<b>Povprečno dnevno variiranje (SD)</b>	Med najvišjimi dnevnimi temperaturami med vsemi sondami v kupu	Čas merjenja*	3	1	8,5	/ **
	Med najnižjo in najvišjo izmerjeno temperaturo na eni sondi	Čas merjenja*	3,5	2	2	1
	Med najnižjo in najvišjo izmerjeno temperaturo na eni sondi	1. mesec	7	6	5	1,5

\* V času merjenja temperatur; kup 1=132 dni; kup 2= 122 dni; kup 3= 122 dni; kup 4= 68 dni

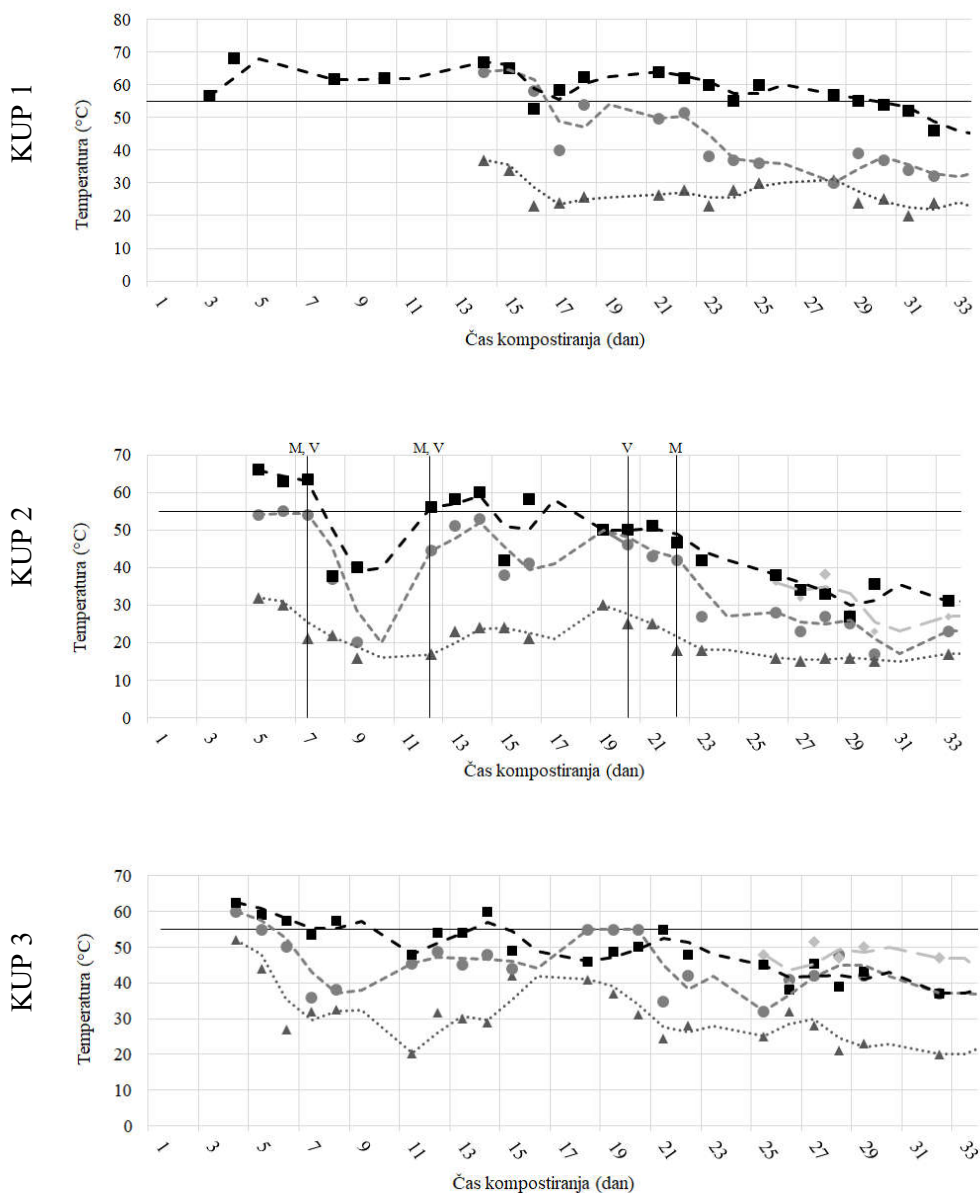
\*\* Le ena delujoča sonda v kupu

Če pogledamo posamezne kupe, so si bile najvišje izmerjene dnevne temperature med sondami znotraj enega kupa v kupih pokritih s Toptex bolj podobne (kupa 1 (SD = 3 °C) in 2 (SD = 1 °C)) kot v kupu pokritem s črno folijo, kjer je bila razlika med sondami tudi do 17 °C (kup 3 (SD = 8,5 °C)). V kupu 3 so temperature med sondo na severu in sondo na jugu velike razlike, kar lahko vidimo tudi na sliki 3, kjer je grafično prikazana razlika (SD je razlika med S in J). Na jugu je temperatura v povprečju za 10 °C višja kot na severu kupa. To jasno nakazuje potrebo po rednem mešanju kupa, da pride vsa biomasa vsaj enkrat v toplejše predele. Na severu kupa 4 sonda na žalost ni delovala, zato nimamo podatkov za primerjavo. Kup 2 je bil trikrat premešan, zato je temperatura v takšnem kupu bolj homogena, zato je tudi manjše variiranje temperature med sondama.

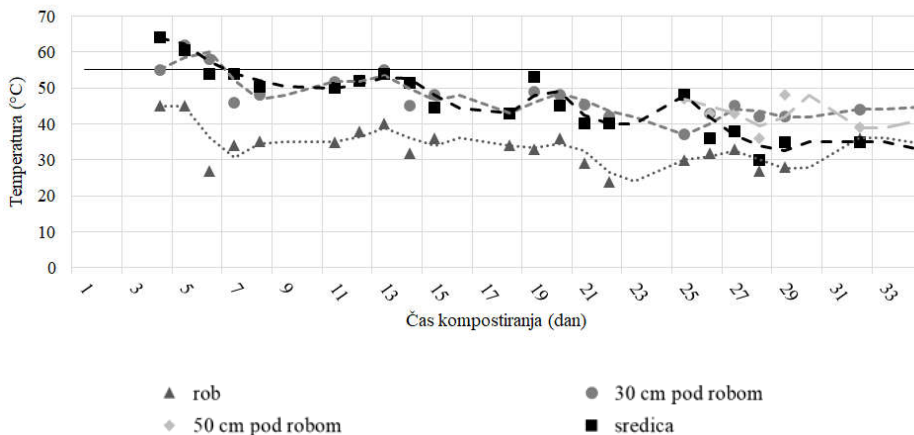
Temperaturna dnevna nihanja med najvišjo in najnižjo izmerjeno temperaturo v kupu 1 so zelo velika in v povprečju znašajo okoli 3,5°C od povprečja, kar pomeni, da se v povprečju tekom štirih mesecev kompostiranja temperatura v enem dnevu lahko spremeni za 7 °C. Kupi 2, 3 in 4 so imeli manjše dnevno nihanje temperatur. V prvem mesecu kompostiranja so dnevna temperaturna nihanja med najvišjo in najnižjo temperaturo največja. Kup 1 je imel največjo temperaturno nihanje. Do velikih dnevnih nihanj je v prvem mesecu kompostiranja prišlo tudi v kupu 2, kjer smo kup mešali in ga s tem dodatno ohladili a tudi homogenizirali, ter v kupu 3. V kupu 4 nismo izmerili velikih dnevnih temperaturnih nihanj. V kupu 3 velikih dnevnih nihanj nismo pričakovali, saj se kup manj ohladi čez noč, lahko pa so nihanja posledica močnejšega segrevanja tekom dneva zaradi vpijanja toplote preko črne folije.

### 3.2 Temperatura glede na globino

Slika 4 prikazuje ročno izmerjene temperature glede na globino v kompostnem kupu (slika 2) v prvem mesecu kompostiranja.



KUP 4



**Slika 4:** Temperatura kupa glede na globino, merjena z ročno sondno. Liki predstavljajo meritve, ki smo jih povezali s trendno črto, M = mešanje kupa, V = vlaženje kupa.

Pri merjenju temperatur na različnih globinah smo ugotovili, da je temperatura kupa običajno najvišja v sredici. V pokritih kupih se temperatura kupa na globini 30 cm v povprečju razlikuje od temperature v na globini 1 m za 10 °C. Zaradi tega smo dodali še eno točko meritve, to je 50 cm pod površjem in v 4. tednu ugotovili, da je temperatura v območju 50 cm pod površjem lahko višja kot v sredici kupa. Temperatura v površinskem sloju kupa (sloj debeline okrog 30 cm) nikoli ne preseže 55 °C, kar pomeni, da v nepremešanem kupu ta zunanji sloj ni higieniziran. Takšni predeli so potencialen vir fitopatogenov, kot je na primer verticilij, in se lahko prenesejo na preostali del kupa. Nehigieniziran kompost je neuporaben za kmetijske površine. Težava v tem primeru pa je tudi razgradnja PLA vrvice, do katere v robnem delu takšnega komposta ne pride. Temperatura roba (okrog 30 cm) je v kupih, pokritih s črno folijo, višja kot v drugih dveh, vendar vseeno ne dovolj visoka za higienizacijo ali razgradnjo PLA vrvice. Mikrobne združbe, ki vršijo razgradnjo, se spreminjajo glede na temperaturo v določenem delu kompostnega kupa. Hitra sprememba temperature pomeni spremembo mikrobne združbe, to pomeni, da v prehodu iz mezofilne v termofilno fazo eno mikrobno združbo zamenja druga (Ryckeboer in sod., 2003). Pri višjih temperaturah od 60 °C lahko pride do zaviranja procesa mikrobne aktivnosti (McKinley in Vestal, 1984). Razgradnja pri različnih temperaturah je, poleg ostalih ključnih parametrov, odvisna od pestrosti mikrobnih združb (Chandna in sod., 2013).

Če primerjamo temperaturo v sredici kupov, izmerjeno z ročnimi meritvami in meritvami s TinyTag sondami, opazimo razlike. V kupih 2 in 3 je bila ročno

izmerjena temperatura med maksimalno in minimalno temperaturo, izmerjeno s TinyTag sondo, kar je razumljivo, saj smo ročno meritev izvajali v eni časovni točki dneva, ki je bila lahko nekje med minimalno in maksimalno temperaturo. V kupu 1 je bila ročno izmerjena temperatura višja od maksimalne temperature, izmerjene s TinyTag sondo, kar je posledica nižje heterogenosti kupa. V kupu 4 je delovala le sonda na južni strani, kjer je bil verjetno zaradi dodatnega segrevanja preko črne folije temperatura višja kot drugod v kupu, kjer je bila merjena temperatura na različnih globinah, zato so bile ročno izmerjene temperature nižje.

Ugotovili smo, da je temperatura v kompostnem kupu razporejena nehomogeno. Sonda, ki je kontinuirano merila temperaturo, je bila v enem delu kupa, z ročno sondo pa smo merili v različnih predelih. Pri kupih 2, 3 in 4 je ročno izmerjena temperatura nekje med min in max T določenega dneva, saj je bila ročno izmerjena temperatura izmerjena v eni časovni točki dneva. S tem smo ugotovili, da slednje ni dovolj oziroma je pri takšnem načinu merjenja potrebno biti zelo pozoren, saj je lahko temperatura v enem dnevu zelo različna, kar je razvidno iz preglednice 3. Razporeditev temperature v kompostnih kupih sta podrobno preučevala Fernandes in Zhan (1994), ki se ugotovila, da se je temperaturna razporeditev odvisna od načina kompostiranja in se tekom kompostiranja spreminja, vsekakor pa je različna v različnih predelih kupa.

Pridobljeni podatki bodo v pomoč pri oblikovanju smernic za enostavno kompostiranje, ki ga bodo hmeljarji izvajali sami na kmetijah.

### 3.3 Ustreznost temperaturnih razmer za razgradnjo PLA

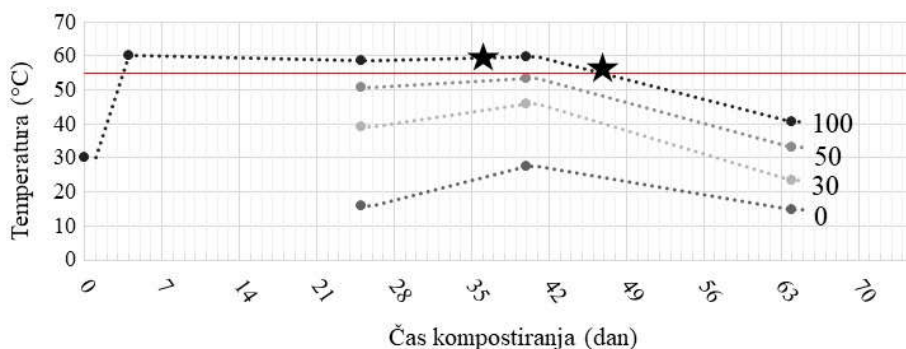
PLA je trajen material, ki se razgradi le v določenih pogojih. Karamanliogu in Robson (2013) sta pokazala, da PLA izgubi svojo natezno trdnost v kompostu pri 55 °C že po 9–12-ih dneh, po treh tednih pa fizično razpade. Za razgradnjo PLA v kompostu potrebujemo okoli 3 tedne (Ho in sod., 1999), vse pa je odvisno od oblike materiala in parametrov kompostiranja. Karamanliou in sod. (2017) so ugotovili, da PLA začne hidrolizirati po 9-ih dneh pri 55 °C, za popolno razgradnjo pa je potrebno to temperaturo komposta vzdrževati vsaj 1 mesec. V kupu 1 je po podatkih ročno izmerjenih temperatur visoka temperatura vztrajala dovolj dolgo, da bi se PLA vrstica lahko razgradila (preglednica 4). Iz opazovanj in na podlagi testov s pestjo vemo, da je bil ta kup presuh in vrstica je bila še vedno vidna, kljub temu da je bil v prvem tednu, ko je bila temperatura najvišja, enkrat premešan. V kupu 2 temperatura nad 55 °C ni vztrajala dovolj dolgo, da bi teoretično prišlo do popolne razgradnje PLA vrstice. V kupu 3 in 2 je visoka temperatura vztrajala najdlje, vendar kupa nista bila premešana. V sredici je res prišlo do pogojev za razgradnjo PLA vrstice, vendar na robovih ti pogoji niso bili doseženi.



**Preglednica 4:** Kumulativno število dni s temperaturo višjo od 55 °C - primerjava z maksimalno izmerjeno temperaturo

		Kompostni kup				
		1	2	3	4	5
Št. dni nad	TinyTag *	8	12	13	17	/
55 °C	Ročno	22	9	12	5	ocenjeno na 43

Za primerjavo dodajamo kup št. 5, ki je bil postavljen pri hmeljarju. Od IHPS kupov se je razlikoval po velikosti delcev, ki so bili v tem kupu manjši. Hmeljar je kup dvakrat premešal, namočen pa je bil ob vsakih padavinah. Visoka temperatura (nad 55 °C) v kupu je po podatkih ročnih meritve vztrajala okoli 43 dni (slika 5), kar je dovolj za razgradnjo PLA vrvice. Za kompostiranje je najbolj optimalna velikost delcev od 5–20 cm (Román in sod., 2015). Preveliki delci povečujejo zračne prostore, kar povzroči pretirano ohlajanje in sušenje kupa, to pa onemogoči mikrobnno delovanje. Nasprotno pa manjši delci onemogočajo dostop kisika, kar povzroči anaeroben način razgradnje in nastanek smradu (Duckworth, 2005).



**Slika 5:** Kompostni temperatura po globinah v kompostnem kupu 5. Z debelejšimi pikami so prikazane meritve, z zvezdico pa je označeno mešanje. Desno je označena globina kupa za posamezno temperaturno krivuljo v cm.

Zadnje vzorčenje kompostov je potekalo v aprilu, kar je 7 mesecev od začetka kompostiranja. Vrvica je bila takrat vidna še v vseh kupih, torej se v nobenem kupu ni popolnoma razgradila. Razgrajenost je korelirala z velikostjo delcev, kot smo opazili že v vmesnih pregledih. V kupu 5, kjer je bila vrvica narezana na zelo majhne koščke oz. je bila scefšana, kar je omogočalo večjo kontaktno površino, je bila vrvica najboljše razgrajena. V kupih 1–4 je bilo vidno več vrvice. V kupu 1 je bila vrvica najslabše razgrajena, kar je verjetno posledica velikih delcev in prenizke vlage. Vrvica v kupu 2 je bila boljše razgrajena kot v kupu 1, saj je bil kup premešan. Zaradi ohranjanja vlage je bila vrvica v sredici kupov 3 in 4 boljše razgrajena kot v kupih 1 in 2. Kljub temu vrvica ni bila razgrajena po zunanjih delih kupa, kjer ni prišlo do hidrolize in kasnejšega razpada.

#### 4 ZAKLJUČKI

Termofilne razmere ( $>45$  °C) se vzpostavijo že en dan po postavitvi kupa hmeljevine in lahko vztrajajo dolgo ob primernem ravnanju s kompostom. Kup je potrebno mešati, da dosežemo higienizacijo. Kupi 1–4 niso dosegli zahtev za higienizacijo kompostov, saj kljub doseženi visoki temperaturi le-ta ni vztrajala dovolj dolgo, ali pa kup ni bil premešan dovolj pogosto. Ustrezne temperature za higienizacijo je zaradi dovolj na drobno narezanega materiala in mešanja dosegel kup 5, kar kaže na velik pomen velikosti delcev – da so le-ti čim manjši. Pomembno je tudi zalivanje s ciljem vzdrževanja vlage v optimalnem okvirju 50–60 % v kupu za podaljšanje termofilne faze.

V primeru kupov 1 in 2 so bili delci preveliki (10–30 cm ali večji) za aerobno razgradnjo, zato so se kupi hitro sušili. V tem primeru bi bilo potrebno podrobneje nadzorovati vlago in kup pogosto zalivati. V kupih 3 in 4 se je vlaga zaradi črne folije ne glede na velikost delcev dobro zadrževala. V kupu 5 so bili delci primerne velikosti (manjši od 5 cm), zato je kup dolgo ohranjal visoko temperaturo in tudi vlago, saj je bilo manj zračnih niš.

Temperatura pri nenadzorovanem kompostiranju (domače kompostiranje) je različna glede na mesto meritve kot tudi na del dneva, v katerem izvajamo meritve. Temperatura se dnevno niža in viša, različna je glede na globino, zato jo je potrebno izmeriti večkrat dnevno, vsak dan ob enakem času ali pa meritve izvajati kontinuirano.

Pokrivanje s TopTex se v primeru delcev velikosti od 10–30 cm ni dobro obneslo, saj je prišlo do sušenja. V tem primeru bi bilo bolje kupe izpostaviti vremenskim razmeram, saj bi z deževjem dosegli primerno vlago v kupih, ali pa bi morali izvajati zalivanje kupov. Kompostiranje hmeljevine namreč poteka od sredine septembra do marca/aprila, ko ni poletne vročine. Pokrivanje kupov je smiselno za namen preprečevanja spiranja hranil v času stabilizacije komposta. V primeru uporabe črne folije smo ugotovili, da folija sicer podaljša termofilno fazo, a je bila v zunanjem sloju po kompostiranju vrhica še vidna, zato bi v tem primeru bilo bolje, da bi kompostiranje v prvem mesecu potekalo aerobno in bi kup vsaj štirikrat premešali, nato pa bi ga pokrili s črno folijo, da preprečimo izpiranje hranil in izhlapevanje.

Nakazalo se je, da dodatka bioogljje in mikroorganizmi v naših primerih nista zaznavno vplivala na potek temperaturnih krivulj.

Ustrezne razmere za kompostiranje neposredno vplivajo na razgradnjo PLA vrvice. Le-ta se je po sedmih mesecih kompostiranja najbolje razgradila v primeru kupa 5 (ni bila več vidna), kjer so bili delci na obiralnem stroju razrezani na dolžino, krajšo od 5 cm, in se je zaradi tega tudi bolje ohranjala vlaga. Večja površina

vrvice omogoča več kontaktne površine, s čimer se poveča možnost hidrolize in mikrobne razgradnje. Iz našega poskusa sklepamo, da je za uspešno razgradnjo večjih delcev PLA vrvice potrebno zmanjšati velikost delcev trte na okoli 3 cm, izvajati vlaženje kupa, spremljati temperaturo ter jo ohranjati na 55 °C vsaj 5 tednov oziroma čim dlje ter kupe glede na meritve temperature večkrat premešati.

**Zahvala.** Raziskava in članek sta nastala v okviru evropskega projekta LIFE BioTHOP Vpeljava biorazgradljive vrvice v hmeljišča in uporaba hmeljevine v novih industrijskih produktih. Projekt je sofinanciran v okviru programa LIFE Evropske Unije, Ministrstva za okolje RS, občin Spodnje Savinjske doline (Braslovče, Polzela, Prebold, Tabor, Vranksko in Žalec) in Združenja hmeljarjev Slovenije. Za prispevek sta odgovorni avtorici in v nobenem primeru Evropska Komisija.

## 5 LITERATURA

- Amlinger F., Peyr S., in Müsken J. State of the art of Composting. Austrian Ministry for Agriculture and Forestry, Environment and Water Management. 2009.
- Bollen G. J. in Volker D. Phytohygienic aspects of composting. V: The science of composting. Springer, Dordrecht. 1996; 233-246.
- Chandna P., Nain L., Singh S. in Kuhad R. C. Assessment of bacterial diversity during composting of agricultural byproducts. BMC microbiology. 2013; 13(1):99.
- Čeh B., Luskar L., Čremožnik B. Hmeljevina kot vhodni material za kompostiranje. Hmeljarski bilten. 2019; 26:81-90.
- Drumright R. E., Gruber P. R. in Henton D. E. Polylactic acid technology. Advanced materials. 2000; 12(23):1841-1846.
- Duckworth, G. (2005). The Composting industry Code of Practice. Composting Association.
- Epstein, E. Basic Concepts. V: The Science of Composting. Epstein E. , 1997. Lancaster, Technomic Publishing Inc. 1991; 19-52.
- Fernandes L., Zhan W., Patni N. K. in Jui P. Y. Temperature distribution and variation in passively aerated static compost piles. Bioresource Technology. 1994; 48(3):257-263.
- Fountain M. T. in Hopkin, S. P. Folsomia candida (Collembola): a "standard" soil arthropod. Annu. Rev. Entomol. 2005; 50, 201-222.
- Garlotta D. A Literature review of Poly(lactic acid). Journal of Polymers and the Environment. 2002; 9:63e84.
- Guo M., He Z., in Uchimiya S. M. Introduction to biochar as an agricultural and environmental amendment. Agricultural and environmental applications of biochar: Advances and barriers. 2016; 63, 1-14.
- Ho K. L. G., Pometto A. L., Gadea-Rivas A., Briceño J. A. in Rojas A. Degradation of polylactic acid (PLA) plastic in Costa Rican soil and Iowa state university compost rows. Journal of environmental polymer degradation. 1999; 7(4):173-177.
- Kale G, Auras R, Singh SP. Comparison of the degradability of poly(lactide) packages in composting and ambient exposure conditions and science. Packaging Technology and Science: An International Journal, 2007; 20(1):49-70.
- Karamanlioglu M. in Robson G. D. The influence of biotic and abiotic factors on the rate of

- degradation of poly (lactic) acid (PLA) coupons buried in compost and soil. *Polymer Degradation and Stability*, 2013; 98(10):2063-2071.
- Karamanlioglu M., Preziosi R. in Robson G. D. The compostable plastic poly (lactic) acid causes a temporal shift in fungal communities in maturing compost. *Compost Science & Utilization*. 2017; 25(4): 211-219.
- Kawai F. Polylactic acid (PLA)-degrading microorganisms and PLA depolymerases. *Green Polymer Chemistry: Biocatalysis and Biomaterials* American Chemical Society. 2010. 405-414.
- Loggers G. D. Tinytag Plus 2 Internal Temperature (-40 to+ 85 C) TGP-4017 Data Sheet, Issue 9: 17th October 2014 (E&OE). 2014.
- Maniadakis K., Lasaridi K., Manios Y., Kyriacou M., Manios T. Integrated waste management through producers and consumers education: composting of vegetable crop residues for reuse in cultivation. *Journal of Environmental Science and Health Part B*. 2004; 39:169–183.
- McKinley V. L. in Vestal J. R. Biokinetic analyses of adaptation and succession: microbial activity in composting municipal sewage sludge. *Applied and Environmental Microbiology*. 1984; 47(5): 933-941.
- Merfield, C. N. Treating food preparation ‘waste’ by Bokashi fermentation vs. composting for cropland application: A feasibility and scoping review. Lincoln, New Zealand: The BHU Future Farming Centre. 2013.
- Milinković M., Lalević B., Jovičić-Petrović J., Golubović-Čurguz V., Kljujev I. in Raičević V. Biopotential of compost and compost products derived from horticultural waste—effect on plant growth and plant pathogens' suppression. *Process Safety and Environmental Protection*. 2019; 121:299-306.
- Pathak V. M. Review on the current status of polymer degradation: a microbial approach. *Bioresources and Bioprocessing*. 2017; 4(1):15.
- Pathak V. M., Navneet (2017) Review on the current status of polymer degradation: A microbial approach. *Bioresour. Bioprocess* 4: 1-31
- Román P., Martínez M. M. in Pantoja A. Farmer’s compost handbook Experience in Latin America. 2015. Dostopno na: <http://www.fao.org/3/a-i3388e.pdf> (oktober 2020)
- Ryckeboer J., Mergaert J., Vaes K., Klammer S., De Clercq D., Coosemans J. in Swings J.. A survey of bacteria and fungi occurring during composting and self-heating processes. *Annals of microbiology*, 2003; 53(4):349-410.
- Saadi Z, Rasmont A, Cesar G, Bewa H, Benguigui L. Fungal degradation of poly(l-lactide) in soil and in compost. *Journal of Polymers and the Environment*. 2012; 20(2):273-282.
- Som M. P., Lemée L. in Amblès A. Stability and maturity of a green waste and biowaste compost assessed on the basis of a molecular study using spectroscopy, thermal analysis, thermodesorption and thermochemolysis. *Bioresource technology*. 2009; 100(19): 4404-4416.
- Uredba o predelavi biološko razgradljivih odpadkov in uporabi komposta ali digestata. Uradni list RS (99/2013). 2013; 99: 10787.
- Wilfred O., Tai H., Marriott R., Liu Q., Tverezovskiy V., Curling S. in Wang W. Biodegradation of polylactic acid and starch composites in compost and soil. *International Journal of Nano Research*. 2018; 1:1-11.

## ANTIBAKTERIJSKI UČINKI HMELJA

Zala KOLENC<sup>1</sup> in Urban BREN<sup>2</sup>

Pregledni znanstveni članek / review article

Prispelo / received: 22. 6. 2020

Sprejeto / accepted: 29. 10. 2020

### Izvleček

Hmelj ter hmeljni ekstrakti izkazujejo široko paleto blagodejnih bioloških aktivnosti vključno z antimikrobnimi lastnostmi. V članku so podane osnovne metode za določanje antibakterijske vrednosti naravnih ekstraktov. V nadaljevanju so sistematično predstavljene tudi znane antibakterijske lastnosti hmelja, hmeljnih ekstraktov ter posameznih hmeljnih komponent. Rezultati antimikrobnih študij so zelo uporabni zavoljo globalnega povečanja odpornosti bakterij na antibiotike. Naravni ekstrakti hmelja in drugih rastlin bi lahko učinkovito nadomestili antibiotike in pripomogli k zmanjšani antimikrobni rezistenci. Po drugi strani pa bi bili lahko hmeljni ekstrakti učinkovito uporabljeni tudi v farmacevtski, veterinarski, živilski in kozmetični industriji, saj se njihova antimikrobna aktivnost ekstraktov hmelja izkazuje na širokem spektru bakterij.

**Ključne besede:** hmelj, hmeljni ekstrakti, antibakterijska aktivnost

## ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF HOPS

### Abstract

Hop and hop extracts exert a wide range of beneficial biological activities including antimicrobial properties. In this work, basic technologies to determine antibacterial activities of natural extracts, are presented. The studied antibacterial effects of hop, hop extracts and various hop components are discussed as well. Hop extracts and extracts from other plants should be effective in the fight against the increasing global antimicrobial resistance. On the other hand, hop extracts could be used in pharmaceutical, veterinary, food and cosmetic industries due to their significant antimicrobial activities against a wide range of bacteria.

**Keywords:** hops, hop extract, antibacterial activities

---

<sup>1</sup> asist.dr., Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Smetanova ulica 17, 2000 Maribor, e-pošta: zala.kolenc@um.si

<sup>2</sup> izr. prof. dr., Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Smetanova ulica 17, 2000 Maribor, e-pošta: urban.bren@um.si

## 1 UVOD

Narava nam je podarila več skupin kemijskih spojin rastlinskega izvora, ki premorejo številne blagodejne zdravstvene učinke. Mnoge lastnosti posameznih spojin so že znane, a vendar jih ne znamo popolnoma izkoriščati, saj še ne razumemo vseh njihovih mehanizmov delovanja. Po drugi strani pa se v zadnjih letih pojavljajo okužbe z bakterijami, ki jih zaradi antibakterijske odpornosti vedno težje zdravimo. Bakterije, ki so odporne na antibiotike se po svetu širijo zelo hitro, kar povzroča veliko težav pri zdravljenju infekcijskih bolezni. Antibakterijska odpornost je posledica neterapevtske uporabe ter nepravilne in prepogoste rabe antibiotikov (Kavanagh in sod., 2017). Po svetu že potekajo akcijski načrti (in tudi njihova izvedba) v obliki omejitvenih ukrepov pri uporabi antibiotikov za zdravje ljudi in živali (WHO, 2020), vendar to še zdaleč ne bo rešilo planetarnega izziva antimikrobne odpornosti. Zato je odkritje novih antibakterijskih spojin ključnega pomena. Več naravnih spojin, ki premorejo široko strukturno raznolikost, je v znanstveni literaturi navedenih kot potencialno antimikrobno sredstvo ali sredstvo za spreminjanje odpornosti (angl. resistance-modifying agent; RMA) (Gibbons, 2004). Takšne spojine bi predstavljale dragoceno vmesno rešitev, dokler ne bodo razviti novi antibiotiki (Abreu in sod., 2012).

Hmelj (*Humulus lupulus* L.) predstavlja industrijsko rastlino, katere ženska socvetja (storžki) se množično uporabljajo v pivovarstvu. Storžki vsebujejo različne spojine, kot so hmeljne smole (sestavljene iz različnih grenčičnih spojin), eterična olja ter flavonoide, le-te pa igrajo pomembno vlogo v postopku varjenja piva. Hmelj se v pivovarstvu uporablja zavoljo grenčice, okusa in arome, po drugi strani pa premore še veliko drugih lastnosti (kot je na primer ohranjanje mikrobiološke stabilnosti) (Karabín in sod., 2016). Zaradi antimikrobnih učinkov hmelja, so bila močnejše hmeljena piva stila India Pale Ale v preteklosti sposobna »preživeti« ladijsko pot do angleških kolonij (Bartmańska in sod., 2018; Simpson in Smith, 1992). Te lastnosti so do nedavnega pripisovali predvsem grenčičnim kislinam. Še pred rabo hmelja v pivovarstvu, pa se je hmelj že tradicionalno uporabljal v medicinske namene predvsem za zdravljenje motenj spanja (kar s pridom koristimo še danes), za aktiviranje želodčnih funkcij in kot antibakterijsko ter antiglivično sredstvo (Bartmańska in sod., 2018; Zanolini in Zavatti, 2008). Navedene raziskave tudi dokazujejo, da predstavlja rastlina hmelja odličen vir naravnih spojin z antimikrobnimi učinki. Glede na pestro kemijsko sestavo hmelja in hmeljnih ekstraktov ter opažene antibakterijske aktivnosti bi ga bilo zelo smiselno izkoristiti tudi v farmacevtske, prehranske ter kozmetične namene kot tudi pri krmi živali. Hmelj namreč vsebuje grenčične kisline, katere vsebujejo tudi  $\alpha$ -kisline in  $\beta$ -kisline, med katerimi sta najpomembnejša predstavnika humulon in lupulon (Karabín in sod., 2016). Poleg tega predstavljajo pomembno skupino spojin v hmelju tudi flavonoidi (kot na primer flavan-3-oli, proantocianidini, flavonoli, flavanoni ter prenilflavonoidi, katerih glavni predstavnik je

ksantohumul) (Bocquet in sod., 2018). Vse omenjene spojine premorejo potencialno antibakterijsko aktivnost, kar pa gre seveda pričakovati tudi pri eteričnih oljih (Karabín in sod., 2016; Zanolini in Zavatti, 2008).

Do danes je bilo objavljenih že precej raziskav (Abram in sod., 2015; Alonso-Esteban in sod., 2019; Arsene in sod., 2015; Bartmańska in sod., 2018; Bocquet in sod., 2018; Haas in Barsoumian, 1994; Jirovets in sod., 2006; Klančnik in sod., 2010; Schurr in sod., 2015; Shen in Sofos, 2008; Weber in sod., 2019), v katerih so določali antimikrobno aktivnost več vrstam hmeljnih ekstraktov. V članku je sistematično predstavljeno katere metode najpogosteje uporabljamo za določanje antibakterijskih lastnosti rastlinskih ekstraktov, v nadaljevanju pa so sistematično podani še izsledki raziskav o antibakterijskih učinkih hmeljnih ekstraktov.

## **2 METODE ZA PROUČEVANJE ANTIBAKTERIJSKIH UČINKOV HMELJA**

V znanstveni literaturi so objavljene različne metode za določanje antimikrobnih lastnosti rastlinskih ekstraktov (Klančnik in sod., 2010; Wiegand in sod., 2008; Andrews, 2001, Valgas in sod., 2007, Hrnčič in sod., 2019). Pri raziskavah naravnih ekstraktov metodologija ni striktno določena, kot je to vpeljana pri določanju antimikrobne aktivnosti za antibiotike (Andrews, 2001). Metode se med seboj razlikujejo predvsem glede na vrsto ekstrakcije (topilo, čas ekstrakcije, ...), tip mikroorganizma, volumen inokuluma, potek rastne faze, uporabljeni medij in njegov pH, čas/temperaturo inkubacije ter glede na sam mikrobiološki test za ugotavljanje antimikrobnih lastnosti. Zato je rezultate posameznih študij težko neposredno primerjati med seboj in je potrebno dobro poznati različne metodološke pristope. Glavne skupine mikrobioloških metod za raziskovanje protimikrobnih učinkov naravnih ekstraktov predstavljajo difuzijske, dilucijske, bioavtografske ter nekatere novejšje uveljavljene metode (Hammud in sod., 2015).

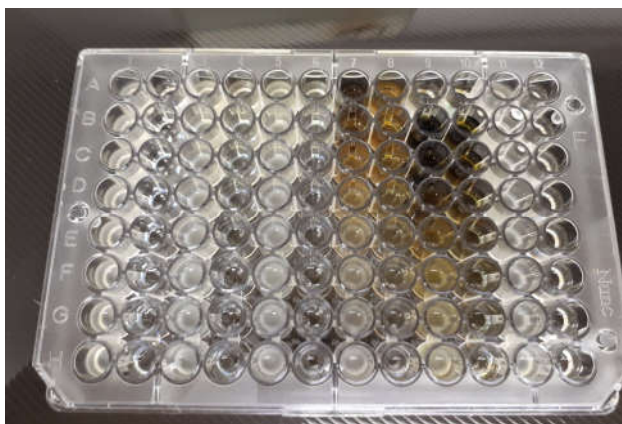
### **2.1 Metoda difuzije v agarju (z diski ali luknjicami)**

Metoda difuzije v agarju je široko uporabna, vendar največkrat služi kot presejalna metoda za določanje antimikrobne aktivnosti, na podlagi pridobljenih rezultatov pa se izvedejo še bolj specifične metode. Osnovni potek metode difuzije v agarju z diski ali luknjicami je, da pripravimo agar (primeren glede na bakterijo, ki jo preiskujemo), ga primerno inokuliramo in nanj položimo papirnat disk ali pa vanj izrežemo luknjico (Valgas in sod., 2007; Wiegand in sod., 2008). Če torej izvajamo metodo z diski, preiskovani ekstrakt naneseemo na disk, v drugem primeru pa ekstrakt naneseemo v luknjice. Ekstrakt (ki v našem primeru predstavlja potencialno antimikrobno sredstvo) nato z diska/luknjice difundira skozi agar. Po inkubaciji se pri tem tvorijo tako imenovane inhibicijske cone brez bakterijskih kolonij, ki večji

kot imajo premer, bolj učinkovit je bil uporabljen ekstrakt (Klančnik in sod., 2010; Valgas in sod., 2007; Mazzei in sod., 2020).

## 2.2 Dilucijska metoda v bujonu ali agarju

Dilucijska metoda v bujonu ali agarju predstavlja najpogosteje uporabljeno tehniko za določanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) naravnih ekstraktov kot tudi antibiotikov ter drugih substanc, ki bi lahko izkazovale baktericidno ali bakteristatično aktivnost. MIC poda najnižjo koncentracijo testirane substance (ekstrakta), ki inhibira vidno rast mikroorganizmov po inkubaciji (Andrews, 2001). Minimalna baktericidna koncentracija (MBC) pa je najnižja koncentracija substance (ekstrakta), ki prepreči rast mikroorganizma po precepljenju na sveže gojišče (Andrews, 2001). Kadar preiskovani ekstrakt redčimo v agarju, govorimo o dilucijski metodi v agarju. Kadar preiskovani ekstrakt redčimo v bujonu, pa govorimo o dilucijski metodi v bujonu. Pri slednji ločimo makrodilucijsko metodo, kadar uporabljamo volumne večje od 2 mL, in o mikrodilucijski metodi kadar raziskavo izvajamo na mikrotiterskih ploščah pri volumnih manjših od 500  $\mu$ L (Slika 1). Po inkubaciji pa motnost ali usedline označujejo rast mikroorganizmov, kar lahko izmerimo na osnovi določanja optične gostote, fluorescence ali luminiscence (Wiegand in sod., 2008; Andrews, 2001, Valgas in sod., 2007).



**Slika 1:** Primer mikrotiterske plošče po 24 urni inkubaciji, kjer so posamezni ekstrakti nanešeni v vsaki posamezni koloni, njihova koncentracija pa se zmanjšuje od zgoraj navzdol.

## 2.3 Bioavtografska metoda

Bioavtografska metoda temelji na principu, da v preiskovanem naravnem ekstraktu, posamezne spojine ločimo s tankoplastno kromatografijo (TLC) in jih z



avtobiografijo testiramo na željeni bakterijski kulturi. Posušen kromatogram prelijemo z gojiščem ter inokuliramo mikroorganizme, po inkubaciji na primerni temperaturi pa ovrednotimo nastale inhibicijske cone pri posameznih spojinah na kromatogramu (Nostro in sod. 2000, Hammud in sod., 2015).

## 2.4 Naprednejše metode

Učinke naravnih ekstraktov na bakterije je smiselno preučevati tudi s **krivuljo inhibirane rasti bakterij** oz. krivuljo odmiranja. Eno novejših metod pa je tudi preučevanje **post-antibiotskega učinka** (angl., post-antibiotic effect; PAE), kjer se določa čas zapoznele rasti bakterij po njihovi izpostavitvi preiskovani spojini (naravnemu ekstraktu) (Bocquet in sod., 2019). Poleg tega se pri bakterijah, s sposobnostjo tvorbe biofilmov, uporabljajo tudi tako imenovani **anti-biofilm testi**, pri katerih potrebujemo konfokalne laserske mikroskope (Liu in sod., 2015). Poleg samega raziskovanja antibakterijskih učinkov posameznih naravnih spojin, pa raziskovalci v zadnjem času dajejo velik pomen tudi raziskavam, kjer določajo njihov **sinergistični učinek** posameznih naravnih spojin z antibiotiki po metodi šahovnice (Bocquet in sod., 2019).

## 3 REZULTATI RAZISKAV ANTIBAKTERIJSKIH UČINKOV EKSTRAKTOV HMELJA

V Preglednici 1 so sistematično povzeti antibakterijski učinki glede na vrsto hmeljnega ekstrakta, tip mikrobiološke preiskave ter bakterij, ki so bile vključene v študijo.

*Preglednica 1: Pregled objavljenih študij, kjer so preučevali antibakterijske vplive hmeljnih ekstraktov*

Vrsta hmeljnega ekstrakta	Tip mikrobiološke raziskave	Uporabljene bakterije	Glavne ugotovitve	Vir
Etanolni ekstrakt hmelja (listi in storžki)	Določanje MIC vrednosti z mikrodilucijsko metodo v bujonu	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923 (klinični izolat), <i>Escherichia coli</i> O157:H7ŽM 370 (klinični izolat)	Antimikrobna aktivnost za bakterijo <i>S. aureus</i> je bila izredna, saj so bile MIC vrednosti <0,003 mg/mL, po drugi strani je bila MIC vrednost za bakterijo <i>E.coli</i> >0,16 mg/mL. Prav tako so ugotovili, da je antimikrobna aktivnost ekstraktov hmeljnih storžkov znatno višja od ekstraktov hmeljnih listov.	Abram in sod., 2015
Metanolni ekstrakt hmelja (semena)	Določanje MIC in MBC vrednosti z mikrodilucijsko metodo v bujonu	<i>Bacillus cereus</i> (food isolate), <i>S. aureus</i> (ATCC11,632), <i>Listeria monocytogenes</i>	Uporabljeni ekstrakti so izkazali izjemno antimikrobno aktivnost, saj so bili pri skoraj vseh uporabljenih bakterijah boljši od pozitivnih kontrol.	Alonso - Esteban in sod., 2019

		(NCTC 7973), <i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 19,433), <i>E. coli</i> (ATCC35, 218), <i>Salmonella</i> <i>typhimurium</i> (ATCC 13,311)		
Etanolni ekstrakt hmelja (storžki)	Določanje z metodo difuzije v agarju z diski	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>E. coli</i>	Rezultati so pokazali visoke inhibitorne učinke hmelja na bakterije. Največji učinek se je kazal pri <i>B. subtilis</i> in <i>S. aureus</i> . Pri <i>B. subtilis</i> je bila inhibitorna cona enaka kot pri pozitivni kontroli-antibiotik (vankomicin).	Arsene in sod., 2015
Ekstrakti ostankov hmelja (s toplili metilen klorid, etil acetat, aceton, metanol). Ekstrakti hmelja so bili z vsemi štirimi toplili pripravljene tudi z odstranitvijo ksantohumola. V analizo so bili vključeni tudi posamezni flavonoidi.	Določanje vrednosti MIC z mikrodilucijsko metodo v bujonu	<i>S. aureus</i> ATCC19095 (MSSA, enterotoksična), <i>S. aureus</i> ATCC29213 (MSSA), <i>S. aureus</i> ATCC43300 (MRSA), <i>L. monocytogenes</i> ATCC7644, <i>S. typhimurium</i> PCM2565, <i>Staphylococcus epidermidis</i> 91M (MRSE), <i>S. epidermidis</i> 4s (MSSE)	Vključeni ekstrakti so pokazali visoko antimikrobno učinkovitost, poleg tega so jo obdržali tudi po tem, ko so jim odstranili ksantohumul. Sedem izbranih flavonoidov hmelja je izkazalo pomembno antimikrobno aktivnost proti sevom <i>S. aureus</i> and <i>S. epidermidis</i> z najnižjo vrednostjo MIC80 0,5 µg/mL.	Bartma ņska in sod., 2018
Etanolni ekstrakt hmelja (storžki, listi, rizomi, stebila). Diklorometan je bil uporabljen za pripravo sub-ekstrakta storžkov. Izolirane so bile tudi posamezne komponente hmelja (humulon, kohumulon, adhumulon, lupulon, kolupulon, adlupulon).	→Metoda dilucije v agarju za določanje MIC vrednosti v ekstraktih in sub-ekstraktih →Mikrodilucijska metoda v bujonu za določanje antibakterijske aktivnosti posameznih komponent hmelja →Sinergistični učinek posameznih komponent hmelja z antibiotiki →krivulje rasti →post-	<i>S. aureus</i> (MSSA in MRSA), <i>Corynebacterium</i> (T25-17), <i>Enterococcus</i> (več sevov), <i>Mycobacterium smegmatis</i> 5003, <i>S. epidermidis</i> (več sevov), <i>Staphylococcus lugdunensis</i> T26A3, <i>Staphylococcus warneri</i> T12A12, <i>Streptococcus agalactiae</i> (več sevov), <i>Streptococcus dysgalactiae</i> T46C14, <i>Acinetobacter baumannii</i> (več sevov), <i>Citrobacter freundii</i>	Antibakterijska aktivnost etanolnih ekstraktov (stožkov) pri G+ bakterijah ( <i>Corynebacterium</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Staphylococcus</i> in <i>Streptococcus</i> ) je varirala od 39 do 156 µg/mL. Listi, stebila ter rizomi hmelja so kazali zelo šibko antibakterijsko aktivnost. Subekstrakt hmelja je bil preizkušen pri G+ bakterijah, kjer so bili enterokoki manj občutljivi kot stafilokoki in septokoki. Sevi bakterije <i>S. aureus</i> so bili najbolj občutljivi (MIC 9,8 do 19,5 µg/mL). Lupulon se je izkazal z največjim antibakterijskim učinkom med preiskovanimi komponentami hmelja z MIC od 0,6 do 1,2 µg/mL za MRSA seve. Če izključimo lupulon, pa sta flavonoida ksantohumul in	Bocquet in sod., 2018

	antibiotski učinek posameznih komponent hmelja → anti-biofilm test	(več sevov), <i>Enterobacter cloacae</i> (več sevov), <i>E. coli</i> (več sevov), <i>Klebsiella pneumoniae</i> (več sevov), <i>Proteus mirabilis</i> 11060, <i>Providencia stuartii</i> 11038, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (več sevov), <i>Salmonella</i> sp. 11033, <i>Serratia marcescens</i> (več sevov), <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	desmetilksantohumul izkazala večjo protibakterijsko aktivnost kot grenčine kisline (MIC od 9,8 – 19,5 µg/mL (ksantohumul) in 19,5 – 39 µg/mL (desmetilksantohumul) za MRSA seve). Če so ksantohumul kombinirali z desmetilksantohumulom ali lupulonom, se je izkazal sinergistični učinek, medtem ko se je kombinacija desmetilksantohumola in lupulona izkazala za antagonistično. Poleg tega je večina komponent hmelja pokazala bodisi sinergističen bodisi aditiven učinek z antibiotiki, redko pa antagonističen. Posamezne komponente hmelja so povzročile tudi oteženo rast bakterij po izpostavitvi antibiotikom. Nenazadnje pa so preiskovane posamezne komponente pokazale tudi inhibitorni ter bakterioidni učinek na nastanek biofilmov.	
Ekstrakt izohumulona (30 % vodna raztopina) ter ekstrakt β-kislin (48 %) z dodanimi 9 % α-kislin, olji in voski.	Štetje kolonij na trdnem gojišču ob dodatku ekstrakta	<i>S. aureus</i> ATCC 19095, <i>Streptococcus salivarius</i> , <i>Bacillus megaterium</i> , <i>E. coli</i> B, <i>B. subtilis</i>	Dodatek 0,01 % do 0,03 % ekstrakta izohumulona je inhibiral rast <i>S. salivarius</i> , <i>S. aureus</i> in <i>B. megaterium</i> . Med tem ko je ekstrakt beta kislin inhibiral te mikroorganizme v koncentracijah od 0,003 % do 0,1 %.	Haas in Barsoumian, 1994
Eterično olje hmelja	Metoda difuzije v agarju ter metoda dilucije v agarju	<i>S. aureus</i> ATCC 25093, <i>E. faecalis</i> (klinični izolat), <i>E. coli</i> ATCC 25922, <i>P. aeruginosa</i> ATCC 25517, <i>Klebsiella pneumoniae</i> (klinični izolat), <i>Proteus vulgaris</i> (klinični izolat), <i>Salmonella</i> sp. (klinični izolat)	Eterično olje izkazuje visoko antibakterijsko aktivnost za bakterije <i>S. aureus</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. coli</i> in <i>Salmonella</i> sp. Ko so preiskovali tudi posamezne komponente eteričnega olja, so ugotovili, da ima zavoljo sinergističnega učinka najvišjo antimikrobno aktivnost ravno kombinacija vseh komponent eteričnega olja v primerjavi s posameznimi komponentami.	Jirovet z in sod., 2006
Etanolni ekstrakt hmelja	Metoda difuzije v agarju z diski ter mikrodilucijska metoda v agarju	<i>B. cereus</i> WSBC 10530, <i>S.s aureus</i> ATCC 25923, <i>Salmonella infantis</i> ŽM9, <i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 33560, <i>Campylobacter coli</i> ATCC 33559	Hmeljni ekstrakti so pri preiskovanih bakterijah kazali dobre rezultate in visoko antimikrobno aktivnost. Najnižja MIC vrednost se je videla pri bakteriji <i>S. aureus</i> (0,002 mg/mL).	Klančnik in sod., 2010
Izolirane	Določanje MIC	<i>Lactobacillus brevis</i>	Vsi preiskovani hmeljni derivati so	Schurr

spojine izo-/ko-/n-/ad- humulon in analogi	vrednosti z metodo mikrodilucije v bujonu ter uporabo barvila resazurin	(različni sevi)	izkazovali aktivnost. Pokazalo pa se je, da humulinska kislina pri preiskovani bakteriji nudi nižje MIC vrednosti v primerjavi z izo- $\alpha$ -kisljinami.	antibakterijsko in sod., 2015
30 % beta kisline v topilu (propilen glikol)	Gojenje bakterij v tekočem gojišču ob dodatku ekstrakta ter nato štetje kolonij na trdnem gojišču	Mešanica 10 sevov bakterije <i>L. monocytogenes</i>	Preiskovani ekstrakt beta kislin iz hmelja je izkazal visoko antilisterijsko aktivnost.	Shen in Sofos, 2008
CO <sub>2</sub> ekstrakt hmelja	Določanje MIC vrednosti z metodo mikrodilucije v bujonu	<i>Propionibacterium acnes</i> ATCC 6919, <i>S. aureus</i> ATCC 29213, <i>S. aureus</i> ATCC 25923, <i>S. aureus</i> 2407, <i>S. aureus</i> 4810 (MRSA)	CO <sub>2</sub> ekstrakt je pokazal visoko antibakterijsko aktivnost pri izbranih bakterijah. MIC vrednost za <i>P. acnes</i> je bila 3,1 $\mu$ g/mL, ter za <i>S. aureus</i> 9,4 $\mu$ g/mL.	Weber in sod., 2019

Različni hmeljni ekstrakti so že bili preiskovani, najde pa se zelo malo objav o antimikrobni aktivnosti njegovega eteričnega olja (Jirovetz in sod., 2006; Knez Hrnčič in sod. 2019). Znana je na primer aktivnost eteričnega olja hmelja proti tvorjenju bakterijskih biofilmov (Alibi in sod., 2020). So pa zato bolj raziskane posamezne komponente hmeljnega eteričnega olja in njihova antimikrobna dejavnost (Karabín in sod., 2016; Jirovetz in sod., 2006). V Preglednici 1 je podan pregled objav, kjer so proučevali aktivnost različnih hmeljnih ekstraktov na bakterije. Poleg teh raziskav pa je veliko člankov vključevalo tudi druge mikroorganizme kot so virusi, plesni in kvasovke (Bartmańska in sod., 2018; Bocquet in sod., 2019; Natarajan in sod. 2008; Nionelli in sod., 2018; Srinivasan in sod., 2004; Wasilewski in sod., 2016). Hmelj ima na kvasovke zelo majhen inhibični učinek, kar se smiselno izrablja tudi pri proizvodnji piva. Za antimikrobni učinek na kvasovke bi zato potrebovali ogromne količine hmelja (Karabín in sod., 2016). Po drugi strani pa je veliko objav poleg antimikrobne aktivnosti proučevalo tudi antioksidativni potencial ekstraktov hmelja (Abram in sod., 2015; Alonso-Esteban in sod., 2019; Arsene in sod., 2015; Weber in sod., 2019). Ugotovili so, da hmeljni listi izkazujejo veliko manjšo antioksidativno aktivnost v primerjavi s hmeljnimi storžki (Abram in sod., 2015). Z metodo inhibicije tiobarbiturne kisline so visoko antioksidativno aktivnost pokazala tudi hmeljna semena (Alonso-Esteban in sod., 2019). Zaradi visoke antioksidativne učinkovitosti hmeljnih ekstraktov bi jih lahko na podlagi opisanih raziskav vključili kot funkcionalno sestavino v prehranske in/ali farmacevtske produkte za podaljšanje njihove življenjske dobe (Alonso-Esteban in sod., 2019; Weber in sod., 2019).

V znanstveni literaturi so že opisani molekularni mehanizmi kako v bakterijskih celicah učinkujejo posamezne hmeljne komponente (Karabín in sod., 2016).  $\alpha$ -kislina,  $\beta$ -kislina ter izo- $\alpha$ -kislina se vključujejo v celično membrano in tam delujejo kot mobilni ionofor, ki katalizira procese vključno z elektronevtralizacijo nedisociranih molekul, ki vstopajo v celico. Nadalje katalizirajo tudi izmenjavo protonov z divalentnimi kationi kot je  $Mn^{2+}$ , ter skrbijo za izstop nastalih kompleksov iz celice. Ti opisani procesi pa vodijo v akumulacijo protonov znotraj celice in v zniževanje transmembranskega protonskega gradienta, kar privede do manjšega privzema hranil, pomanjkanja hranil in posledično celične smrti (Sakamoto in Konings, 2003; Karabin in sod., 2016). Sakamoto in Konings (2003) sta ugotovila, da je antimikrobna aktivnost  $\alpha$ -kislina in  $\beta$ -kislina mnogo večja v primerjavi z izo- $\alpha$ -kislina. Zelo podoben mehanizem antimikrobnega delovanja pa se je izkazal tudi za hmeljne flavonoide (predvsem ksantohumul) (Karabín in sod., 2016).

#### 4 IZKORIŠČANJE ANTIBAKTERIJSKIH UČINKOV HMELJA

Hmelj, hmeljni ekstrakti in posamezne hmeljne komponente izkazujejo antimikrobno aktivnost na več področjih, vendar njihova učinkovitost ni enaka tej, ki jo imajo antibiotiki (Karabín in sod., 2016). Vseeno pa so raziskovalci (Natarajan in sod., 2008) ugotovili, da posedujeta lupulon in ksantohumul velik sinergistični učinek z antibiotiki (polimiksin B sulfat, tobramicin ter ciprofloksacin). MIC vrednosti, ki so jih določali, ko so antibiotike uporabili skupaj z lupulinom ter ksantohumulom, so bile znatno nižje v primerjavi s čistimi antibiotiki. Takšne rezultate so opazili tako pri gram pozitivnih (G+) bakterijah kot pri gram negativnih (G-) bakterijah. Kar nakazuje na smiselnost uporabe hmelja v medicini, farmaciji ter veterini (Karabín in sod., 2016). Nadalje so spoznali, da hranjenje piščancev (brojlerjev) s hmeljem znatno izboljša njihovo rast in prirast zavoljo njegovih antimikrobnih lastnosti. Posledično je bila izkazana veliko manjša potreba po antibiotikih, ki izboljšujejo rast živali (Cornelison in sod., 2006). Na področju živilske industrije je znana uporaba  $\beta$ -kislina iz hmelja v industriji sladkorja, saj so le-te izjemno učinkovite pri zaviranju tvorbe  $NO_2$  in razvoja anaerobnih bakterij, ki kvarijo izdelke (Pollach in sod., 2002). Nadalje so ugotovili, da so  $\beta$ -kislina zelo uporabne pri preprečevanju razvoja bakterij v gostih sokovih. Le-te sicer niso pokazale baktericidnega učinka, vendar so uspešno preprečile razvoj novih bakterij v sokovih (Justé in sod., 2007). Takšna uporaba  $\beta$ -kislina je zelo smiselna, saj v primerjavi z  $\alpha$ -kislina posedujejo manj grenčičnega okusa, ki je v živilski industriji zelo nezaželen. Prav tako pa grenkega okusa sploh nima humulinska kislina (komponenta hmeljnih ekstraktov), kar bi zelo pozitivno vplivalo na njeno uporabo v namene konzerviranja hrane. Po drugi strani pa je prav za humulinsko kislino (ki je pridobljena iz izo- $\alpha$ -kislina) določena najnižja MIC vrednost  $1,4 \mu M$  za bakterijo *L. brevis* izmed vseh do zdaj preiskovanih hmeljnih komponent (Karabín in sod., 2016). V prehranske namene so že uspešno uporabili

hmeljne ekstrakte, ki so izkazali antilisterijski učinek (*L. monocytogenes*) v mleku in nekaterih mlečnih izdelkih (skuta, sir) (Larson in sod., 1996). Tudi ti hmeljni ekstrakti so vsebovali visoko količino  $\beta$ -kislin. Nedavne raziskave pa kažejo, da so imeli hmeljni ekstrakti znatno aktivnost proti bakterijam, ki povzročajo akne. Hmeljni CO<sub>2</sub> ekstrakti (z visokim deležem humulona in lupulona) so pri nizkih MIC vrednostih (3,1 in 9,4  $\mu\text{g/mL}$ ) namreč inhibitorno delovali na bakteriji *P. acnes* ter *S. aureus* (eni izmed glavnih povzročiteljev aken) (Weber in sod., 2019). Dobljeni rezultati kažejo na smiselno uporabo hmeljnih ekstraktov v kozmetični industriji. Nenazadnje pa so v nedavni raziskavi ugotovili tudi inhibitorni učinek hmeljnih CO<sub>2</sub> ekstraktov na bakterije, ki se pojavljajo v toaletnih prostorih. Ko so hmeljni ekstrakt v koncentraciji 0,1 % dodali testni formuli čistila, so namreč ugotovili, da izkazuje izjemno učinkovitost proti bakteriji *S. aureus* (Wasilewski in sod., 2016). Poleg tega pa je dodatek izboljšal tudi tehnološke lastnosti čistila (viskoznost, raztapljanje v vodi ter moč lepljenja na površine) (Wasilewski in sod., 2016).

## 5 ZAKLJUČEK

V preglednem članku so predstavljene metode za določanje antimikrobnih lastnosti naravnih rastlinskih ekstraktov, poleg tega pa so sistematično povzete raziskave o antibakterijskih učinkih hmeljnih ekstraktov. Opisane so tudi študije, kjer so bile antimikrobne lastnosti hmelja uspešno uporabljene v praksi. Vsekakor pa hmelj zavoljo svoje antibakterijske aktivnosti poseduje še zelo velik neizkoriščen potencial za širšo rabo v živilski, farmacevtski, veterinarski in kozmetični industriji.

## 6 LITERATURA

- Abram V., Čeh B., Vidmar M., Hercezi M., Lazić N., Bucik V., Možina S., Košir I., Kač M., Demšar L., Poklar Ulrih N. A comparison of antioxidant and antimicrobial activity between hop leaves and hop cones. *Industrial Crops and Products*. 2015; 64: 124-134.
- Abreu A.C., McBain A.J., Simões M. Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents. *Natural Product Reports*. 2012; 29: 1007–1021.
- Alibi S., Selma W. B., Ramos-Vivas J., Smach M. A., Touati R., Boukadida J., Mansour H. B. Anti-oxidant, antibacterial, anti-biofilm, and anti-quorum sensing activities of four essential oils against multidrug-resistant bacterial clinical isolates. *Current Research in Translational Medicine*. 2020; 68(2): 59–66.
- Alonso-Esteban J., Pinela J., Barros L., Ćirić A., Soković M., Calhelha R., Torija-Isasa E., de Cortes Sánchez-Mata M., Ferreira I. Phenolic composition and antioxidant, antimicrobial and cytotoxic properties of hop (*Humulus lupulus* L.) Seeds. *Industrial Crops and Products*. 2019; 134: 154-159.
- Andrews J. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2001; 48: 5-16.

- Arsene A. L., Rodino S., Butu A., Petrache, Iordache O., Butu M. Study on antimicrobial and antioxidant activity and phenolic content of ethanolic extract of *Humulus lupulus*. *Farmacía*. 2015; 63(6): 851-857.
- Bartmańska A., Wafecka-Zacharska E., Tronina T., Popłoński J., Sordon S., Brzezowska E., Bania J., Huszcza E. Antimicrobial Properties of Spent Hops Extracts, Flavonoids Isolated Therefrom, and Their Derivatives. *Molecules*. 2018; 23(8): 2059.
- Bocquet L., Rivièrè C., Dermont C., Samaille J., Hilbert J., Halama P., Siah A., Sahpaz S. Antifungal activity of hop extracts and compounds against the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Industrial Crops and Products*. 2019; 122: 290-297.
- Cornelison J. M., Yan F., Watkins S. E., Rigby L., Segal J. B., Waldroup P. W. Evaluation of Hops (*Humulus lupulus*) as an Antimicrobial in Broiler Diets. *International Journal of poultry Science*. 2006; 5(2): 134-136.
- Gibbons S. Anti-staphylococcal plant natural products. *Natural Product Reports*. 2004; 21: 263-277.
- Haas G, Barsoumian R. Antimicrobial Activity of Hop Resins. *Journal of Food Protection*. 1994; 57(1): 59-61.
- Hammud K. K., RyadhRaheemNeema, Ali S., Hamza I. S. Direct Solid Disc as a Novel antibacterial testing method. *International journal of advances in Pharmacy, biology and chemistry*. 2015, 4(4): 844-851.
- Knez Hrnčič M., Španinger E., Košir I., Knez Ž., Bren U. Hop Compounds: Extraction Techniques, Chemical Analyses, Antioxidative, Antimicrobial, and Anticarcinogenic Effects. *Nutrients*. 2019, 11(2): 257.
- Jirovetz L., Bail S., Buchbauer G., Denkova Z., Slavchev A., Stoyanova A., Schmidt E., Geissler M. Antimicrobial testings, gas chromatographic analysis and olfactory evaluation of an essential oil of hop cones (*Humulus lupulus* L.) from Bavaria and some of its main compounds. *Scientia Pharmaceutica*. 2006; 74(4): 189-201.
- Justé A., Krause M., Lievens B., Klingeberg M., Michiels C., Willems, K. Protective effect of hop  $\beta$ -acids on microbial degradation of thick juice during storage. *Journal of Applied Microbiology*. 2007; 104: 51-59
- Karabín M., Hudcová T., Jelínek L., Dostálek, P. Biologically Active Compounds from Hops and Prospects for Their Use. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2016; 15(3): 542-567.
- Kavanagh K. T., Abusalaim S., Calderon L. E. The incidence of MRSA infections in the United States: Is a more comprehensive tracking system needed? *Antimicrobial Resistance & Infection Control*. 2017; 6: 34.
- Klančnik A., Piskernik S., Jeršek B., Možina S. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of Microbiological Methods*. 2010; 81(2): 121-126.
- Larson A. E., Yu R. R., Lee O. A., Price S., Haas G. J., Johnson E. A. Antimicrobial activity of hop extracts against *Listeria monocytogenes* in media and in food. *International Journal of Food Microbiology*. 1996; 33(2-3): 195-207.
- Liu H., Zhao Y., Zhao D., Gong T., Wu Y., Han H., Qu D. (2015). Antibacterial and anti-biofilm activities of thiazolidione derivatives against clinical staphylococcus strains. *Emerging Microbes & Infections*. 2015; 4(1): 1-6.
- Mazzei R., Leonti M., Spadafora S., Patitucci A., Tagarelli G. A review of the antimicrobial potential of herbal drugs used in popular Italian medicine (1850s-1950s) to treat bacterial skin diseases. *Journal of Ethnopharmacology*. 2020; 250: 112443.

- Natarajan P., Katta S., Andrei I., Ambati V. B. R., Leonida M., Haas, G. Positive antibacterial co-action between hop (*Humulus lupulus*) constituents and selected antibiotics. *Phytomedicine*. 2008; 15(3): 194–201.
- Nionelli L., Pontonio E., Gobetti M., Rizzello C. G. Use of hop extract as antifungal ingredient for bread making and selection of autochthonous resistant starters for sourdough fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 2018; 266: 173–182.
- Nostro A., Germano M., Dangelo V., Marino A., Cannatelli, M. Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Letters in Applied Microbiology*, 2000; 30(5): 379–384.
- Pollach G., Hein W., Beddie D. Application of hop  $\beta$ -acids and rosin acids in the sugar industry. *Zuckerindustrie* 127. 2002; 12: 921-390.
- Sakamoto K., Konings W. N. Beer spoilage bacteria and hop resistance. *International Journal of Food Microbiology*. 2003; 89(2-3): 105–124.
- Shen C, Sofos J. Antilisterial Activity of Hops Beta Acids in Broth with or Without Other Antimicrobials. *Journal of Food Science*. 2008; 73(9): M438-M442.
- Schurr B, Hahne H, Kuster B, Behr J, Vogel R. Molecular mechanisms behind the antimicrobial activity of hop iso- $\alpha$ -acids in *Lactobacillus brevis*. *Food Microbiology*. 2015; 46: 553-563.
- Simpson W.J., Smith A.R. Factors affecting antibacterial activity of hop compounds and their derivatives. *Journal of Applied Bacteriology*. 1992; 72: 327–334.
- Srinivasan V., Goldberg D., Haas G. J. Contributions to the Antimicrobial Spectrum of Hop Constituents. *Economic Botany*. 2004; 5: S230-S238.
- Valgas C, Souza S, Smânia E, Smânia Jr. A. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2007; 38(2): 369-380.
- Wasilewski T., Czerwonka D., Piotrowska U. Effect of the Concentration of Hop Cone Extract on the Antibacterial, Physico-Chemical and Functional Properties of Adhesive Toilet Cleaners. *Tenside Surfactants Detergents*. 2016; 53(4): 368–374.
- Weber N, Biehler K, Schwabe K., Haarhaus B., Quirin K.-W., Frank U., Wölfle U. Hop Extract Acts as an Antioxidant with Antimicrobial Effects against *Propionibacterium Acnes* and *Staphylococcus Aureus*. *Molecules*. 2019; 24(2): 223.
- WHO, 2020, Global plan action on antimicrobial resistance. (22.5.2020)  
<https://www.who.int/publications-detail/global-action-plan-on-antimicrobial-resistance>
- Wiegand I, Hilpert K, Hancock R. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Natural Protocols*. 2008, 3(2): 163-175.
- Zanolini P., Zavatti M. Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. *Journal of Ethnopharmacology*. 2008, 116: 383–396.



## USODA FENOLNIH SPOJIN MED PROIZVODNJO PIVA

Petra TERPINC<sup>1</sup>

Pregledni znanstveni članek / review article

Prispelo / received: 20. 2. 2020

Sprejeto / accepted: 14. 4. 2020

### Izvleček

V pivu pretežni del fenolnih spojin izvira iz ječmenovega slada, medtem ko jih hmelj prispeva precej manj. Vsebnost fenolnih spojin v končnem produktu je odvisna od kakovosti in količine izhodnih surovin ter od samega proizvodnega procesa. Fenolne spojine odločilno vplivajo na fizikalno in senzorično stabilnost piva. Hkrati je njihov zadosten vnos, ob upoštevanju zmerne količine zaužitega alkohola, povezan s preprečevanjem številnih kroničnih bolezni. Raziskave preteklih let se osredotočajo predvsem na interakcije med fenolnimi spojinami in proteini, vendar je antioksidativni potencial fenolnih spojin premaknil zanimanje zanje v smer, kako jih na poti iz izhodnega materiala do piva ohraniti v čim večji meri. Praviloma njihova vsebnost med slajenjem in drozganjem izrazito naraste, vendar kasneje med fermentacijo in skladiščenjem tudi precej upade. Z izbiro kakovostnih surovin in zadostno kontrolo tehnoloških parametrov lahko optimiziramo pogoje za sprostitvev in ohranitev fenolnih antioksidantov. Potrebne so nadaljnje raziskave, ki bodo dale jasen vpogled v usodo fenolnih spojin med proizvodnjo piva.

**Ključne besede:** ječmen, slad, hmelj, sladica, varjenje, pivo, fenolne spojine

## FATE OF PHENOLIC COMPOUNDS DURING BEER PRODUCTION

### Abstract

The phenolic compounds in beer mostly originate from barley malt, whereas minority is derived from hops. The content of phenolic compounds in the final product depends on the quality and quantity of raw materials and production process. Phenolic compounds have a decisive influence on the physical and sensory stability of beer. At the same time, their sufficient intake, taking into account moderate alcohol consumption, is associated with the prevention of chronic diseases. Researches of recent years are focused mainly on protein - polyphenol interactions, but potential of phenolic compounds as antioxidants shifted interest toward preserving these compounds from the raw materials to the final beer. In general, their content is found to increase significantly during malting and

---

<sup>1</sup> Doc. dr., Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, Slovenija, e-naslov: [petra.terpinc@bf.uni-lj.si](mailto:petra.terpinc@bf.uni-lj.si)

mashing, but decrease markedly during the subsequent fermentation and storage. By selecting the appropriate raw materials and adequate control of technological parameters, the conditions for the release and retention of phenolic antioxidants can be optimized. However, further researches are needed to provide a clear insight into the fate of phenolic compounds during beer production.

**Key words:** barley, malt, hop, wort, brewing, beer, phenolic compounds

## 1 UVOD

Fenolne spojine so raznolika skupina sekundarnih metabolitov, ki rastline ščitijo pred patogenimi organizmi, insekti, živalmi in ultravijoličnim sevanjem, uravnavajo njihovo rast in razmnoževanje (Mark in sod., 2019). Posamezne fenolne spojine pomembno prispevajo k strukturi rastlinske celice, s čimer vplivajo na adherenco, raztegljivost, dostopnost in biorazgradljivost celične stene (Oliveira in sod., 2019). Fenolne spojine izvirajo iz fenil propanoidne poti, glavna prekurzorja sta aminokislina fenilalanin iz šikimatne poti in malonil-CoA iz acetatne poti. Osnovno ogrodje predstavlja aromatski obroč (eden ali več) s hidroksilnimi substituenti (Mark in sod., 2019). Glede na njihov ogljikov skelet, razlikujemo več osnovnih skupin. Med preprostimi monofenolnimi spojinami, ki se nahajajo v sladici, izpostavimo fenolne kisline, razlikujemo hidroksibenzojske (C6-C1) (galna, protokatehajska, *p*-hidroksibenzojska, vanilinska in siringinska kislina) in hidroksicimetne (C6-C3) kisline (kavna, *p*-kumarna, ferulna in sinapinska kislina) (Boulton, 2013). Nekatere med njimi so na račun aktivnosti ustreznih encimov in/ali toplotne obdelave podvržene razgradnji, pri čemer se tvorijo dekarboksilacijski produkti z nižjim pragom zaznave, ki lahko precej zaznamujejo končno aromo piva (med hlapnimi monofenoli izpostavimo 4-vinil gvajakol in 4-vinil fenol) (Vanbeneden in sod., 2007). Kot naslednjo skupino izpostavimo flavonoide (C6-C3-C6), med pomembnejšimi spojinami, ki jih najdemo v sladici omenimo nekatere flavonole (kvercetin in kamferol) in flavanole (katehin, epikatehin, galokatehin in epigalokatehin). Oksidacija in polimerizacija flavanolov omogočata nastanek dimerov, trimerov, tetramerov in pentamerov. V pivu je identificiranih več kot 50 tovrstnih spojin (pomembnejša predstavnika sta procianidin B<sub>3</sub> in prodelfinidin B<sub>3</sub>), ki jih poznamo pod skupnim izrazom tanoidi. Nadaljnja polimerizacija slednjih vodi v nastanek mnogo večjih molekul imenovanih tanini (Boulton, 2013).

Fenolne spojine lahko razdelimo na različne načine, za nas bo zanimiva delitev osnovana na njihovi razporeditvi znotraj celice. Med topne fenolne spojine prištevamo proste enostavne fenolne spojine in topne konjugate, tj. ostale fenolne spojine z nizko molsko maso, ki se v vakuoli nahajajo v obliki estrov ali glikozidov. Med netopno vezane fenolne spojine uvrščamo kondenzirane tanine, fenolne kisline in druge komponente z nizko molsko maso, ki so vezane na

arabinoksilane, pektin, celulozo, lignine in/ali proteine. Večina študij je osredotočena na topne fenolne spojine, medtem ko so potencialni zdravilni učinki netopno vezanih fenolov pogosto prezrti, ker so ti, za razliko od proste oblike, preko estrskih, etrskih in C-C vezi pritrjeni na komponente celične stene in jih zato ne uspemo ekstrahirati z vodnimi raztopinami organskih topil (Carvalho in sod., 2016; Santos-Zea in sod., 2018). Maillard in Berset (1995) poročata, da je njihov antioksidativen potencial dvakrat višji v primerjavi s potencialom prostih fenolnih spojin, zato vezane fenolne spojine uvrščata med pomembnejše antioksidante piva. Poleg poznane antioksidativne učinkovitosti, vezane fenolne spojine zavirajo rast rakavih celic, uravnavajo ključne encime v presnovi ogljikovih hidratov in vplivajo na vnetne procese (Santos-Zea in sod., 2018). Ker se vezane fenolne spojine slabo absorbirajo v tankem črevesu, potujejo v nespremenjeni obliki vse do debelega črevesja, kjer so hrana prisotnim mikroorganizmom. Med fermentacijo jih slednji pretvarjajo v razne presnovke, ki pozitivno učinkujejo na črevesno mikrobioto in zavirajo rast patogenih organizmov (Pérez-Jiménez in Torres, 2011).

Uživanje hrane za človeka predstavlja glavni vnos fenolnih spojin. Sadje, zelenjava, polnozrnata žita, kava, zeleni čaj in vino so znani po visoki vsebnosti fenolnih spojin. Pivo predstavlja drugo najpomembnejšo alkoholno fermentirano pijačo na svetu, takoj za vinom (Wannenmacher in sod., 2018). Nedavna študija je pokazala, da lahko zmerno uživanje piva pri zdravih osebah znatno zmanjša tveganje za nastanek srčno-žilnih in nevrodegenerativnih bolezni, predvsem kot posledica specifičnih polifenolov iz slada in hmelja (de Gaetano in sod., 2016). Že pred leti je namreč analiza komercialnih piv pokazala, da lahko pivo pomembno prispeva k vnosu skupnih prehranskih antioksidantov, zlasti fenolnih kislin (Piazzon in sod., 2010). V pivu se večji del fenolnih spojin nahaja v obliki estrov in glikozidov ter vezanih kompleksov (Boulton, 2013).

## 2 FENOLNE SPOJINE V IZHODNIH SUROVINAH

Vsebnost fenolnih spojin v pivu je določena z osnovnimi surovinami in s samo tehnologijo varjenja piva. Fenolne spojine v pivu v glavnem izvirajo iz žit in hmelja (Lentz, 2018). Čeprav vsebuje ječmen neprimerljivo manj fenolnih spojin (50 do 100 mg / 100 g suhe snovi) kot hmelj (do 4 % suhe snovi), še vedno prispeva 70 – 80 % vseh fenolnih spojin v pivu (Carvalho in sod., 2016; Wannenmacher in sod., 2018). Izjema so močnejše hmeljena piva, kjer je doprinos hmelja lahko vse do 50 % (Roberts in Wilson, 2006). Lahko pa fenolne spojine proizvajajo tudi določeni sevi kvasovk, v tem primeru so v pivu prisotne arome po klinčkih (Langos in Granvogel, 2016). Obstajajo tudi manj direktni viri: bodisi se fenolne spojine ekstrahirajo iz lesa med staranjem piva v lesenih sodih ali pa se sproščajo pri sežigu lesa med proizvodnjo dimljenega slada (Lentz, 2018). Omenimo tudi fenolne spojine, ki jih zaznamo kot izrazito neprijetne (po zdravilih, ostre in trpke zaznave); te so običajno posledica prisotnosti klorofenolov v vodi

(Taylor, 2006). V pregledu se bomo osredotočili predvsem na ječmenov slad, na kratko pa bomo preleteli tudi najpomembnejše fenolne spojine v hmelju.

## 2.1 Ječmenov slad

Ovojnica ječmenovega zrna je bogata z lignini (polifenolna makromolekula), hemicelulozo (pretežno sestoji iz arabinoksilanov) in celulozo (polimer glukoze). Pomemben sestavni del celične stene je tudi ferulna kislina, ki omogoča prečno zamreženost med lignini in arabinoksilani. Nastanek dimera ferulnih kislin dveh sosednjih arabinoksilanov zmanjša učinkovitost encimske razgradnje in s tem prebavljivost polisaharidov celične stene (Ikram in sod., 2017). Ostanki fenolnih spojin, ki so vezani na molekulo arabinoksilana, segajo od enostavnih spojin (kot sta ferulna in *p*-kumarna kislina) pa vse do kompleksnih polimerov (kot je dimer katehina, tj. procianidin B<sub>3</sub>). Procianidin B<sub>3</sub> ima oksidativne lastnosti in lahko reagira s proteini, kar vodi v pojav koloidne motnosti piva (Palmer, 2006). Kot poroča Boulton (2013) so zimske sorte ječmena bogatejše s fenolnimi spojinami kot spomladanske. Fogarasi in sod. (2015) slednje utemeljujejo z razlikami v anatomiji zrn. Zhao (2015) nadalje navaja, da na vsebnost fenolnih spojin vpliva tudi prisotnost pleve (razlike so se pokazale med golim in plevnatim ječmenom) ter velikost zrn (manjša zrna naj bi zaradi večjega razmerja med površino in volumnom imela večji delež zunanje ovojnice in posledično več hidroksicimetnih kislin). Cai in sod. (2015) so pokazali, da je vsebnost fenolnih kislin močno odvisna od genetske raznolikosti med posameznimi genotipi, česar pa Holtekjølen in sod. (2006) niso uspeli potrditi za proantocianidine. Vsebnost skupnih flavanolorov se je gibala med 325 in 527 µg/g sveže zatehte ječmenove moke; prevladovali so trimeri sestavljenih iz ponavljajočih enot galokatehina in/ali katehina (do 104 µg/g za posamezen trimer), sledili so dimeri (procianidin B<sub>3</sub>: 63 - 126 µg/g in prodelfinidin B<sub>3</sub>: 48 - 106 µg/g), najmanj pa je bilo v analiziranih vzorcih monomerov (katehin: 14 - 41 µg/g).

Na splošno je za prvo fazo priprave slada značilen upad fenolnih spojin, saj se te deloma izlužijo v vodi, v kateri se namaka ječmen. Če se fenolne spojine med namakanjem ječmena ne izlužijo iz ovojnice zrna v zadostni meri, se iz perikarpa in alevronske plasti ječmenovega zrna ekstrahirajo kasneje med drozganjem in takšno pivo ima lahko posledično trpek okus. Namakanje zrn v alkalni vodi zmanjša količino fenolov v sladu (Palmer, 2016). Med kaljenjem ječmena nato koncentracija vodotopnih fenolnih spojin izdatno naraste (Wannenmacher in sod., 2018). Toplotna obdelava, ki sledi, vodi v spremenjeno encimsko aktivnost, pomembno pa vpliva tudi na izboljšano topnost fenolnih spojin na eni strani in razpad termolabilnih spojin na drugi. K antioksidativnim lastnostim slada prispevajo tudi produkti Maillardove reakcije, ki nastanejo med sušenjem (Carvalho in sod., 2016). V literaturi objavljene vrednosti za hidroksicimetne kisline v sladu zelo odstopajo in segajo okvirno od 10 do 15 µg/g suhe snovi (SS)

za celokupne pa vse do 100 - 300  $\mu\text{g/g}$  SS za *p*-kumarno kislino oz. 400 - 600  $\mu\text{g/g}$  SS za ferulno kislino v primeru individualne obravnave spojin. Cai in sod. (2015) so v sladu določili skoraj dvakrat večjo količino ferulne kisline (4,07  $\mu\text{g/g}$ ) kot v izhodnem ječmenu (2,15  $\mu\text{g/g}$ ), medtem ko se je vsebnost *p*-kumarne kisline med pripravo slada povečala zgolj za tretjino (iz 1,10  $\mu\text{g/g}$  na 1,44  $\mu\text{g/g}$ ). Kljub enakim pogojem namakanja, kaljenja in sušenja pri vseh vzorcih, je proces slajenja različno vplival na vsebnost ferulne in *p*-kumarne kisline pri različnih genotipih. O dvo- do pet-kratnem prirastu ferulne kisline med zaslajevanjem ječmena poroča tudi Lentz (2018). Nedavna raziskava, kjer so spremljali vsebnost skupnih fenolnih spojin in antioksidativno aktivnost različnih vrst ječmena (Koren in sod., 2019), je med namakanjem in kaljenjem potrdila podoben trend v obnašanju ozimnih in jarih sort, različno pa so se med pripravo slada preizkušeni kultivarji odzvali na proces sušenja. Količina fenolnih spojin, ki izvira iz slada je lahko nadalje odvisna tudi od abiotskih dejavnikov. Mikkelsen in sod., (2015) navajajo, da povišana temperatura in nivo ozona v ozračju znatno vplivata na akumulacijo sekundarnih metabolitov, ki omogočajo prilagoditve ječmena na rast v neugodnih pogojih. K vsebnosti skupnih fenolnih spojin, ki izvirajo iz ječmena in so jih uspešno identificirali v pripadajočem sladu, pomembneje doprinesejo še: galna, protokatehujska, kavna, siringinska, vanilinska, sinapinska in klorogenska kislina, *p*-hidroksifenilocetna kislina, umbeliferon, skopoletin, eskulin, kvercetin, katehin, epikatehin, prodelfinidin in rutin (Carvalho in sod. 2016).

Na drugi strani Carvalho in sod., (2016) ugotavljajo, da proces slajenja znatno zmanjša vsebnost katehina, prodelfinidina B<sub>3</sub>, in procianidina B<sub>3</sub>, medtem ko se ferulna kislina precej bolj uspešno zoperstavlja negativnim vplivom in je tako tudi v ječmenovem sladu še vedno najbolj zastopana fenolna spojina. Raziskava na 10 kultivarjih ječmena (Dvořáková in sod., 2008) je dala pomembne izsledke, kaj se med zaslajevanjem dogaja z različnimi oblikami fenolnih spojin. Avtorji so poročali o znatnem upadu celokupne vezane frakcije ter istočasno o povečanju topnih estrov prav pri vseh kultivarjih, medtem ko je bil vpliv na celokupno prosto frakcijo pogojen z vrsto ječmena. Vpliv zaslajevanja na posamezno fenolno spojino je bil odvisen od kultivarja, oz. različen za različne spojine istega kultivarja. Do podobnih ugotovitev so prišli tudi v primeru ferulne kisline, kot količinsko najpomembnejše fenolne spojine. Kot zanimivost povejmo, da so pri vseh analiziranih vzorcih določili porast topnih estrov, kar so pripisali interakcijam ferulne kisline z molekulami arabinoze in krajšimi oligoarabinosilani; ti so bili v tej obliki lažje ekstraktibilni kot ferulna kislina vezana na dolge arabinosilane. K tej transformaciji naj bi pripomoglo tako kaljenje kot začetna faza sušenja (Carvalho in sod., 2016). Potrebno je torej upoštevati, da je uspešnost ekstrakcije hidroksicimetnih kislin iz slada in njihova kasnejša pretvorba v prosto obliko v veliki meri odvisna od pogojev za delovanje encimov, ki so sposobni razgraditi arabinosilane v ječmenu. Mednje uvrščamo  $\beta$ -endosilanaze,  $\alpha$ -arabinofuranozidaze ter  $\beta$ -ksilozidaze, ki krajšajo dolge verige arabinosilanov v

krajše oligosaharide oz. omogočajo cepitev stranskih verig (Sungurtas in sod., 2004). Ključen encim, odgovoren za transformacijo zaestrene ferulne oz. *p*-kumarne kisline v prosto obliko, pa je feruloil esteraza, imenovan tudi cinamoil esteraza. Na delovanje dotičnih encimov precej negativno vpliva uporaba strožjega temperaturnega režima med pripravo slada. Ker so aktivnost omenjenih encimov zaznali tako v nativnem ječmenu kot ječmenovem sladu (Ramos-de-la-Peña in Contreras-Esquivel, 2016), je potrebno kontrolirati tako proces slajenja kot tudi kasneje drozganja. Zaustavljeno delovanje encimov je posredno odgovorno za manjšo sprostitvev vezanih fenolov iz celičnih sten, torej njihovo dostopnost, ki kasneje težje preidejo v vodno fazo. Visoke temperature učinkujejo tudi neposredno - nemalokrat inducirajo razpad termolabilnih fenolnih spojin oz. vodijo v njihovo polimerizacijo (Carvalho in sod., 2016). Negativen vpliv sušenja na vsebnost posameznih fenolnih kislin in flavonoidov v kaljenih zrnih smo zabeležili tudi sami pri pripravi ajdovega slada, kjer so bili temperaturni pogoji relativno mili (Terpinc in sod., 2016).

## 2.2 Hmelj

Vse sorte hmelja vsebujejo kompleksno in do določene mere tudi raznoliko ter geografsko specifično mešanico fenolnih spojin. Fenolne spojine, ki izvirajo iz hmelja, pomembno vplivajo na fizikalno stabilnost piva in v določenih primerih tudi znatno definirajo okus piva, tako da prispevajo k trpkosti, grenčici in polnosti piva (Roberts in Wilson, 2006; Oladokun in sod., 2016). Fenolne spojine predstavljajo 3 – 6 % suhe mase hmeljnih storžkov. Razdelimo jih lahko v 4 večje skupine: flavonoli, flavan-3-oli, fenolne kisline in ostale fenolne spojine (fenilflavonoidi, stilbenoidi itd.) (Karabín in sod., 2016). Večina fenolnih spojin se nahaja v cvetnih listih in vretencu hmeljnega storžka. Z izjemo fenilflavonoidov, fenolnih spojin v lupulinskih žlezah ni veliko. Posledično pivovarji, ki uporabljajo aromatične vrste hmelja z majhno vsebnostjo  $\alpha$ -kislin vnesejo v vrelo sladico več fenolnih spojin kot pivovarji, ki se poslužujejo kultivarjev z visoko vsebnostjo  $\alpha$ -kislin. Izbira hmeljnih briketov z izrazitejšo grenčico bo tako zmanjšala doprinos fenolnih spojin iz hmelja, uporaba CO<sub>2</sub> ekstraktov pa ga bo praktično povsem eliminirala (Roberts in Wilson, 2006). Predstavimo nekaj najpomembnejših predstavnikov fenolnih spojin, ki jih vsebuje hmelj. Kvercetin, kamferol, miricetin so najbolj zastopani flavonoli, ki se pretežno nahajajo kot glikozidi; sladkorna komponenta najpogosteje sestoji iz D-glukoze in L-ramnoze. Flavan-3-oli kot so katehin, epikatehin in galokatehin so v hmelju relativno dobro zastopani fenolni monomeri, ki se lahko povezujejo v di-, tri- ali oligomere (do 20 enot, poznani so kot proantocianidini ali kondenzirani tanini). Med najbolj zastopanimi fenolnimi kislinami omenimo galno, protokatehujsko, *p*-hidroksibenzojsko, vanilinsko, *p*-kumarno, kavno, ferulno in sinapinsko kislino. Fenilflavonoidi so na račun močno izražene biološke aktivnosti in pozitivnega učinka na zdravje brez dvoma najbolj zanimiva skupina fenolnih spojin, še posebej ksantohumul, izoksantohumul,

desmetilksantohumul ter 6- in 8-prenil naringenin (Karabín in sod., 2016). Količina fenolnih spojin, ki izvira iz hmelja je odvisna od sorte, oblike (storžki, briketi, ekstrakt) in trenutka, ko hmelj dodamo v pivino. Nekateri se namreč poslužujejo tudi hladnega hmeljenja med fermentacijo in zorenjem piva. Ne glede na stopnjo hmeljenja, hmelj praviloma ne predstavlja glavnine fenolnih spojin v končnem izdelku (Aron in Shellhammer, 2010; Wannemacher in sod., 2018).

### 3 FENOLNE SPOJINE MED PROIZVODNJO PIVA

V običajnem pivu, kjer se kot škrobno surovino uporablja zgolj ječmenov slad, se nahaja okvirno 150 – 350 mg/L fenolnih spojin (Boulton, 2013). Med varjenjem piva so nastale spremembe v strukturi fenolnih spojin posledica ekstrakcije, delovanja encimov, kemijskih reakcij izzvanih s toploto, obarjanja v obliki vroče in hladne usedline ali adsorbcije na površini kvasnih celic ali stabilizatorjev (Wannemacher in sod., 2018). Obseg sprememb zavisi tako od izhodnih surovin kot od vsakega posameznega koraka, ki vodi do končnega proizvoda (Boulton, 2013).

V splošnem velja, da drozganje pozitivno zaznamuje količino fenolnih spojin, saj so razmere med to fazo ugodne za delovanje encimov, ki pripomorejo k sprostitvi vezanih fenolnih spojin (Zhao, 2015). Z namenom povečane sprostitve antioksidantov iz slada Koren in sod. (2019) predlagajo dolgotrajnejše zadrževanje drozge pri temperaturi 45 ali 52 °C. Dobro razgrajen slad med drozganjem daje več fenolnih spojin, kar lahko pojasnimo s tem, da je v sladcu sestava matriksa v katerega so vpete fenolne kisline manj kompleksna kot v izhodnem ječmenu (Carvalho in sod., 2016), manj pa je tudi proteinov, ki bi bili na voljo za vezavo fenolnih spojin (Boulton, 2013), ekstrakcija slednjih v drozgo je torej na ta način olajšana.

Med drozganjem se topne hidroksibenzojske kisline iz slada ekstrahirajo s pomočjo vode, medtem ko je za prenos neekstraktibilne frakcije nujno predhodno delovanje feruloil esteraze. Vendar se je izkazalo, da na nivo hlapnih fenolov v pivu (ki so posledica encimske dekarboksilacije ferulne kisline) ne vpliva zgolj aktivnost sladnih esteraz, temveč tudi količina estrsko vezane ferulne kisline, ki je na začetku prisotna v sladici (Vanbeneden in sod., 2007). Avtorji omenjene raziskave so pokazali, da se med drozganjem prenese v pripadajočo sladico le manjši del hidroksicimetnih kislin oz. da jih večinski delež ostane v trdnem preostanku zrn. Do podobnih zaključkov je prišel tudi Sz wajgier (2009), ki je spremljal koncentracijo ferulne, vanilinske, *p*-kumarne kisline in *p*-hidroksibenzojske kisline. Pri pripravi dveh različnih sladici so resda zabeležili relativno visok delež ferulne kisline, ki je v začetni fazi drozganja (52 °C) uspešno prešla v tekočo fazo, medtem ko je bil nivo ostalih treh kislin v sladici praktično zanemarljiv. Omenjene spojine so določali še v kasnejših fazah drozganja. Po zaključeni pavzi pri 63 in 72 °C, so

med sladicama zabeležili različni trend za posamezno fenolno kislino kot tudi znotraj enake sladice za različne fenolne kisline, koncentracija nekaterih je ob koncu drozganja celo znatno preseгла vrednost določeno v izhodnem sladu. Vanbeneden in sod. (2008b) poročajo, da lahko na količino fenolnih spojin, ki se izlužijo v drozgo pozitivno vplivamo z ustreznim temperaturnim režimom in povišanim pH drozge. Kot optimalno T predlagajo 40 °C in pH 5,8. V svoji raziskavi so ugotovili, da ima na aktivnost dotičnih encimov in posledično na vsebnost proste ferulne in *p*-kumarne kisline v sladici poleg temperature in pH drozge, velik vpliv tudi dodatek surogatov, velikost delcev zmlatega slada, gostota drozge in režim mešanja. Navajajo, da lahko z izboljšano encimsko hidrolizo ferulne kisline iz vezane oblike znatno povečamo aromatični potencial drozge. Poudarjajo, da lahko z zadostnim sproščanjem fenolnih aromatičnih prekurzorjev v sladico precej vplivamo na končni nivo hlapnih fenolnih spojin v pivu in izbor ustreznega seva kvasovk ni nujno najpomembnejši dejavnik pri tem procesu. Po drugi strani pa je toplotna dekarboksilacija ferulne kisline v 4-vinilgvajakol, ki je značilna predvsem za temnejše, karamelne in pražene slade, odgovorna, da v pripadajočih sladica določimo nižjo vsebnost prekurzorja, tj. ferulne kisline (Lentz, 2018). V skladu z manj učinkovito ekstrakcijo fenolnih spojin med drozganjem Ikram in sod. (2017) pišejo o filtrni pogači kot o neizkoriščenem viru bioaktivnih spojin, tudi fenolnih spojin, izpostavljajo antioksidativno, antikancerogeno, antiaterogeno in protivnetno funkcijo, ki jo imajo slednje v človeškem telesu in razpredajo o možnih aplikacijah tega stranskega produkta drugod v živilski industriji. V svojem delu predstavijo nove pristope, kako povečati izplen fenolnih spojin iz filtrne pogače, kar bi lahko izkoristili tudi pri proizvodnji piva.

Pascoe in sod. (2003) so spremljali vsebnost nekaterih pomembnejših fenolnih spojin v posameznih fazah varjenja piva, za katerega so uporabili 72 % svetlega slada, 11 % karamelnega slada in ekstrakt hmelja (pridobljen s superkritičnim CO<sub>2</sub>). Vzorec je potekalo ob zaključku posamezne faze: drozganje, precejanje, hmeljenje, kuhanje sladice, sedimentacija, fermentacija (18 °C, 6 dni), topla pavza (3 dni pri 13 °C in 1 dan pri 3 °C), zorenje (23 dni pri 0 °C), filtracija, karbonizacija, stekleničenje, pasterizacija in staranje (skladiščenje 6 in 10 tednov pri 19 °C). Prisotnost kavne in sinapinske kisline je bila pod mejo detekcije, medtem ko so katehin, ferulno, vanilinsko, klorogensko in *p*-kumarno kislino identificirali v vseh vzorcih. Ob zaključku drozganja se je med slednjimi najbolj povečal nivo klorogenske kisline (2000 %), najmanj pa katehina (625 %). Precejanje drozge je v primerjavi z drozganjem vodilo v znaten porast vsebnosti vseh naštetih spojin (katehin 54 %, ferulna 42 %, vanilinska 52 %, klorogenska 100 % in *p*-kumarna kislina 90 %), medtem ko dodatek hmelja ni doprinesel k nadaljnjim spremembam. Avtorji dotične raziskave (Pascoe in sod., 2003) so predpostavili, da pride med precejenjem pri temperaturi 75 - 80 °C do ekstrakcije fenolnih spojin iz filtrne pogače, ki jo tvori pleva in preostanek zrna. Svojevrstno



vlogo so pripisali tudi katehinom, ki naj bi med precejanjem razpadli v pripadajoče monomerne oblike in tako postali bolj topni. Da je zadostno izpiranje filtrne pogače z nalivnimi vodami ključno za ekstrakcijo bioaktivnih komponent, so v svoji raziskavi poudarili tudi Koren in sod. (2019). Pascoe in sod. (2003) so v nadaljevanju svoje študije pojasnili, da proces hmeljenja po pričakovanjih ni vplival na vsebnost fenolnih spojin v sladici, saj ekstrakt ni bil bogat s fenolnimi spojinami. Tudi Leitao in sod. (2011) navajajo, da je uporaba hmeljnega ekstrakta precej razširjena med pivovarji. Nizko vsebnost fenolnih spojin v tovrstnih pripravkih pripisujejo dejstvu, da so fenolne spojine polarne in se kot take slabo ekstrahirajo z nepolarnim CO<sub>2</sub>. Medtem pa dodatek hmelja v neekstraktni obliki lahko pozitivno zaznamuje vsebnost skupnih fenolnih spojin v sladici (Koren in sod., 2019), vendar Kühbeck in sod. (2006) opozarjajo, da se jih del tudi obori in izgubi z vročo usedlino. Pascoe in sod. (2003) v nadaljevanju svoje študije poročajo, da je kuhanje sladice vodilo v 86 % porast *p*-kumarne kisline, medtem ko ni vplivalo na vsebnost nobenega od ostalih obravnavanih spojin. Sedimentacija je povzročila upad katehina (36 %), nivo ostalih fenolnih spojin je ostal nespremenjen. Slednje so skušali razložiti z obarjanjem kompleksov, nastalih med fenolnimi spojinami in proteini ter obarjanjem polimerov fenolnih spojin. Tudi procesi, ki so sledili (razredčitev, fermentacija, topla pavza, zorenje pri nizkih temperaturah) niso značilno vplivali na vsebnost naštetih spojin, z izjemo ferulne kisline, za katero so po zaključeni topli pavzi zabeležili 35 % upad. Nasprotno pa je filtracija negativno zaznamovala vsebnost katehina (77 %), ferulne (53 %) in *p*-kumarne kisline (41 %). S filtracijo so odstranili kvasovke, posredno pa tudi vse spojine, ki so jih bile kvasne celice sposobne adsorbirati na površini celice ali vključiti v svoj metabolizem. Karbonizacija in stekleničenje sta zopet pripomogla k povišani vsebnosti katehina in ferulne kisline (oba 116 %), manj izrazito, a še vedno pozitivno pa tudi na nivo klorogenske (52 %) in *p*-kumarne kisline (60 %). Kot možni vzrok so navedli koloidno motnost, nastalo med zorenjem piva, ki pa naj bi se, z uvajanjem CO<sub>2</sub> pod visokim tlakom in temperaturo podobno sobni, ponovno razpršila, kar naj bi vodilo v vnovično sprostitvev fenolnih spojin (Pascoe in sod., 2003).

Vsebnost posameznih fenolnih spojin v različnih stopnjah varjenja piva je spremljal tudi Szwarzgier (2009). Izpostavimo najpomembnejše izsledke njegove raziskave, v kateri je primerjal vzorce dveh svetlih piv. Tako Goolman (11,5 ut. % ekstrakta v osnovni sladici 5,5 vol. % alkohola, grenčica 13–17 BU, barva 8 ± 2 EBC) kot Perla (12,2 ut. % ekstrakta v osnovni sladici 6,2 vol. % alkohola, grenčica 15–19 BU, barva 9 ± 2 EBC) sta bila pripravljena z metodo infuzije, le da je bilo razmerje med sladom in vodo v prvem primeru 150 g:155 g/L, v drugem pa 170 g:180 g/L. Vzorčenje je vključevalo drozgo segreto na 52 °C, 63 °C in 72 °C, sladico po precejanju, kuhano hmeljeno sladico, mlado pivo po glavni fermentaciji ter pivo po zorenju, stabilizaciji, pasterizaciji in embalaranju. Vsebnost skupne ekstraktibilne ferulne kisline je bila najvišja po precejanju (Goolman) oz. pred

precejanjem po zaključeni fazi drozganja pri 72 °C (Perla), čemur je sledil znaten padec po zaključeni glavni fermentaciji, vrednost pa se je do konca procesa (zorenje, filtracija, stabilizacija, pasterizacija in embaliranje) v obeh pivih, ki sta izhajala iz istega slada, še dodatno znižala. Tudi v tej raziskavi dodatek hmelja v vrelo sladico ni bistveno vplival na vsebnost ferulne kisline po hidrolizi, je pa v obeh primerih pozitivno zaznamoval vsebnost kavne in klorogenske kisline ter negativno vsebnost vanilinske in *p*-hidroksibenzojske kisline. Avtor raziskave o morebitnih vzrokih za omenjene spremembe ni razpredal. V podobni raziskavi dve leti kasneje (Szwajgier in Bancarzewska, 2011) so preučevali vpliv kuhanja sladice in sedimentacije na vsebnost fenolnih kislin. Potrdili so, da prosta ferulna kislina v sladici predstavlja zgolj manjšinski delež v primerjavi z vezano, ki je postala dostopna po alkalni hidrolizi. Tako kuhanje sladice (80 min, cca. 100 °C) kot ločevanje usedline od bistre sladice v sedimentacijski posodi ni spremenilo vsebnosti dveh najbolj zastopanih fenolnih spojin, ferulne in *p*-kumarne kisline (niti proste frakcije niti skupno ekstraktibilne frakcije). Z vidika nastanka hlapnih fenolov, ki lahko vodijo v pojav nezaželenih arom, so prednost dali prostim fenolnim kislinam, saj je dekarboksilacija vezanih (v glavnem zaestrenih) spojin manj verjetna. Zaključili so, da kuhanje sladice in sedimentacija praviloma nista vplivala niti na vsebnost proste kavne, protokatehujske, *p*-hidroksibenzojske, sinapinske in siringične kisline. Nasprotno so Vanbeneden in sod. (2008a) pri temperaturah sladice med 90 in 100 °C uspeli določiti linearno povezavo med tvorbo 4-vinilgvajakola in trajanjem toplotne obdelave. Nadalje so fenolne spojine med drozganjem pri višjih temperaturah poleg toplotne dekarboksilacije podvržene tudi oksidaciji, razgradnji, in obarjanju preko tvorbe polimerov ali kompleksov s proteini (Aron in Shellhammer, 2010; Zhao in Zhao, 2012), s čimer lahko prav tako razložimo njihov upad. Med pomembnejšimi encimi izpostavimo polifenol oksidazo, peroksidazo in morda katalazo. Boulton (2013) poroča, da lahko fenolne spojine zaradi interakcij s proteini izgubimo tudi v kasnejših fazah proizvodnje piva v obliki vroče ali hladne usedline in hladne trajne koloidne motnosti.

Različen trend posameznih fenolnih spojin med pretvorbo sladice v pivo je proučevala še ena skupina znanstvenikov (Leitao in sod., 2011). Spremljali so 26 spojin, od tega uspešno identificirali sledeče (po padajočem vrstnem redu v sladici): ferulno kislino, *p*-kumarno kislino, katehin, epikatehin, protokatehujsko kislino, sinapinsko kislino, vanilinsko kislino, kavno kislino, *p*-hidroksibenzojsko kislino, *m*-kumarno kislino. Vzorčenje je vključevalo sladico (režim drozganja: 0-20 min pri 37°C, 20-34 min pri 37-50°C, 34-55 min pri 50°C, 55-59 min pri 50-65 °C, 59-69 min pri 65 °C, 69-82 min pri 65-76°C in 82-92 min pri 76 °C), vrelo sladico brez dodatka hmelja (1h, 100°C), ki je po fermentaciji predstavljala fermentirano sladico ter vrelo hmeljeno sladico z dodanim hmeljnim CO<sub>2</sub> ekstraktom (1h, 100°C), ki je po fermentaciji dala pivo. Koncentracija najbolj zastopane fenolne kisline, tj. ferulne kisline, je bila relativno konstantna, skozi vse faze vzorčenja ni utrpela večjih izgub. Izkazalo se je, da je dodatek hmelja izjemno

vplival na vsebnost *p*-kumarne kisline, manj, a še vedno pozitivno pa na vsebnost protokatehajske kisline in epikatehina. Podobno kot v prejšnji raziskavi, je kuhanje sladice z dodatkom hmelja nekatere spojine zaznamovalo tudi negativno, izpostavimo samo tiste, kjer so bile relativne spremembe očitnejše: *p*-hidroksibenzojsko kislino in *m*-kumarno kislino. Fermentacija je vodila v precejšen prirast *p*-hidroksibenzojske, vanilinske in klorogenske kisline ter bistven padec *p*-kumarne in sinapinske kisline, ne glede na to ali so kvasovke inokulirali v sladico brez dodanega hmelja ali v hmeljeno sladico. Med nastajanjem piva se je spreminjala tudi vsebnost neidentificiranih antioksidativnih spojin, vendar so Leitao in sod. (2011) prirast v vsebnosti fenolnih spojin po fermentaciji bolj kot njihovemu absolutnemu povečanju pripisali boljši topnosti teh spojin v etanolu. Medtem pa Zhao (2015) v svojem pregledu literature poroča o številnih dokazih, da se med zasladiitvijo in drozganjem količina fenolnih spojin praviloma znatno poveča, nato pa med fermentacijo in skladiščenjem prav tako opazno upade. Na sam izplen fenolnih spojin med varjenjem piva lahko nenazadnje vplivamo tudi z opremo, ki jo v ta namen uporabimo. V raziskavi, kjer so pivo varili v laboratoriju in v pilotni pivovarni so se razlike pokazale zlasti v fazi precejanja in kuhanja hmeljene sladice (Koren in sod., 2019). Zato ne preseneča, da obstajajo velike razlike v vsebnosti tako skupnih kot posameznih fenolnih spojin že znotraj iste vrste piva, kaj šele med posameznimi stili piva (Piazzon in sod., 2010; Vanbeneden in sod., 2008a).

#### 4 VLOGA FENOLNIH SPOJIN V PIVU

Med kakovostnimi atributi piva, ki jih potrošnik najprej zazna, so bistra lesketajoča barva in stabilna bogata pena. Takoj za tem, vendar še pomembnejši parameter, je okus piva. Vloga, ki jo imajo fenolne spojine pri naštetih parametrih je dobro poznana (Aron in Shellhammer, 2010; Lentz, 2018; Mikyška in sod., 2002). Fenolne spojine dajejo pivu grenčico, polnost, trpkost (Humia in sod., 2019; Wannenmacher in sod., 2018), za pivovarje pa so še posebej zanimive kot osrednji endogeni antioksidanti, saj imajo ključno vlogo pri upočasnjevanju, omejevanju ali celo preprečevanju oksidacijskih procesov v pivu (Zhao, 2015). Obstajajo študije, ki trdijo, da imajo piva, ki vsebujejo več fenolnih spojin, daljšo življenjsko dobo, stabilnejši okus in aromo ter obstojnejšo peno (Humia in sod., 2019; Jurić in sod., 2015; Mikyška in sod., 2002). O pomenu fenolnih spojin s prehranskega vidika, njihovi sintezi, različnih pojavnih oblikah, ekstrakciji in analizi, metabolizmu in učinku na zdravje je na voljo domača (Terpinc, 2019a, 2019b) in tuja literatura (Gerhäuser in sod., 2002; Pérez-Jiménez in Torres, 2011; Santos-Zea in sod., 2018; Wannenmacher in sod., 2018). Namen aktualnega članka je bil predstaviti pivo, ki je poznano povsod po svetu, kot vir fenolnih spojin. Vrsta in koncentracija fenolnih spojin v pivu je pogojena s stilom piva in povezana s sestavo izhodnih surovin ter samim načinom proizvodnje piva. Humia in sod. (2019) navajajo, da so večji pivovarji nagnjeni k stroškovno učinkovitejši proizvodnji, kar nemalokrat pomeni

tudi cenejšo surovino in uporabo alternativnih virov, surogatov. Na drugi strani kraft pivovarji posegajo predvsem po ječmenu (v manjši meri tudi po pšenici), več poudarka pa namenjajo tudi hmelju, s čimer lahko morda deloma pojasnimo tako večjo raznolikost kot tudi večjo vsebnost posameznih fenolnih spojin. Spet drugi razloge iščejo v filtraciji, večina kraft piv je za razliko od komercialnih, nefiltriranih, zaradi česar ohranijo več ekstrahiranih polifenolov (Marques in sod., 2017). Zanimive izsledke je dala tudi raziskava desetih sadnih piv, kjer so sladici med fermentacijo dodali sadje. V večini sadnih piv je bila antioksidativna aktivnost, vsebnost fenolnih kislin in flavonoidov znatno večja kot pri običajnih pivih brez sadja. Višnjevo pivo je imelo najvišje vrednosti, sledilo je grozdno, slivovo in pomarančno pivo. V vseh pregledanih sadnih pivih so zaznali povečanje vsebnosti katehina in kvercetina, klorogenske, neoklorogenske, *p*-kumarne in kavne kisline glede na običajna piva. Nardini in Garaguso (2020) sta na podlagi dobljenih rezultatov zaključila, da je dodajanje sadja med fermentacijo znatno povečalo antioksidativno aktivnost piva in kakovostno ter količinsko izboljšalo njegov fenolni profil. Pred leti so se tudi Piazzon in sod. (2010) ukvarjali z analizo različnih zvrsti piv. Poročajo, da ferulna kislina nekajkrat preseže koncentracije vseh ostalih fenolnih kislin prav v vseh pivih, sledijo ji sinapinska, vanilinska, kavna, *p*-kumarna in 4-hidroksifenil očetna kislina. Avtorji omenjene raziskave ugotavljajo, da so ferulna, kavna, siringinska, sinapinska in, v manjši meri, vanilinska kislina prisotne v glavnem v vezani obliki, medtem ko so vanilinsko in 4-hidroksifenil očetno kislino določili v približno enakovrednih deležih v prosti in vezani obliki. Seštevek celokupnih posameznih fenolnih spojin je razkril, da so bila med analiziranimi pivi s fenolnimi kislinami najbolj osiromašena brezalkoholna piva, med pšeničnimi pivi, pilsnerji in lagerji, ki so sledili v nadaljevanju, ni bilo bistvenih razlik, piva ale, abbey in bock pa so spet vsebovala več fenolnih spojin. Za večjo verodostojnost rezultatov omenimo, da so za vsak tip piva analizirali 5 različnih znamk in da so bila piva proizvedena v različnih evropskih državah. Na koncu pa omenimo še nedavne ugotovitve Cheiran in sod. (2019). V študijo so vključili piva treh različnih stilov (india pale ale, lager, pšenično) iz treh različnih pivovarn in v skupno 81 analiziranih vzorcih določili 57 fenolnih spojin. Med njimi so v pivu sploh prvič določili nekatere benzojske kisline (2,4-dihidroksibenzojsko kislino, 2,3-dihidroksibenzojsko kislino, dimetoksibenzojsko kislino), konjugate fenolnih kislin (3-*p*-kumaroilkino kislino in 4-*p*-kumaroilkino kislino, 3-feruloilkino kislino, 4-feruloilkino kislino, 5-feruloilkino kislino) in flavonoide (taksifolin heksozid, kvercetin diheksozid, apigenin-6,8-dipentozid in izofraksidin heksozid). V isti raziskavi so predstavili tudi spojine, ki bi lahko omogočale razlikovanje med posameznimi stili. S fenolnimi spojinami, ki najbolj pripomorejo k oksidativni stabilnosti piva so se ukvarjali še v eni pomembni raziskavi (Spreng in Hofmann, 2018); tudi v okviru te so v pivu identificirali številne spojine, nekatere prav tako prvič. Zaključili so, da med vsemi spojinami v pivu izražajo največjo antioksidativno aktivnost relativno nepoznani hortadini A, B in C, saponarin ter kvercetin 3-*O*-malonil glukozid. Nenazadnje izpostavimo še izsledke

raziskave (Raquel in sod., 2013), ki poroča, da je antioksidativen potencial nekaterih piv ne samo primerljiv, temveč celo boljši od prenekaterih vin in gaziranih pijač. Vsekakor, toksične vloge alkohola ob tem ne smemo podcenjevati.

## 5 ZAKLJUČEK

Številne študije zadnjih let se osredotočajo na spremljanje fenolnih spojin od izhodnih surovin do piva, vendar številne neznanke dajejo temu področju še veliko prostora za nadaljnje raziskave. Varjenje kvalitetnega piva je izjemno zahteven proces. Vsebnost fenolnih spojin v končnem izdelku je odvisna tako od genetskih dejavnikov kot od samih pogojev rasti ječmena in hmelja. Pri pripravi slada kot tudi kasneje v vsaki posamezni stopnji varjenja piva lahko s številnimi parametri, ki jih določa recept ali tehnologija, optimiziramo pogoje, ki vodijo v sprostitvev fenolnih spojin iz vezanih oblik in na čim večjo koncentracijo celokupnih fenolnih antioksidantov v končnem proizvodu. Študije, vključene v tokratni pregled literature nedvomno kažejo na raznolik in izjemno kompleksen vpliv različnih dejavnikov na vsebnost fenolnih spojin med proizvodnjo piva. Slednje velja tako za različne stile piva kot tudi za isti stil različnih proizvajalcev. Cilj v prihodnosti naj bo tako poiskati kompromis med tehnološko in prehransko kakovostjo piva, saj slednja tudi na račun prisotnih fenolnih spojin vsekakor ni zanemarljiva.

## 6 VIRI

- Aron P. M., Shellhammer T. H. A Discussion of Polyphenols in Beer Physical and Flavour Stability. *Journal of the Institute of Brewing*. 2010; 116(4), 369-380.
- Boulton C. *Encyclopaedia of Brewing*. Wiley. 2013; 720 str.
- Cai S., Han Z., Huang Y., Chen Z.-H., Zhang G., Dai F. Genetic Diversity of Individual Phenolic Acids in Barley and Their Correlation with Barley Malt Quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2015; 63(31), 7051-7057.
- Carvalho D. O., Gonçalves L. M., Guido L. F. Overall Antioxidant Properties of Malt and How They Are Influenced by the Individual Constituents of Barley and the Malting Process. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2016; 15(5), 927-943.
- Cheiran K. P., Raimundo V. P., Manfroí V., Anzanello M. J., Kahmann A., Rodrigues E., Frazzon J. Simultaneous Identification of Low-Molecular Weight Phenolic and Nitrogen Compounds in Craft Beers by Hplc-Esi-MS/MS. *Food Chemistry*. 2019; 286, 113-122.
- de Gaetano G., Costanzo S., Di Castelnuovo A., Badimon L., Bejko D., Alkerwi A., Chiva-Blanch G., Estruch R., La Vecchia C., Panico S., Pounis G., Sofi F., Stranges S., Trevisan M., Ursini F., Cerletti C., Donati M. B., Iacoviello L. Effects of Moderate Beer Consumption on Health and Disease: A Consensus Document. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 2016; 26(6), 443-467.
- Dvořáková M., Guido L. F., Dostálek P., Skulilová Z., Moreira M. M., Barros A. A. Antioxidant Properties of Free, Soluble Ester and Insoluble-Bound Phenolic

- Compounds in Different Barley Varieties and Corresponding Malts. *Journal of the Institute of Brewing*. 2008; 114(1), 27-33.
- Fogarasi A.-L., Kun S., Tankó G., Stefanovits-Bányai É., Hegyesné-Vecseri B. A Comparative Assessment of Antioxidant Properties, Total Phenolic Content of Einkorn, Wheat, Barley and Their Malts. *Food Chemistry*. 2015; 167, 1-6.
- Gerhäuser C., Alt A. P., Klimo K., Knauff J., Frank N., Becker H. Isolation and Potential Cancer Chemopreventive Activities of Phenolic Compounds of Beer. *Phytochemistry Reviews*. 2002; 1(3), 369-377.
- Holtekjølen A. K., Kinitz C., Knutsen S. H. Flavanol and Bound Phenolic Acid Contents in Different Barley Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006; 54(6), 2253-2260.
- Humia B. V., Santos K. S., Barbosa A. M., Sawata M., Mendonça M. d. C., Padilha F. F. Beer Molecules and Its Sensory and Biological Properties: A Review. *Molecules*. 2019; 24(8), 1568.
- Ikram S., Huang L., Zhang H., Wang J., Yin M. Composition and Nutrient Value Proposition of Brewers Spent Grain. *Journal of Food Science*. 2017; 82(10), 2232-2242.
- Jurić A., Čorić N., Odak A., Herceg Z., Tišma M. Analysis of Total Polyphenols, Bitterness and Haze in Pale and Dark Lager Beers Produced under Different Mashing and Boiling Conditions. *Journal of the Institute of Brewing*. 2015; 121(4), 541-547.
- Karabín M., Hudcová T., Jelínek L., Dostálek P. Biologically Active Compounds from Hops and Prospects for Their Use. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2016; 15(3), 542-567.
- Koren D., Kun S., Hegyesné Vecseri B., Kun-Farkas G. Study of Antioxidant Activity During the Malting and Brewing Process. *Journal of Food Science and Technology*. 2019; 56(8), 3801-3809.
- Kühbeck F., Schütz M., Thiele F., Krottenthaler M., Back W. Influence of Lauter Turbidity and Hot Trub on Wort Composition, Fermentation, and Beer Quality. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 2006; 64(1), 16-28.
- Langos D., Granvogl M. Studies on the Simultaneous Formation of Aroma-Active and Toxicologically Relevant Vinyl Aromatics from Free Phenolic Acids During Wheat Beer Brewing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2016; 64(11), 2325-2332.
- Leitao C., Marchioni E., Bergaentzlé M., Zhao M., Didierjean L., Taidi B., Ennahar S. Effects of Processing Steps on the Phenolic Content and Antioxidant Activity of Beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011; 59(4), 1249-1255.
- Lentz M. The Impact of Simple Phenolic Compounds on Beer Aroma and Flavor. *Fermentation*. 2018; 4(1), 20.
- Maillard M.-N., Berset C. Evolution of Antioxidant Activity During Kilning: Role of Insoluble Bound Phenolic Acids of Barley and Malt. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1995; 43(7), 1789-1793.
- Mark R., Lyu X., Lee J. J. L., Parra-Saldívar R., Chen W. N. Sustainable Production of Natural Phenolics for Functional Food Applications. *Journal of Functional Foods*. 2019; 57, 233-254.
- Marques D. R., Cassis, Quelhas J. O. F., Bertozzi J. C., Visentainer J. V., Oliveira C. C., Monteiro A. R. G. Characterization of Craft Beers and Their Bioactive Compounds. *Chemical Engineering Transactions*. 2017; 57, 1747-1752.

- Mikkelsen B. L., Olsen C. E., Lyngkjær M. F. Accumulation of Secondary Metabolites in Healthy and Diseased Barley, Grown under Future Climate Levels of CO<sub>2</sub>, Ozone and Temperature. *Phytochemistry*. 2015; 118, 162-173.
- Mikyška A., Hrabák M., Hašková D., Šrogl J. The Role of Malt and Hop Polyphenols in Beer Quality, Flavour and Haze Stability. *Journal of the Institute of Brewing*. 2002; 108(1), 78-85.
- Nardini M., Garaguso I. Characterization of Bioactive Compounds and Antioxidant Activity of Fruit Beers. *Food Chemistry*. 2020; 305, 125437.
- Oladokun O., Tarrega A., James S., Smart K., Hort J., Cook D. The Impact of Hop Bitter Acid and Polyphenol Profiles on the Perceived Bitterness of Beer. *Food Chemistry*. 2016; 205, 212-220.
- Oliveira D. M., Mota T. R., Oliva B., Segato F., Marchiosi R., Ferrarese-Filho O., Faulds C. B., dos Santos W. D. Feruloyl Esterases: Biocatalysts to Overcome Biomass Recalcitrance and for the Production of Bioactive Compounds. *Bioresource Technology*. 2019; 278, 408-423.
- Palmer G. H. Barley and Malt. V: Handbook of Brewing, Second Edition. Priest F. G., Stewart G. G. (ur.). CRC Press. 2006; 139-160.
- Pascoe H. M., Ames J. M., Chandra S. Critical Stages of the Brewing Process for Changes in Antioxidant Activity and Levels of Phenolic Compounds in Ale. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 2003; 61(4), 203-209.
- Pérez-Jiménez J., Torres J. L. Analysis of Nonextractable Phenolic Compounds in Foods: The Current State of the Art. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011; 59(24), 12713-12724.
- Piazzon A., Forte M., Nardini M. Characterization of Phenolics Content and Antioxidant Activity of Different Beer Types. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010; 58(19), 10677-10683.
- Ramos-de-la-Peña A. M., Contreras-Esquivel J. C. Methods and Substrates for Feruloyl Esterase Activity Detection, a Review. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2016; 130, 74-87.
- Raquel B. Q., Paula A. R. T., Sales M. G. F. Assessing and Comparing the Total Antioxidant Capacity of Commercial Beverages: Application to Beers, Wines, Waters and Soft Drinks Using Trap, Teac and Frap Methods. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*. 2013; 16(1), 22-31.
- Roberts T. R., Wilson J. H. Hops. V: Handbook of Brewing, Second Edition. Priest F. G., Stewart G. G. (ur.). CRC Press. 2006; 177-280.
- Santos-Zea L., Vilella-Castrejón J., Gutiérrez-Urbe J.A. Bound Phenolics in Foods. V: Bioactive Molecules in Food. Reference Series in Phytochemistry. Mérillon J. M., Ramawat K. (ur.). Springer International Publishing. 2018; 974 – 988.
- Spreng S., Hofmann T. Activity-Guided Identification of in Vitro Antioxidants in Beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2018; 66(3), 720-731.
- Sungurtas J., Swanston J. S., Davies H. V., McDougall G. J. Xylan-Degrading Enzymes and Arabinoxylan Solubilisation in Barley Cultivars of Differing Malting Quality. *Journal of Cereal Science*. 2004; 39(2), 273-281.
- Szwajgier D. Content of Individual Phenolic Acids in Worts and Beers and Their Possible Contribution to the Antiradical Activity of Beer. *Journal of the Institute of Brewing*. 2009; 115(3), 243-252.

- Szwajgier D., Bancarzewska M. Changes in the Phenolic Acid Content During Wort Boiling and Whirlpool. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*. 2011; 10(1), 19-33.
- Taylor D. G. Water. V: Handbook of Brewing, Second Edition. Priest F. G., Stewart G. G. (ur.). CRC Press. 2006; 91-138.
- Terpinc P. Bound Phenolic Compounds of Whole Cereal Grains as a Functional Food Component: Part Two. *Acta Agriculturae Slovenica* 2019a; 114(2), 13.
- Terpinc P. Bound Phenolic Compounds of Whole Cereals Grain as a Functional Food Component: Part One. *Acta Agriculturae Slovenica* 2019b; 114(2), 10.
- Terpinc P., Cigić B., Polak T., Hribar J., Požrl T. LC-MS Analysis of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Buckwheat at Different Stages of Malting. *Food Chemistry*. 2016; 210, 9-17.
- Vanbeneden N., Gils F., Delvaux F., Delvaux F. R. Variability in the Release of Free and Bound Hydroxycinnamic Acids from Diverse Malted Barley (*Hordeum Vulgare* L.) Cultivars During Wort Production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007; 55(26), 11002-11010.
- Vanbeneden N., Gils F., Delvaux F., Delvaux F. R. Formation of 4-Vinyl and 4-Ethyl Derivatives from Hydroxycinnamic Acids: Occurrence of Volatile Phenolic Flavour Compounds in Beer and Distribution of Pad1-Activity among Brewing Yeasts. *Food Chemistry*. 2008a; 107(1), 221-230.
- Vanbeneden N., Van Roey T., Willems F., Delvaux F., Delvaux F. R. Release of Phenolic Flavour Precursors During Wort Production: Influence of Process Parameters and Grist Composition on Ferulic Acid Release During Brewing. *Food Chemistry*. 2008b; 111(1), 83-91.
- Wannenmacher J., Gastl M., Becker T. Phenolic Substances in Beer: Structural Diversity, Reactive Potential and Relevance for Brewing Process and Beer Quality. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2018; 17(4), 953-988.
- Zhao H. Effects of Processing Stages on the Profile of Phenolic Compounds in Beer. V: Processing and Impact on Active Components in Food. V. Preedy (ur.). Academic Press. 2015; 533-539.
- Zhao H., Zhao M. Effects of Mashing on Total Phenolic Contents and Antioxidant Activities of Malts and Worts. *International Journal of Food Science and Technology*. 2012; 47(2), 240-247



## EFFECT OF SUBSTITUTES FOR BARLEY MALT ON CHEMICAL-PHYSICAL AND SENSORIAL CHARACTERISTICS OF BEER

Iztok Jože KOŠIR<sup>1</sup> in Nataša KOČAR MLINARIČ<sup>2</sup>

Original scientific article / izvirni znanstveni članek

Received / prispelo: 25. 10. 2020

Accepted / sprejeto: 9. 12. 2020

### Abstract

Traditionally, beer is a beverage that is made only from barley malt, hops and water. Nevertheless, apart from this, substitutes for barley malt in the form of various unmalted cereals are used. The chemical composition of wort is altered when prepared from alternative raw materials which further results in imbalance between different fermentable compounds. The yeast strain *Saccharomyces pastorianus* TUM 34/70 is one of the natural hybrids which was domesticated by man for traditional brewing based on barley malt. By changing the raw material the balance between aromatic compounds achieved by brewers over centuries could be ruined.

The results of our work showed that increasing the content of unmalted barley significantly affects all nitrogen fractions in wort and beer. The saccharides content remains comparable, except in the variant where only unmalted barley was used as a surrogate and this led to an increase in glucose and maltotriose. The increase in the content of unmalted barley also results in an extended fermentation time from six to nine days. Differences in the composition of surrogates did not affect the sensory evaluation of fresh beer and of beer after aging of three months, while the best scored beers after six months were those where we used a combination of unmalted barley and maize grist.

**Key words:** beer, malt surrogates, chemical composition, sensorial properties

## VPLIV NADOMESTKOV JEČMENOVEGA SLADA NA KEMIJSKO-FIZIKALNE IN SENZORIČNE LASTNOSTI PIVA

### Izvleček

Tradicionalno je pivo pijača, ki je izdelana samo iz ječmenovega sladu, hmelja in vode. Kljub temu se poleg osnovnih surovin pri varjenju piva uporabljajo nadomestki za ječmenov slad, v obliki različnih neslajjenih žit. Izbor alternativne

---

<sup>1</sup> Dr., Slovenian Institute of Hop Research and Brewing, Cesta Žalskega tabora 2, SI-3310 Žalec, Slovenia, e-mail: iztok.kosir@ihps.si

<sup>2</sup> Pivovarna Laško Union d.o.o., Pivovarniška ulica 2, SI-1000 Ljubljana, Slovenia, e-mail: natasa.kocarmlinaric@heineken.com

surovine pomeni spremenjeno kemijsko sestavo sladice in posledično porušeno ravnovesje med različnimi fermentativnimi spojinami. Kvasovka *Saccharomyces pastorianus* TUM 34/70 je ena izmed naravnih sevov, ki jo je človek udomačil za tradicionalno proizvodnjo piva, kjer se uporablja izključno ječmenova sladica. Ob zamenjavi osnovnega substrata, se ravnovesje aromatičnih spojin, ki so ga pivovarji dosegli skozi stoletja, poruši.

Rezultati našega dela so pokazali, da višanje vsebnosti neslajenega ječmena bistveno vpliva na dušične komponente v pivini in v pivu. Vsebnost sladkorjev ostaja primerljiva, razen v varianti, kjer je bil kot nadomestek uporabljen samo neslajeni ječmen in je to vodilo v povišanje glukoze in maltotrioze. Posledica višanja vsebnosti neslajenega ječmena je tudi podaljšan čas fermentacije iz šest na 9 dni. Razlike v sestavi nadomestkov niso vplivale na senzorično oceno svežega piva in po staranju treh mesecev, medtem ko so bila najboljše ocenjena piva po šestih mesecih tista, kjer smo uporabili mešanico neslajenega ječmena in koruznega zdroba.

**Ključne besede:** pivo, nadomestki slada, kemijska sestava, senzorične lastnosti

## 1 INTRODUCTION

Beer is one of the world's oldest prepared beverages. It is estimated that it is more than 5000 years old and is one of the world's most popular drinks. In fact, it is the third most consumed drink overall, after water and tea (Arnold, 2005).

To all known beer flavour and aroma, are the results of a fine and subtle balance between numerous flavour active compounds, which are originating from raw materials used in brewing process, together with those originating from yeasts during fermentation. A combination of taste and odour is of crucial importance for consumers' acceptance of beer (Kunze, 2010).

Standard composition of the brewing raw materials for the production of wort includes pure barley malt. However, in the breweries in addition to the malt, various surrogates in the form of unmalted cereals are used too (unmalted barley and maize grits). The problem of the use of surrogates is that they may significantly alter the chemical composition and physical properties of wort, and thus the expected metabolism of yeast during the fermentation. Consequently, the sensorial description of the final product beer may be significantly affected.

Research work was primarily focused on comparison of different technological processes, where unmalted barley, maize grits and two mixtures of both in different ratios were used. Comparison of their influences on chemical composition and physical and sensorial properties of wort and beer was made. Main goals were detailed chemical characterization of wort, green beer and beer, where surrogates

for barley malt were used on industrial scale. After the production, selected parameters were monitored during the storage after 3 and 6 months to get the information on possible effects of different raw materials on beer stability and sensory.

## 2 MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Research design

Industrial scale production was conducted in conical fermentation tanks (total volume 4400 hl, working volume 3250 hl). Strict traceability of the ingredients for wort production (malt, maize grits and unmalted barley) was assured. A conventional brewing protocol and fermentation diagram for primary and secondary fermentation was applied. Four different worts were prepared using raw materials as presented in Table 1 in proportions of particular raw material expected to be used in conventional beer production.

**Table 1:** Presentation of raw materials used in particular brew in % (m/m)

	Barley malt	Unmalted barley	Maize grist
Variant 1	70	0	30
Variant 2	70	10	20
Variant 3	70	20	10
Variant 4	75	25	0

### 2.2 Yeasts

The yeasts used in the brewing process for all variants was a lager yeast strain, *Saccharomyces pastorianus* (TUM 34/70), supplied by the Yeast Centre at Weihenstephan, Germany. In all cases yeast generation C was used.

### 2.3 Chemical analyses

All chemical analyses used for wort, green beer and beer were done according to the Analytica-EBC and MEBAK collections of analytical methods as follows:

Total nitrogen in in wort: Kjeldahl method (Analytica-EBC, 2000a), Total nitrogen in beer: Kjeldahl method (Analytica-EBC, 2000b), Free amino nitrogen in wort by spectrophotometry (Analytica-EBC, 2002), Free amino nitrogen in beer by spectrophotometry (Analytica-EBC, 2000c), Total polyphenols in wort by spectrophotometry (Analytica-EBC, 1997), Total polyphenolos in beer by spectrophotometry (Analytica-EBC, 2002), Coagulable nitrogen (MEBAK, 2013a), Nitrogen fractionations (MEBAK, 2013d), Total sulphur dioxide in beer: Distillation method (Analytica-EBC, 1997), Fermentable carbohydrates in beer by HPLC (Analytica-EBC, 1997), Free dimethyl sulphide (DMS) in wort and beer

(MEBAK, 2013b), Vicinal diketones in beer: spectrophotometric method (Analytica-EBC, 2000), Higher alcohols and esters in beer (MEBAK, 2013c), Original gravity in wort and beer (MEBAK, 2013e) and Alcohol in beer by near infrared spectroscopy (Analytica-EBC, 2008).

During fermentation, glucose, fructose, maltose (DP2) and maltotriose (DP3) contents were monitored every day of fermentation. To assess maturation effects green beers were analysed on the first day of maturation and after two weeks when the maturation was ended. Immediately after bottling a complete analysis was done on fresh bottled beer to determine possible effects of filtration on the chemical composition. After bottling beers were stored for three and six months and analysed completely to see the effects of storage on chemical composition. At the same time samples were sensory analysed by a panel consisted from six trained members to see possible effects on sensory.

### 3 RESULTS AND DISCUSSION

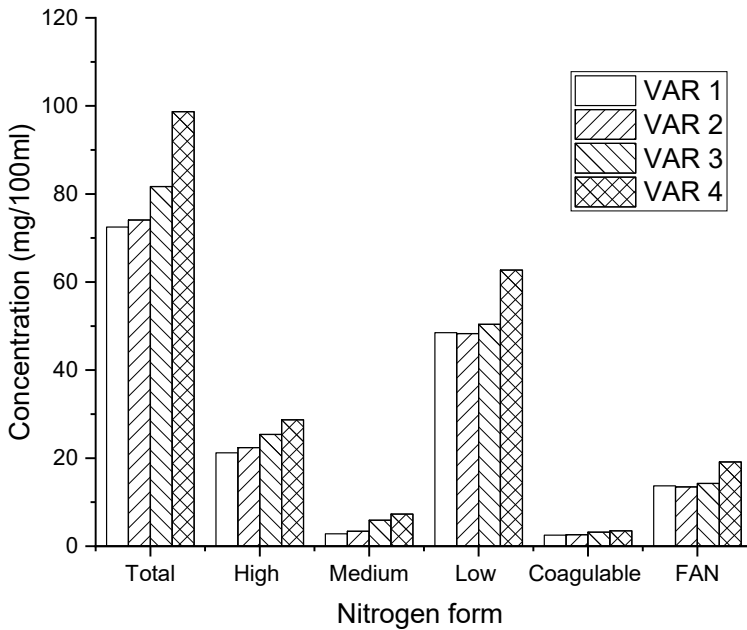
#### 3.1 Wort

In the experiment, four different worts were prepared, which differed in the content of each surrogate (unmalted barley, or maize), as described in the previous chapter. Table 2 presents the measured values of individual parameters.

**Table 2:** Results of chemical analysis of worts of all four variants

Parameter	VAR 1	VAR 2	VAR 3	VAR 4
Original gravity (%)	11.42	11.41	11.41	11.48
Total nitrogen (mg/100mL)	72.5	74.1	81.7	98.7
High molecular weight nitrogen (mg/100mL)	21.2	22.4	25.4	28.7
Medium molecular weight nitrogen (mg/100mL)	2.8	3.4	5.9	7.3
Low molecular weight nitrogen (mg/100mL)	48.5	48.3	50.4	62.7
Coagulable nitrogen (mg/100mL)	2.5	2.6	3.2	3.5
Free alpha amino nitrogen (mg/L)	137.1	134.6	142.4	191.4
Polyphenols (mg/L)	172.4	185.6	198.1	233.9
DMS (mg/L)	0.048	0.044	0.052	0.053
Glucose [g/100mL]	0.78	0.75	0.73	1.05
Fructose [g/100mL]	0.15	0.16	0.13	0.18
Maltose (DP2) [g/100mL]	5.64	5.81	5.87	5.46
Maltotriose (DP3) [g/100mL]	1.32	1.30	1.46	1.78
sum fermentable saccharides [g/100mL]	7.89	8.02	8.19	8.47

In Figure 1 is the graphical presentation of nitrogen fractions of the same results as presented in Table 1 for clearer outlook of the results.



**Figure 1:** Graphical presentation of nitrogen fractions in worts.

The results show that increasing the proportion of unmalted barley significantly increases all forms of nitrogen that were included in the analyses. The same trend can be observed in the contents of the polyphenols as in the case of nitrogen fractions, as the increase in polyphenols is as much as 14.9 %. In the case of fermentable saccharides, it could be seen that there are no significant differences between the first three variants, either in the individual type of saccharide or in the total sum of them. A larger deviation is observed in the fourth variant, where the content of glucose and maltotriose (DP3) is increased, and the content of maltose (DP2) is reduced. Fructose remains comparable in all variants. The content of DMS did not differ significantly in all three variants.

### 3.2 Fermentation

Fermentation took place in all four variants with the same yeast generation (C generation) and under the same conditions. In Variant 1, the fermentation was

completed within five days and in Variant 2 within six days. In Variant 3, the fermentation took 10 days, and in Variant 4, 9 days. Table 3 collects data on the concentrations of individual fermentable sugars during the course of fermentation.

The dynamics of consumption of individual saccharides during fermentation shows that the change of surrogate does not affect significantly the consumption of mono saccharides glucose and fructose, as their concentration falls below 0.1 g/100mL after two or three days of fermentation. However, increasing the unmalted barley surrogate begins to significantly increase the consumption time of DP2 and DP3. In variants 3 and 4, the fermentation took place for 10 or 9 days.

**Table 3:** Concentrations of fermentable saccharides during fermentation

Saccharide Variant and fermentation day	DP3 [g/100mL]	DP2 [g/100mL]	Glucose [g/100mL]	Fructose [g/100mL]
VAR 1/1	1.21	4.92	0.04	0.16
VAR 1/2	0.91	3.41	0.00	0.03
VAR 1/3	0.41	1.14	0.01	0.04
VAR 1/4	0.32	0.67	0.04	0.05
VAR 1/5	0.24	0.27	0.00	0.01
VAR 2/1	1.00	4.05	0.10	0.08
VAR 2/2	0.87	3.12	0.02	0.02
VAR 2/3	0.69	2.65	0.04	0.04
VAR 2/4	0.50	1.66	0.00	0.01
VAR 2/5	0.38	0.77	0.07	0.01
VAR 2/6	0.36	0.61	0.08	0.02
VAR 3/1	1.39	5.57	0.72	0.09
VAR 3/3	0.99	3.70	0.09	0.02
VAR 3/5	0.82	2.55	0.01	0.03
VAR 3/7	0.50	1.40	0.03	0.01
VAR 3/9	0.46	0.74	0.00	0.01
VAR 3/10	0.32	0.49	0.01	0.02
VAR 4/1	1.84	5.55	0.49	0.33
VAR 4/3	1.41	3.26	0.25	0.02
VAR 4/5	0.69	1.93	0.04	0.01
VAR 4/7	0.53	0.98	0.02	0.02
VAR 4/9	0.48	0.80	0.03	0.03

### 3.3 Maturation

For the purpose of maturation monitoring of the green beer, we performed a chemical analysis on the first day of maturation and the last day of maturation before beer filtration and bottling. We determined the parameters listed in Table 4.

*Table 4: Results of chemical analysis at the beginning and end of maturation*

	Start of maturation				End of maturation			
	VAR 1/6	VAR 2/7	VAR 3/11	VAR 4/10	VAR 1/7	VAR 2/8	VAR 3/12	VAR 4/11
Total nitrogen (mg/100mL)	53.8	58.5	67.9	85.4	53.2	57.5	68.3	85.0
High molecular weight nitrogen (mg/100mL)	11.0	14.1	17.1	18.2	11.3	12.9	15.7	20.6
Medium molecular weight nitrogen (mg/100mL)	11.0	11.1	11.2	17.9	10.9	11.8	12.9	14.4
Low molecular weight nitrogen (mg/100mL)	31.8	33.2	39.6	49.3	31.0	32.8	39.7	50.0
Coagulable nitrogen (mg/100mL)	1.4	1.3	1.5	1.9	1.6	1.8	2.0	2.5
Free alpha amino nitrogen (mg/L)	63.3	72.5	103.8	155.1	65.5	75.9	111.4	167.4
SO <sub>2</sub> (mg/L)	0.6	2.7	4.1	6.1	0.8	1.9	1.6	3.3
polifenoli (mg/L)	152.7	164.5	184.1	202.0	148.4	161.2	177.3	189.4
Acetaldehyde (mg/L)	8.63	6.13	8.08	13.01	2.81	3.48	4.65	8.74
Ethylacetate (mg/L)	14.49	17.99	17.28	18.64	16.30	17.55	16.63	17.68
Methanol (mg/L)	2.08	1.90	2.81	2.68	2.27	2.82	2.13	2.37
1-propanol (mg/L)	13.64	14.69	14.29	15.13	14.20	15.23	14.25	15.16
Iso-buthanol (mg/L)	10.26	2.30	7.43	8.74	10.20	9.50	7.15	8.63
Iso-amyl acetate (mg/L)	1.32	1.03	0.74	1.08	1.29	1.10	0.80	0.97
2-methylbutanol-1 (mg/L)	12.04	9.65	11.74	13.40	12.09	12.53	10.62	13.02
3-methylbutanol-1 (mg/L)	37.43	30.17	31.09	33.98	36.12	38.04	31.32	34.21
2-phenylethyl acetate (mg/L)	0.44	0.16	0.17	0.20	0.45	0.46	0.20	0.29
2-phenylethanol (mg/L)	28.66	12.77	14.10	13.13	29.93	25.82	12.93	12.69
DMS (mg/L)	0.05	0.07	0.07	0.06	0.10	0.10	0.04	0.04
diacetyl (mg/L)	0.09	0.09	0.04	0.04	0.05	0.05	0.05	0.06
DP3 [g/100mL]	0.18	0.25	0.18	0.15	0.33	0.46	0.54	0.40
DP2 [g/100mL]	0.13	0.21	0.11	0.17	0.23	0.26	0.31	0.19
Glc [g/100mL]	0.00	0.04	0.02	0.05	0.03	0.03	0.04	0.06
Fru [g/100mL]	0.02	0.01	0.02	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00

In the case of nitrogen fractions, elevated concentrations of practically all forms are maintained even after fermentation and the end of maturation, depending on the increase in the surrogate of unmalted barley. The difference after the end of maturation in most cases are no longer as obvious as in the case of worts, but are fairly even. High-molecular and alpha amino nitrogen forms stand out, which are significantly higher in variants 3 and 4. They are also significantly higher compared to variant 2 (malt/maize/unmalted barley). Polyphenols levels are no longer as high after maturation as in worts, but the difference between variants 1, 3 and 4 remains high. The contents of SO<sub>2</sub>, DMS and diacetyl do not differ significantly between the individual variants. The concentration of diacetyl drops as expected towards the end of maturation. In the field of higher esters and alcohols, the largest differences are observed in lower concentrations of iso-butanol, iso-amyl acetate, 2- and 3-methylbutanol-1, 2-phenyl acetate and 2-phenylethanol, which are consistent with the increase in the proportion of unmalted barley surrogate.

### 3.4 Beer storage

Table 5 presents the results of measurements in beer at bottling and after three or six months of aging. After filtration, the same set of parameters was analysed in the beer as after the end of maturation, since we wanted to see also the influence of filtration on individual parameters. The same set of parameters was then determined also after storage for three and six months. The results of the measurements show that the filtration process does not have a significant effect on individual nitrogen forms. The greatest impact in terms of concentration reduction is detectable in the case of coagulable nitrogen. Also during aging, the ratios between the individual forms depending on the surrogate used remain constant. Filtration significantly reduces the concentration of polyphenols. Reduction is more than 50 % for all variants. As beer is aged, their concentrations no longer change significantly. The concentration of DMS, SO<sub>2</sub> and diacetyl is not expected to be affected by filtration and their concentrations do not change significantly during aging. In all variants, the concentrations of those parameters are low. The concentrations of higher esters and alcohols are not significantly affected by filtration. The data for iso-butanol differ, but we don't have the explanation. The ratios between the individual alcohols and esters also remain comparable during aging and their concentration depends on the surrogate used, however, there are no major differences between the individual variants. Among some, a trend of increasing concentration of 2-phenylethanol and 2-phenyl acetate and decreasing concentration of iso-amyl acetate is observed during aging. Concentrations of other alcohols and esters do not change significantly. Table 5 presents the results of measurements in beer at bottling and after three or six months of aging.



**Table 5:** Results of measurements in bottled beer at bottling and after three and six months of aging

	Beer at filling				Beer after 3 months				Beer after 6 months				
	VAR	VAR	VAR	VAR	VAR	VAR	VAR	VAR	VAR	VAR	VAR	VAR	VAR
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	
Total nitrogen (mg/100mL)	52.5	57.1	70.7	79.0	54.6	58.1	70.7	85.4	52.4	56.8	67.9	78.8	
High molecular weight nitrogen (mg/100mL)	10.2	11.5	14.6	14.6	10.6	11.2	13.6	14.2	8.5	8.9	10.5	12.0	
Medium molecular weight nitrogen (mg/100mL)	11.5	13.6	20.5	23.6	11.5	13.8	16.7	19.9	13.1	14.8	18.2	20.6	
Low molecular weight nitrogen (mg/100mL)	30.9	32.0	35.6	40.7	32.5	33.1	40.4	51.3	30.8	33.2	39.2	46.2	
Coagulable nitrogen (mg/100mL)	0.8	0.9	0.9	1.0	1.3	1.2	1.6	1.8	1.6	1.5	1.8	2.4	
Free alpha amino nitrogen (mg/L)	64.9	75.8	125.4	150.2	60.7	79.5	123.8	142.9	60.9	70.8	110.5	162.8	
SO <sub>2</sub> (mg/L)	1.4	1.6	1.9	2.4	1.0	1.4	1.5	1.8	0.1	0.2	0.9	1.3	
Acetaldehyde (mg/L)	2.4	2.2	3.3	3.5	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ethylacetate (mg/L)	17.5	19.5	18.1	19.3	17.9	23.5	17.8	15.0	13.0	17.0	15.0	13.0	
1-propanol (mg/L)	14.0	15.0	14.9	14.9	18.9	19.0	17.1	14.3	14.0	11.0	15.0	15.0	
Iso-butanol (mg/L)	2.6	2.5	2.3	2.3	2.4	2.3	1.9	1.9	1.6	1.5	1.2	1.2	
Iso-amyl acetate (mg/L)	1.1	1.1	0.8	0.9	0.5	0.6	0.3	0.9	0.2	1.3	0.2	1.3	
(2+3)-methylbutanol-1 (mg/L)	42.1	42.8	40.7	40.9	44.3	42.7	41.9	42.0	48.0	41.0	43.0	43.0	
2-phenylethyl acetate (mg/L)	0.2	0.2	0.1	0.1	1.6	0.7	0.9	1.4	2.5	2.3	0.7	0.4	
2-phenylethanol (mg/L)	17.8	13.8	7.7	8.0	30.2	25.9	12.1	10.7	42.0	38.0	17.0	13.0	
DMS (mg/L)	0.038	0.039	0.045	0.044	0.000	0.040	0.046	0.045	0.040	0.040	0.049	0.048	
diacetyl (mg/L)	0.10	0.12	0.08	0.06	0.11	0.11	0.09	0.12	0.12	0.10	0.11	0.08	
polyphenols (mg/L)	85.4	82.4	75.6	66.6	83.4	90.0	100.8	106.2	87.7	81.2	103.4	102.1	

### 3.5 Sensorial assesment during beer aging

All beer samples were sensorial assessed at bottling time and after 3 and 6 months of aging. In sensorial assessment performed with the panel consisted of 6 trained members three parameters were assessed, namely odour, taste and bitterness, each scored from 1 to 5, where 1 mean the lowest and 5 the highest score. Final average scores are presented in Table 6.

**Table 6:** Average scores for sensory assessment

Sample	Odour (months)			Taste (months)			Bitterness(months)			Overall(months)		
	0	3	6	0	3	6	0	3	6	0	3	6
Variant 1	3.50	3.33	2.75	3.33	3.58	2.58	3.50	3.50	2.67	3.44	3.47	2.67
Variant 2	3.42	3.67	3.08	3.33	3.58	3.17	3.33	3.42	3.17	3.36	3.56	3.14
Variant 3	3.75	3.00	3.00	3.33	3.17	3.00	3.33	3.00	3.00	3.47	3.00	3.00
Variant 4	3.58	3.58	2.50	3.42	3.58	2.58	3.39	3.42	2.58	3.39	3.42	2.58

At the bottling time six panellist did not rate negatively none of the variants and they did not notice significant differences. No major changes were observed between the different ratios of unmalted barley as a surrogate after 3 months of aging. They did not recognise oxidation of beer and all samples are sensory stable. Among variants, the best scored sample was Variant 2 (10% of unmalted barley, 20% maize), followed by Variant 4 (25 % of unmalted barley). Still the panel concluded that there were no major differences between samples. After 6 months in all beers panel recognised storage impact on quality. However the best rated samples were those produced from the combination of unmalted barley and maize (Variants 2 and 3).

## 4 CONCLUSION

Examining the results of beer testing, monitoring fermentation and maturation and aging of bottled beer produced from different combinations of surrogates, we can see that at all technological stages there are significantly increased contents of nitrogen forms depending on the increase in the proportion of unmalted barley used. This could cause problems with the turbidity of the beer or the formation of unwanted aroma components. Increasing the proportion of unmalted barley significantly increases the content of polyphenols, which could also easily cause problems with the turbidity of beer. As can be seen from the results before and after filtration, their content is reduced by about 50 % by filtration. Although their content is still comparatively higher in the case of the use of unmalted barley, the absolute values are probably no longer so high as to cause problems during aging. It is interesting to note that the prolongation of the fermentation time by increasing the proportion of unmalted barley is mainly due to the slower consumption of DP2 and DP3. If the actual cause of the prolonged fermentation was a higher proportion of unmaletd barley as it could be concluded from our results, this can be

problematic from the point of view of increased production costs. However, research shows that yeasts can adapt to a new environment and, in subsequent successive uses, the negative impact of the environment on their viability declines. The measured parameters do not show significant deviations between individual variants in the case of volatile components of aroma. This may indicate that there are no increased precursors for the formation of negative components such as DMS, SO<sub>2</sub> in any surrogate, or that different surrogates do not significantly affect the ability to excrete secondary yeast metabolites.

## 5 REFERENCES

- Analytica-EBC, Method 8.10 - Free amino nitrogen in wort by spectrophotometry, 2002, <https://brewup.eu/ebcanalytica>
- Analytica-EBC, Method 8.9.1 - Total nitrogen in wort: Kjeldahl method, 2000a, <https://brewup.eu/ebcanalytica>
- Analytica-EBC, Method 9.2.6 - Alcohol in beer by near infrared spectroscopy, 2008, <https://brewup.eu/ebcanalytica>
- Analytica-EBC, Method 9.9.1 - Total nitrogen in beer: Kjeldahl method, 2000b, <https://brewup.eu/ebcanalytica>
- Analytica-EBC, Method 9.10 - Free amino nitrogen in beer by spectrophotometry, 2000c, <https://brewup.eu/ebcanalytica>
- Analytica-EBC, Method 9.27 - Fermentable carbohydrates in beer by HPLC, 1997, <https://brewup.eu/ebcanalytica>
- Arnold J.P. Origin and History of Beer and Brewing: From Prehistoric Times to the Beginning of Brewing Science and Technology. 2005. Cleveland. Alumni Assn. of the Wahl-Henius Institute. 1911.
- Kunze W. Technology of brewing and malting. Berlin, Germany: VLB; 2010.
- MEBAK, Method 2.6.2 - Coagulable nitrogen, MEBAK, Wort, beer and beer based beverages, Collection of brewing analysis methods of the Mitteleuropäische Brautechnische Analysenkommission. Ed. Fritz Jacob, Freising-Weihenstephan, MEBAK, 2013a: 78-80.
- MEBAK, Method 2.23.1.1 - Free dimethyl sulphide (DMS) in wort and beer, MEBAK, Wort, beer and beer based beverages, Collection of brewing analysis methods of the Mitteleuropäische Brautechnische Analysenkommission. Ed. Fritz Jacob, Freising-Weihenstephan, MEBAK, 2013b: 377-380.
- MEBAK, Method 2.21.6 - Higher alcohols and esters in beer, MEBAK, Wort, beer and beer based beverages, Collection of brewing analysis methods of the Mitteleuropäische Brautechnische Analysenkommission. Ed. Fritz Jacob, Freising-Weihenstephan, MEBAK, 2013c: 326-335.
- MEBAK, Method 2.6.3 - Nitrogen fractionation, MEBAK, Wort, beer and beer based beverages, Collection of brewing analysis methods of the Mitteleuropäische Brautechnische Analysenkommission. Ed. Fritz Jacob, Freising-Weihenstephan, MEBAK, 2013d: 81-86.
- MEBAK, Method 2.9 - Original gravity in wort and beer, MEBAK, Wort, beer and beer based beverages, Collection of brewing analysis methods of the Mitteleuropäische Brautechnische Analysenkommission. Ed. Fritz Jacob, Freising-Weihenstephan, MEBAK, 2013e: 139-140.

**EFFECT OF PHENOLIC COMPOUNDS EXTRACTED FROM *Camelina sativa* OIL ON OXIDATIVE STABILITY OF LIPID SYSTEM**Petra TERPINC<sup>1</sup> in Helena ABRAMOVIČ<sup>2</sup>

Original scientific article / izvorni znanstveni članek

Received / prispelo: 21. 8. 2020

Accepted / sprejeto: 11. 11. 2020

**Abstract**

Phenolic compounds obtained from *Camelina sativa* oil were analysed according to their antioxidative properties in bulk lipid system. The extract of phenolic compounds was prepared by use of solvent extraction. The results indicate that camelina oil extract added to model lipid system retarded the process of lipid peroxidation. The extract was able to decrease the formation of primary oxidation products determined as conjugated dienes and peroxide value in lipid system incubated at temperature 65 °C. Additionally, the induction time (*IT*) of bulk lipid system enriched with extract as determined by Rancimat test was extended by 10 %.

**Keywords:** *Camelina sativa*, false flax, phenolic compounds, oil, antioxidant activity, lipid peroxidation, peroxide value, conjugated dienes, Rancimat

**UČINEK FENOLNIH SPOJIN EKSTRAHIRANIH IZ OLJA *Camelina sativa* NA OKSIDATIVNO STABILNOST LIPIDNEGA SISTEMA****Izvleček**

Antioksidativne lastnosti fenolnih spojin, ki smo jih pridobili iz olja *Camelina sativa*, smo analizirali v lipidnem sistemu. Izvleček fenolnih spojin smo pripravili s solventno ekstrakcijo. Rezultati kažejo, da izvleček, ki ga dodamo modelnemu lipidnemu sistemu, zavira proces peroksidacije. Izvleček je v lipidnem sistemu, ki smo ga inkubirali pri temperaturi 65 °C, zmanjšal tvorbo primarnih oksidacijskih produktov. Primarne oksidacijske produkte smo določili kot vsebnost konjugiranih dienov in kot peroksidno število. Poleg tega smo z metodo Rancimat določili indukcijski čas (*IT*) in ugotovili 10 % podaljšanje *IT* za lipidni sistem z dodanim izvlečkom.

**Ključne besede:** *Camelina sativa*, navadni riček, fenolne spojine, olje, antioksidativna učinkovitost, lipidna peroksidacija, peroksidno število, konjugirani dieni, Rancimat

<sup>1</sup> Doc. dr., University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology, Jamnikarjeva 101, SI - 1000 Ljubljana, e-mail: petra.terpinc@bf.uni-lj.si

<sup>2</sup> Prof. dr., isti naslov, e-pošta: helena.abramovic@bf.uni-lj.si

## 1 INTRODUCTION

*Camelina sativa*, with the common names false flax or gold of pleasure, is an oilseed plant and belongs to the *Brassicaceae* family. Slovenia is one of the few countries where the tradition of producing it has been preserved until today (Abramovič and Abram, 2005; Hrastar et al., 2012). *C. sativa* seed consists of about 43 % oil in dry matter. The oil produced from the seeds is partly used as edible oil but most of it is used as a traditional home remedy. From the nutritional point of view, camelina oil is a rich source of essential fatty acids (linoleic and  $\alpha$ -linolenic) as well as  $\omega$ -3 fatty acid ( $\alpha$ -linolenic). The content of unsaturated fatty acids in the oil is about 90 % (Jankowski et al., 2019). About 50 % of the total fatty acids are polyunsaturated-linoleic acid (18:2 $n$ -6) and  $\alpha$ -linolenic acid (18:3 $n$ -3). The content of erucic acid (22:1 $n$ -9) in the oil is about 3.0 % (Hrastar et al., 2009). According to Hrastar et al. (2012) and Abramovič et al. (2007) the content of tocopherols in camelina oil is about 700 mg/kg oil with predominating  $\gamma$ -tocopherol. In one of our papers (Terpinc et al., 2012) we published results concerning the occurrence and characterisation of phenolic compounds in camelina oil obtained from the seeds grown in the Koroška region (Slovenia). It has been found that during the pressing of the seeds most of the phenolics remain in the seed residues (cake), only a small portion is transferred into the oil reaching the value expressed in chlorogenic acid equivalents (CAE) around 100 mg CAE/kg. In the same study the phenolic compounds catechin, *p*-hydroxybenzoic acid, ellagic acid, sinapic acid, salicylic acid and quercetin were identified.

Initial studies assumed that lipid oxidation in bulk oil takes place in a homogeneous medium. Today is known that systems like vegetable oils are complex multiphase systems which contain small amounts of monoacylglycerols, diacylglycerols, free fatty acids, phospholipids, sterols, cholesterol, phenolic compounds and oxidation products. These amphiphilic molecules can self-assemble due to hydrophobic interaction to form a variety of different types of association colloids, including lamellar structures and reverse micelles. However, safflower oil used in this investigation was refined. Thus above mentioned amphiphilic compounds are removed, but this bulk oil system can still contain small amounts of water what alter the structure and characteristics of oil, and behaviour of antioxidants added (Chaiyasit et al., 2007).

Antioxidant activity of camelina oil phenolics extract determined as free radical scavenging activity, metal ion reducing capacity, chelating ability and inhibitory action against  $\beta$ -carotene discolouration in an emulsified system has been investigated extensively (Terpinc et al., 2012). In comparison to the extract of phenolics obtained from camelina seeds and camelina cake the extract from camelina oil exhibited the highest iron-chelating capacity and was the most

effective in inhibiting  $\beta$ -carotene discolouration in an emulsified system. However, its antioxidant activity in bulk oil system was far less investigated.

Our model lipid system consisted of safflower oil, commercial standard without added antioxidants. Due to the high content of polyunsaturated fatty acids, it was expected that safflower oil would be exposed to the formation of undesirable off-flavors and potentially toxic oxidation products. Since one of the most effective means to delay lipid oxidation in oils is the incorporation of antioxidants, the aim of this study was to evaluate the protective effect of phenolic compounds extracted from camelina oil on the oxidative stability of the model lipid system (safflower oil). For that purpose, the Rancimat test was performed, and the formation of primary oxidation products in safflower oil incubated at elevated temperature was the followed method.

## 2 MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Materials

The camelina oil used in this study was produced from seeds of *Camelina sativa* plants grown in the Koroška region, Slovenia. After pressing the heat-treated seeds, the obtained camelina oil was filtered and stored in the refrigerator until analysis. The commercially available refined, bleached, deodorised safflower (*Carthamus tinctorius*) oil from Sigma (S5007; Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Germany) was employed as model lipid system. According to the product specification provided by the producer of this safflower oil, the fatty acid content (in weight percent; %) was: palmitic acid (16:0), 7 %; stearic acid (18:0), 2 %; oleic acid (18:1n-9), 16 %; linoleic acid (18:2n-6), 71 %. The peroxide value (*PI*) of safflower oil prior to the experiments was 3.8 mmol O<sub>2</sub>/kg. All other chemicals and solvents were of analytical grade.

### 2.2 Preparation of phenolic extract from camelina oil

Extract of phenolic compounds from camelina oil was prepared according to the method described by Terpinc et al. (2012) by use of methanol-water mixture (80:10, v/v) as extraction solvent. The oil-to-solvent ratio was 1:4 (w/v). The residue after condensation in a rotary evaporator was redissolved in ethanol. The extraction was performed in triplicate. The repeatability of the extraction process amounted to 94 %.

### 2.3 Determination of total phenolic content in extract from camelina oil

The content of total phenolic compounds in extract from camelina oil was determined according to the Folin-Ciocalteu method described by Gutfinger

(1981). The amount of total phenolic compounds was expressed in CAE. The determination was conducted in triplicate and results were averaged. The standard deviation of determination was less than 5 %.

#### **2.4 The protective effect of phenolic extract obtained from camelina oil on the oxidative stability of model lipid system**

Appropriately diluted extract was added to bulk safflower oil, producing the desired concentration of 200 mg CAE/kg. Ethanol was then evaporated using N<sub>2</sub>. The samples (70 mL) were transferred to transparent glass beakers (4 cm in diameter) covered with a watch glass and exposed to storage for 13 days at (65 ± 0.5) °C in the dark. Stored samples were subjected to determination of *PV* and conjugated dienes over a period of 13 days (after 2, 5, 11 and 13 days of experiment).

#### **2.5 Peroxide value determination of model lipid system**

The AOAC Official Method 965.33 (AOAC, 1999) was used for peroxide value (*PV*) determination. The value was expressed as mmol O<sub>2</sub>/kg of safflower oil. The determination was carried out in triplicate. The standard deviation of determination was less than 2 %.

#### **2.6 Conjugated dienes determination of model lipid system**

Conjugated dienes in the safflower oil were determined according to method described by (IUPAC, 1987). Weighed safflower oil samples were dissolved in 5 mL cyclohexane, diluted, and the absorbance was measured at 234 nm ( $A_{234}$ ) against cyclohexane as the blank. Results were expressed as specific extinction  $E$  (1 %, 1 cm) calculated by Equation 1:

$$E(1 \%, 1 \text{ cm}) = A_{234} / \gamma_{\text{oil}} \quad \dots(1)$$

where  $\gamma_{\text{oil}}$  is the concentration of safflower oil in cyclohexane (g/100 mL). The determination was carried out in duplicate. The standard deviation of determination was less than 5%.

#### **2.7 Rancimat test of model lipid system**

The test was performed on a 679 Rancimat apparatus (Metrohm model 743, Herisau, Switzerland). Safflower oil samples (3 mL) were subjected to a temperature of 110 °C at an air flow rate of 20 L/h. The oxidative stability was expressed as induction time (*IT*), which represents the time needed for decomposition of hydroperoxides produced by oil oxidation (Läubli et al., 1988).

The antioxidant activity of added antioxidants was expressed as protection factor (*PF*) that was calculated by Equation 2:

$$PF = 100\% \cdot (IT_{\text{extr}} - IT_{\text{control}}) / IT_{\text{control}} \quad \dots(2)$$

where  $IT_{\text{extr}}$  and  $IT_{\text{control}}$  mean the value for induction time for safflower oil with and without antioxidants, respectively. The determination was carried out in triplicate. The standard deviation was less than 3 %.

### 3 RESULTS AND DISCUSSION

From nutritional point of view, oils containing high proportion of polyunsaturated fatty acids are highly desirable. On the other hand, these oils are susceptible to oxidation. Oxidative stability of lipid system is one of the most important oil quality parameters that determine its usefulness as well as shelf life.

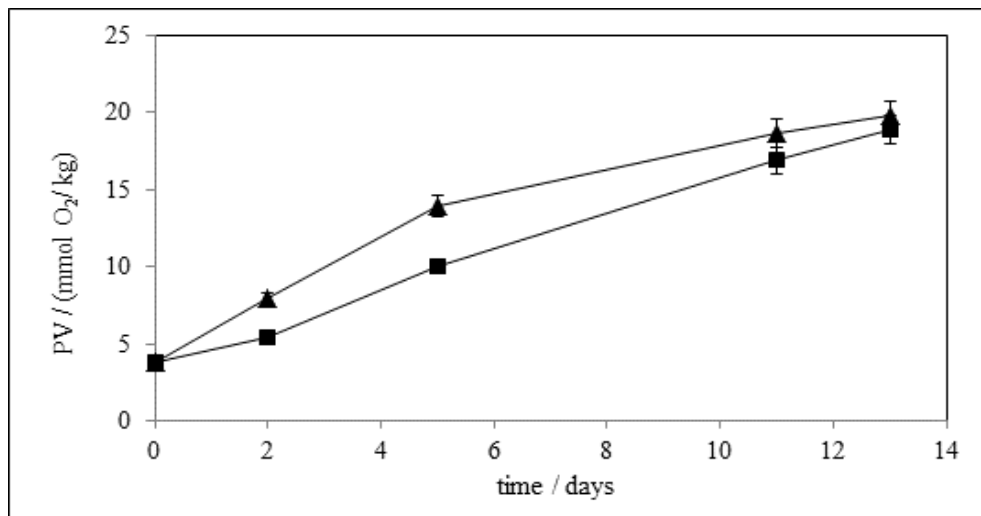
Lipid oxidation is a free radical chain reaction that includes common phases of initiation, propagation and termination. The generation of primary free radical causes the formation of another radical, resulting in the formation of the primary oxidation product, i.e. hydroperoxide. In addition, many free radical formed by decomposition of hydroperoxides are highly reactive. That leads to formation of the secondary and tertiary products which influence sensorial and nutritional properties of food. Besides, they react with the surrounding food components, thereby extending the undesirable effects of lipid oxidation (Zamora and Hidalgo, 2016).

Beside on fatty acid composition the oxidative stability of lipid system depends on its physical state and the presence of antioxidants (Martinović et al., 2019). The phenolic compounds act as antioxidants due to their capability to scavenge free radicals, chelate transitional metals and quench singlet and triplet oxygen molecules. However, chemical structure of phenolic compounds and reaction environment are of high importance.

In our investigation the ethanolic solution of extracted phenolic compounds from camelina oil was added to bulk lipid system (commercially available safflower oil) and the influence of these phenolic compounds on hydroperoxide formation during safflower oil storage at 65 °C was elucidated. As can be observed on Figure 1 the *PV* of the control (oil without added antioxidants) increased from 3.8 to 14.9 mmol O<sub>2</sub>/kg in the first six days, meanwhile *PV* of the safflower with added extract reached 11.3 mmol O<sub>2</sub>/kg in the same period. However, after 13 days i.e. at high *PVs*, the difference between the control and oil with added extract was reduced, what shows that extract obtained from camelina oil inhibited peroxidation more



effectively at the early stages of lipid peroxidation process. The same observation has been published previously (Deiana et al., 2002).

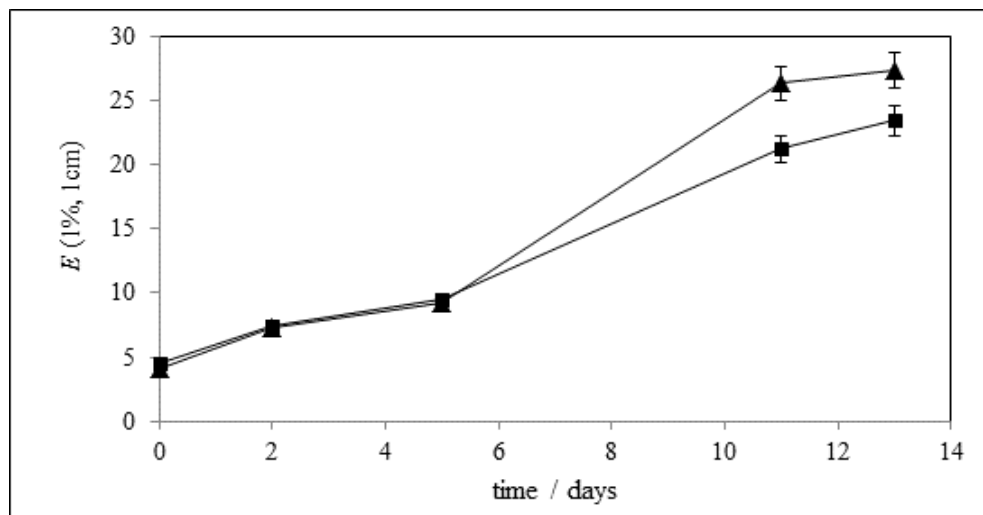


**Figure 1:** Dependence of PV of safflower oil on time of storage at 65 °C in the dark; (▲-control lipid system; ■- lipid system with camelina oil extract). Values are means of three determinations  $\pm$  standard deviation.

Phenolic compounds suppress lipid peroxidation mostly by scavenging radicals. The inactivation of free radicals is achieved through donation of hydrogen to a free radical and hence its transformation to unreactive species (Zamora and Hidalgo, 2016). In one of our previous studies (Abramovič et al., 2007) we have clearly shown how the content of natively present (not added) phenolic compounds in vegetable oil linearly decreased with increased PV during incubation at elevated temperatures (50 °C and 65 °C). In the same investigation it was observed that the rate of degradation with increased PV was much more profound at 65 °C than at 50 °C. When phenolic compound donates phenolic hydrogen to radical it oxidizes to quinone, which is not effective as radical scavengers. Further, there is also possibility for the formation of dimers of phenolic compounds among which some are antioxidatively active, but others are not. As a consequence, the antioxidant capacity of phenolic compounds in oil decreases as lipid peroxidation increases.

The formation of primary oxidation products formed during storage of safflower oil at 65°C was assessed also through determination of conjugated dienes. Lipids containing methylene-interrupted dienes or polyenes show a shift in their double bond position during oxidation. The resulting conjugated dienes, which relate to the production of hydroperoxides, exhibit intense absorption at 234 nm. The formation of conjugated dienes in control and in safflower oil containing

antioxidants as a function of storage time is presented on Figure 2. In the first 5 days, no significant difference in the formation of conjugated dienes between the control sample and the samples treated with extract was observed. At day 0 slightly higher  $E$  (1 %, 1 cm) value for control than for safflower with added extract was determined. According to Koski et al. (2002) who investigated antioxidant activity of another oil extract from *Brassica* family (i.e. rapeseed) in methyl linoleate at 100 ppm level, higher value was not due to initial higher content of hydroperoxides. It was attributed to the presence of other compounds, such as sinapic acid and its derivatives (Figure 3) with conjugated double bonds absorbing at 234 nm. Differences between the control and oil with added extract became more evident as storage time progressed. After 11 days incubation significantly higher contents of conjugated dienes were observed for control than for safflower oil with added extract which succeeded to inhibit lipid peroxidation for almost 20 %.

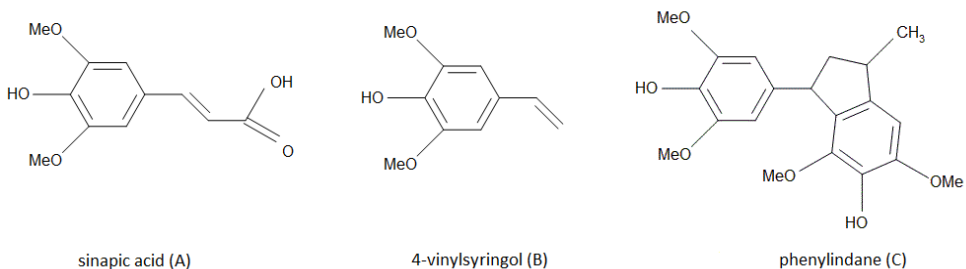


**Figure 2:** Dependence of  $E$  (1 %, 1 cm) at 234 nm of safflower oil on time of storage at 65 °C in the dark; (▲- control lipid system; ■- lipid system with camelina oil extract). Values are means of three determinations  $\pm$  standard deviation.

As we can see on Figure 2, at the end of the storage the concentration of conjugated dienes in control sample tend to decline. At later phases of lipid oxidation conjugated diene hydroperoxides are expected to decompose to secondary products. The results are in agreement with those reported by Peña-Ramos and Xiong (2003).

Considerable body of research has been dedicated to oxidative stability of vegetable oils and the efficiency of various extracts in prevention of lipid peroxidation has been extensively analyzed. However, this is the first report on antioxidant activity of camelina oil phenolic extract studied through Rancimat test. The Rancimat test determines the induction time of samples by measuring the increase in the volatile acids released from the oxidizing oil exposed to elevated temperatures and air flow. The concentration of these degradation products, which are transferred into distilled water, is assessed by measuring the conductivity. Longer *IT* indicates higher oxidative stability of lipid system and suggests stronger antioxidant activity of the added antioxidants. The Rancimat test is a commonly used procedure in the food industry to examine the oxidative stability of edible oils and for prediction of their shelf life. Gordon and Mursi (1994) reported for rapeseed oil that *IT* of 1 h determined at 100 °C was equivalent to 2 days storage at 20 °C. Maszewska (2018) found that the time of incubation at 63 °C at which selected *PV* was achieved was highly correlated to *IT* determined in Rancimat at 120 °C.

In our study the protective factor of camelina oil extract on the susceptibility to oxidation in Rancimat of safflower oil expressed as percentage extension of the *IT* amounted to 10 %. For safflower oil without added extract the *IT* was 12.3 h. During incubation at temperature used in Rancimat (110 °C) the transformation of phenolic compounds occurs more rapidly than at 65 °C which was the temperature of storage conducted in the previous part of this study. At 110 °C some of phenolic acids most probably underwent to so-called thermal decarboxylation and are transformed into their more volatile counterparts (Castada et al., 2020). The main phenolic compound in camelina oil is sinapic acid (Terpinc et al. 2012). As already published (Terpinc et al., 2011), during heat treatment, its decarboxylation product, 4-vinylsyringol (Figure 3), an important antioxidant, is formed. However, the content of this volatile compound, named also canolol, was decreased for 80 % when the oil was exposed to high temperatures (Koski et al., 2003; Mikołajczak et al., 2019). In this respect, next to evaporation of 4-vinylsyringol, its transformation to dimer, phenylindane (Figure 3), was proposed (Harbaum-Piayda et al., 2010).



**Figure 3:** Structures of sinapic acid (A), 4-vinylsyringol (B) and phenylindane (C).

In bulk lipid system, beside free radicals scavenging capability of phenolic compounds the polar paradox should be considered. The polar paradox states that lipophilic antioxidants (e.g. 4-vinylsyringol) are more effective in oil-in-water emulsions, while polar antioxidants (e.g. sinapic acid) are more effective in bulk lipid systems as confirmed in our previous study (Martinović et al., 2019). In this study after 20 days of incubation at 25 °C sinapic acid and 4-vinylsyringol added to lipid system at concentration 2 mmol/kg succeeded to suppress UV induced conjugated diene formation for 33 % and 9 %, respectively.

#### 4 CONCLUSION

Data presented in this study showed that phenolics obtained from camelina oil were able to decrease the formation of primary oxidation products in bulk lipid system stored at accelerated conditions (65 °C). Furthermore, the oxidative resistance of model lipid system (measured by Rancimat at 110 °C) was improved in the presence of extract of camelina oil. These findings suggest that the phenolic compounds extract from camelina oil has protective effect on the oxidative stability of lipid system.

#### 5 REFERENCES

- Abramovič H., Abram V. Physico-chemical properties, composition and oxidative stability of *Camelina sativa* oil. Food Technology and Biotechnology. 2005; 43(1): 63-70.
- Abramovič H., Butinar B., Nikolič V. Changes occurring in phenolic content, tocopherol composition and oxidative stability of *Camelina sativa* oil during storage. Food Chemistry. 2007; 104: 903-909.
- AOAC. Official methods of analysis (16th ed.), AOAC International, Gaithersburg. 1999.
- Castada H.Z., Sun Z., Barringer S.A., Huang, S. Thermal degradation of *p*-hydroxybenzoic acid in macadamia nut oil, olive oil, and corn oil. Journal of the American Oil Chemists' Society. 2020; 97: 289-300.
- Chaiyasit W., Elias R. J., McClements D. J., Decker E. A. Role of Physical Structures in Bulk Oils on Lipid Oxidation. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2007; 47: 299-317.
- Deiana M., Rosa A., Cao C. F., Pirisi F. M., Bandino G., Dessi M. A. Novel approach to study oxidative stability of extra virgin olive oils: Importance of  $\alpha$ -tocopherol concentration. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2002; 50: 4342-4346.
- Gordon M.H. , Mursi E. A comparison of oil stability based on the Metrohm Rancimat with storage at 20 °C. Journal of the American Oil Chemists' Society. 1994; 71: 649-651.
- Gutfinger T. Polyphenols in olive oils. Journal of the American Oil Chemists Society. 1981; 58: 966-968.
- Hrastar R., Gams Petrišič M., Ogrinc N., Košir I. J. Fatty acid and stable carbon isotope characterization of *Camelina sativa* oil: implications for authentication. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2009; 57: 579-585.

- Hrastar R., Abramovič H., Košir I. J. *In situ* quality characterization of *Camelina sativa* landrace from Koroška, Slovenia. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2012; 114: 343-351.
- Harbaum-Piayda B., Oehlke K., Sönnichsen F. D., Zacchi P., Eggers R., Schwarz K. New polyphenolic compounds in commercial deodistillate and rapeseed oils. *Food Chemistry*. 2010; 123: 607-615.
- IUPAC. Standard methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society, 4th ed., Champaign, IL: AOCS Press. 1987.
- Jankowski K.J., Sokólski M., Kordan B. *Camelina*: Yield and quality response to nitrogen and sulfur fertilization in Poland. *Industrial Crops and Products*. 2019; 141: 111776.
- Koski A., Psomiadou E., Tsimidou M., Hopia A., Kefalas P., Wähälä K., Heinonen M. Oxidative stability and minor constituents of virgin olive oil and cold-pressed rapeseed oil. *European Food Research and Technology*. 2002; 214: 294-298.
- Koski A., Pekkarinen S., Hopia A., Wahala K., Heinonen M. Processing of rapeseed oil: Effects on sinapic acid derivative content and oxidative stability. *European Food Research and Technology*. 2003; 217: 110-114.
- Läubli M. W., Bruttel P. A., Schalch, E. A modern method of determining the oxidative stability of fats and oils. *International Food Marketing and Technology*. 1988; 1: 16-18.
- Martinović N., Poklar Ulrich N., Abramovič H. Sinapic acid and its derivatives increase oxidative stability in different model lipid systems. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2019; 121(4): 1-10.
- Maszewska M., Florowska A., Dłu'zewska E., Wroniak M., Marciniak-Lukasiak K., Żbikowska A. Oxidative stability of selected edible oils. *Molecules*. 2018; 23(7), 1746.
- Mikołajczak N., Tańska M., Konopka I. Impact of the addition of 4-vinyl-derivatives of ferulic and sinapic acids on retention of fatty acids and terpenoids in cold-pressed rapeseed and flaxseed oils during the induction period of oxidation. *Food Chemistry*. 2019; 278: 119-126.
- Peña-Ramos E.A., Xiong Y.L. Whey and soy protein hydrolysates inhibit lipid oxidation in cooked pork patties. *Meat Science*. 2003; 64: 259–263.
- Schwarz K., Huang S.-W., German J. B., Tiersch B., Hartmann J., Frankel, E. N. Activities of Antioxidants Are Affected by Colloidal Properties of Oil-in-Water and Water-in-Oil Emulsions and Bulk Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000; 48, 4874-4882.
- Terpinc, P., Polak, T., Poklar Ulrich, N., Abramovič, H. Effect of heat treatment (*Camelina sativa*) seeds on the antioxidant potential of their extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011; 59: 8639-8645.
- Terpinc P., Polak T., Makuc D., Poklar Ulrich N., Abramovič H. The occurrence and characterisation of phenolic compounds in *Camelina sativa* seed, cake and oil. *Food Chemistry*. 2012; 131: 580-589.
- Zamora R. and Hidalgo F. J. The triple defensive barrier of phenolic compounds against the lipid oxidation-induced damage in food products. *Trends in Food Science & Technology*. 2016; 54, 165-174.

## OPTIČNA ANALIZA SEMEN INDUSTRIJSKE KONOPLJE

Tadej PERŠAK<sup>1</sup>, Ivan PAHOLE<sup>2</sup> in Simon KLANČNIK<sup>3</sup>

Strokovni članek / professional article

Prispelo / received: 23. 10. 2020

Sprejeto / accepted: 24. 11. 2020

### Izvleček

V raziskavi smo analizirali delež semen in primesi industrijske konoplje (*Cannabis sativa* L.), ki predhodno ni bila prečiščena. Za izvedbo analize smo razvili napravo, ki deluje na podlagi strojnega vida. Naredili smo program, ki iz zajetih slik s segmentacijo določi razmerje semen in primesi. Delujoči program smo optimizirali in izvedli testiranje delovanja. Pri analizi semen je bila uspešnost 88,9-odstotna, pri primeseh pa 92,7-odstotna. Predstavljeni so tudi predlogi za izboljšave delovanja sistema.

**Ključne besede:** industrijska konoplja, optična analiza, strojni vid

## OPTICAL ANALYSES OF INDUSTRIAL HEMP SEEDS

### Abstract

This paper presents a novel approach for determining the proportion of seeds and impurities of industrial Hemp, which has not been previously purified. To perform the analysis, a device based on Machine Vision was developed. The proposed program can determine the ratio of seeds and impurities from the captured images by Image Segmentation. The program performance was tested on various cases and was tuned to suit the determination specific needs. The Segmentation performance was 88.9 % for the seeds determination, and 92.7 % for the impurities determination. Suggestions for the proposed system improvements are also presented and discussed.

**Key words:** industrial hemp, optical analyses, machine vision

## 1 UVOD

Pri pridelavi različnih kmetijskih pridelkov nas zanima predvsem, koliko smo pridelali in kakšna je kakovost. Pri tem nam lahko pomagajo napredne tehnologije, kot je uporaba strojnega vida in umetne inteligence (Bargoti in Underwood, 2016;

---

<sup>1</sup> Mag. inž. meh., UM, FS, Smetanova ulica 17, 2000 Maribor, e-pošta: tadej.persak@um.si

<sup>2</sup> Izr. prof. dr., UM, FS, Smetanova ulica 17, 2000 Maribor, e-pošta: ivan.pahole@um.si

<sup>3</sup> Doc. dr., UM, FS, Smetanova ulica 17, 2000 Maribor, e-pošta: simon.klancnik@um.si

Koirala, Walsh, Wang in McCarthy, 2019). Te metode so sposobne oceniti količino in maso pridelka in se uporabljajo na različnih kmetijskih kulturah, kot so razni citrusi (Shin, Lee in Ehsani, 2012), mango (Payne, Walsh, Subedi in Jarvis, 2013), grozdje (Ivorra, Sánchez, Camarasa, Diago in Tardaguila, 2015), riž (Reza, Na, Baek in Lee, 2019), olive (Aquino, Ponce in Andújar, 2020), kivi (Mekhalfi et al., 2020) itd. Vsem naštetim rešitvam je skupno, da za svoje delovanje potrebujejo zajeto sliko. Sledi obdelava slike, s katero se poskuša določiti, koliko pridelka je na njej. Pridelki se poiščejo na podlagi barve ali oblike. Z uporabo umetne inteligence pa lahko stroj naučimo, da samostojno prepozna pridelke na podlagi učne baze, v kateri so primerki pridelkov.

Z naprednejšimi senzorji, ki ne zajamejo samo slike, ta je sestavljena iz posameznih točk z določeno barvo, lahko ugotovimo še veliko več. Z uporabo termokamere, ki zajame še podatke o toploti, ki je prisotna na sliki, je mogoče semenom konoplje (*Cannabis sativa* L.) določati stopnjo zrelosti (Ola, Budde in Gusovius, 2015). Senzor, kot je NIR (Near Infrared Spectroscopy), ki zajame sliko zunaj človekovega vidnega območja, lahko določi vsebnost kanabinoidov v semenih (Sánchez-Carnerero Callado, Núñez-Sánchez, Casano in Ferreiro-Vera, 2018).

V raziskavi smo določali razmerje semen in primesi. Uporabili smo mešanico industrijske konoplje, ki je pridobljena neposredno iz kombajna (Pahole, Pal, Belca in Belšak, 2017), (Slika 1). To pomeni, da zmes ni bila predhodno prečiščena. Ocenjevanja smo se lotili s strojnimi vidom. Začeli smo pri postavitvi laboratorijske naprave, ki je zajela kakovostne slike. Kakovost slike je močno pogojena z osvetlitvijo, podlago in nastavitvami kamere. S takšnimi slikami smo začeli iskati primeren algoritem detekcije semen in primesi, ki je potreben pogoj za ocenjevanje kakovosti mešanice industrijske konoplje.



*Slika 1: Mešanica semen in primesi industrijske konoplje*

## 2 OPREMA

Za pregledovanje mešanice semen s strojnim vidom najprej potrebujemo njene kakovostne slike. V ta namen smo uporabili transportni trak, nad katerim je bila nameščena industrijska kamera s prilagojeno osvetlitvijo in zaščito pred zunanjo svetlobo. Razviti nasipni lijak z zalogovnikom za mešanico semen je skrbel za enakomerno nasipovanje mešanice na trak za pregledovanje. Na Sliki 2 vidimo laboratorijski prototip sistema za pregledovanje semen.



*Slika 2:* Na levem delu slike je nasipni lijak, v sredini je transportni trak za pregledovanje semen, na desnem delu je komora za zajem slik skupaj z osvetlitvijo in industrijsko kamero.

Kot vidimo na Sliki 2, je sistem za pregledovanje sestavljen iz treh glavnih delov. To so nasipni lijak, transportni trak za pregledovanje in komora za zajem slik.

### 2.1 Nasipni lijak

Naloga nasipnega lijaka je nadzorovano doziranje mešanice na transportni trak za pregledovanje. Sestavljen je iz tekočega traku, ki je gnan z motorjem 5 V DC. Nad transportnim trakom je zalogovnik, v katerem je mešanica. Zalogovnik ima na sprednji strani nastavljivo loputo. Z nastavljanjem velikosti odprtine in hitrosti pomika tekočega traku nastavljamo masni pretok sistema.

### 2.2 Transportni trak za pregledovanje

Iz nasipnega lijaka pada mešanica na prozoren transportni trak za pregledovanje, ki je izdelan iz poliuretana in pobrušen z granulacijo 220. Pod trakom je bela podlaga,



ki je primerno ozadje za učinkovito delovanje sistema strojnega vida. Naloga tega traku je transport enakomerno nasipane mešanice od nasipnega lijaka do komore za zajem slik in na koncu do zalogovnika za že pregledano mešanico. Transportni trak se zaradi zajema slik ne ustavlja. Slike mešanice zajamemo med gibanjem tekočega traku.

### 2.3 Komora za zajem slik

Za zajem slik semen industrijske konoplje smo uporabili industrijsko kamero Basler acA2500–14uc z lečo Computar 12 mm. Brez homogene osvetlitve ne moremo zajeti kakovostnih slik, zato smo uporabili dve delovni luči LED (Light-emitting diode) z močjo 27 W nevtralnno bele barve (5000 K) (Slika 3). Enoto za osvetljevanje sestavlja leseni okvir, na katerega so nameščeni dve luči in razpršilec svetlobe (Slika 3). Za preprečevanje vstopa zunanje svetlobe skrbi zaščitna komora.



*Slika 3: Osvetlitev sistema strojnega vida*

### 2.4 Krmiljenje

Za krmiljenja sistema oziroma povezavo med osebnim računalnikom in napravo za pregledovanje mešanice je poskrbela razvojna ploščica Arduino UNO. Programska logika teče v programskem okolju LabView 2018, razvojna ploščica Arduino UNO pa vkloplja osvetlitev z relejem in prek tranzistorja s pulzno širinsko modulacijo (PŠM) krmili motor za pogon nasipnega lijaka. PŠM omogoča izbiro hitrosti vrtenja motorja na nasipnem lijaku.

Pogon glavnega tekočega traku je izveden s trifaznim asinhronskim motorjem s frekvenčnim regulatorjem Mitsubishi S500. Vkllop in nastavljanje hitrosti glavnega tekočega traku se izvajata ročno na kontrolni plošči frekvenčnega regulatorja.

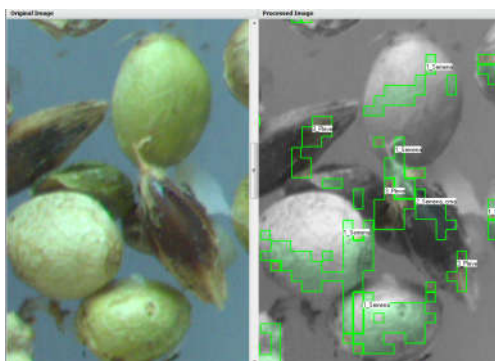
### 3 STROJNI VID

Pregledovanje mešanice semen in primesi je bilo izvedeno s strojnim vidom. Za to smo uporabili osebni računalnik s procesorjem Intel Core i5-2400 3,10 GHz in 8 GB RAM. Sistem strojnega vida smo razvili z uporabo razvojnega okolja LabView 2018 z moduloma Vision development 18.0.0 in Vision acquisition 18.0.0. Kot je že bilo omenjeno, je programsko okolje LabView skrbelo za upravljanje celotnega sistema, le hitrost glavnega tekočega traku smo nastavljali ročno.

Strojni vid se začne z zajemom slike, ki jo pozneje obdela. Cilj delovanja strojnega vida je določiti delež semen in primesi. Testirali smo različne algoritme, a najboljše rezultate smo dosegli z uporabo barvne segmentacije.

Segmentacija je algoritem, ki na osnovi algoritma najbližjih sosedov (ang. *k*-Nearest Neighbors) (National Instruments, 2020, September 23) barvne klasifikacije segmentira sliko (National Instruments, 2020, September 23). Klasifikator smo naučili na dva razreda z imenom *semena* in *primesi*. Pri razvoju in testiranju programa razred *semena* predstavlja kratica OK, razred *primesi* pa kratica NOK.

Segmentacija pregleda vso sliko in njen posamezni delček razvrsti v ustrezen razred (*semena* ali *primesi*). Območja na sliki, ki ostanejo neprepoznana, pa pomenijo ozadje. Na Sliki 4 je vidna segmentacija na podlagi slabo naučenega klasifikatorja *k*-NN. V tem primeru vidimo, da pravilno določa regije na semenih in primeseh, ne prepozna pa še celotnega objekta. Prav to je posledica neučinkovitega učenja *k*-NN klasifikatorja.



**Slika 4:** Barvna segmentacija slike, na kateri so semena in primesi.

#### 4 PROGRAM ZA DOLOČANJE RAZMERJA

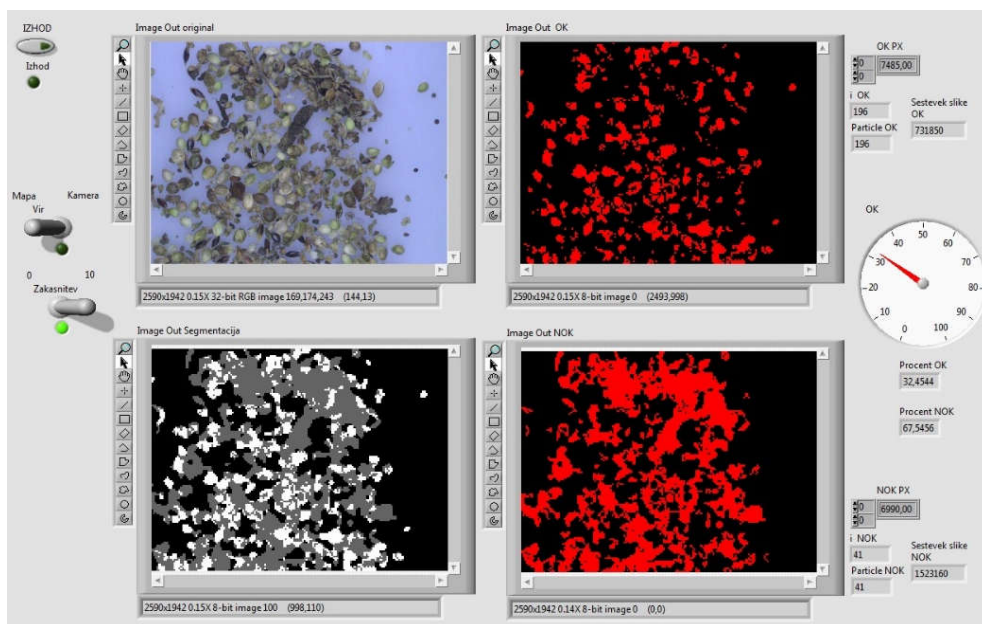
Razviti sistem smo želeli avtomatizirati tako, da sam zajame sliko, jo analizira in kot rezultat določi, kakšen je delež semen in primesi.

V programskem okolju LabView smo program razdelili na dve glavni zanki, ki se izvajata vzporedno. Ena zanka je namenjena strojnemu vidu, druga je za krmiljenje naprave za zajem slik z razvojno ploščico Arduino.

V zanki za krmiljenje opravimo vkloppljanje in izkloppljanje osvetlitve in krmiljenje motorja nasipnega lijaka s pulzno širinsko modulacijo.

V zanki za strojni vid imamo sekvenčno izvajanje naslednjih algoritmov:

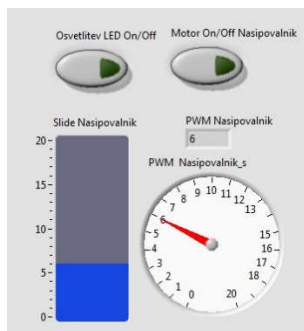
1. Zabeležimo trenutni čas. (Potrebujemo ga za računanje časovne potratnosti celotnega algoritma.)
2. Zajamemo sliko glede na izbrani vir. Sliko lahko beremo iz mape na računalniku, v kateri so že zajete slike, ali pa jo zajamemo neposredno iz kamere.
3. Izvedemo segmentacijo, ki je že predhodno naučena. Hkrati na uporabniškem vmesniku prikažemo sliko, ki jo obdelujemo, in segmentirano sliko. Segmentirana slika je 8-bitna in je predstavljena s tremi vrednostmi pik. Prva je 0, to je ozadje (črna barva). Druga je 100, to so primesi (siva barva). Tretja je 255, to so semena (bela barva) (Slika 5).
4. Iz segmentirane slike, ki ima tri barve, moramo ugotoviti, koliko je katere barve. Na podlagi tega izračunamo razmerje. Na segmentirani sliki izvedemo pragovno metodo (ang. threshold), s pomočjo katere na obdelani sliki izločimo barvo semen in primesi. Pragovna vrednost za semena je nastavljena na območju med 200 in 255, pragovna vrednost za primesi pa med 50 in 150. Koliko je ozadja, nas ne zanima. Izhod iz obdelave s pragovno metodo je matrika površin, podanih v pikah za posamezen delček. Na uporabniškem vmesniku prikažemo sliko samo s semeni in samo s primesmi (Slika 5).
5. Naslednji korak je obdelava matrike s podatki o površinah semen in površinah primesi. Iz posamezne matrike beremo površine delčkov in jih seštevamo. To naredimo za semena in primesi z dvema ločenima zankama, ki se izvajata vzporedno. Rezultat je seštetna površina semen in primesi.
6. Sledi računanje razmerja. Iz podatka o površini semen in primesi na sliki izračunamo, koliko odstotkov je semen in koliko primesi.
7. Znova zabeležimo trenutni čas in od njega odštejemo čas, zabeležen na začetku algoritma.
8. Izračunamo čas izvajanja celotnega algoritma.



**Slika 5:** Uporabniški vmesnik programa v programskem okolju LabView

Na Sliki 5 vidimo uporabniški vmesnik.

- Na levem delu so tipka za izhod, stikalo za izbiro vira slik za obdelavo in stikalo za zakasnitev za lažje spremljanje delovanja.
- V sredini so prikazi slike:
  - levo zgoraj je originalna slika, zajeta iz kamere ali mape,
  - levo spodaj je slika z opravljeno segmentacijo,
  - desno zgoraj je binarna slika, na kateri so semena,
  - desno spodaj je binarna slika, na kateri so primesi.
- Na desnem delu na sredini uporabniškega vmesnika nas najbolj zanimajo analogni prikazovalnik odstotkov deleža primesi in semen in numerične vrednosti pod njim.



**Slika 6:** Uporabniški vmesnik za nastavljanje hitrosti nasipnega lijaka in vklapljanje luči

Na sliki 6 je prikazan uporabniški vmesnik za krmiljenje. Na njem imamo:

- tipko za vklop in izklop osvetlitve,
- tipko za vklop in izklop motorja nasipnega lijaka,
- drsnik za nastavljanje hitrosti motorja nasipnega lijaka s prikazovalnikom izbrane vrednosti in še numerični prikaz izbrane vrednosti.

## 5 HITROST OBDELAVE SLIKE

Kapaciteta pregleda mešanice je odvisna od hitrosti strojnega vida. Za to smo segmentacijo, ta je računsko precej zahtevna, izvajali vzporedno. Če želimo sliko segmentirati vzporedno, jo moramo najprej razrezati. V ta namen smo razvili algoritem, ki sliko razdeli na dva dela. Vsak del slike se vzporedno segmentira in po segmentaciji spet sestavi. Naredili smo testiranje hitrosti običajne segmentacije in vzporedne segmentacije. Za primerjanje hitrosti obdelave smo uporabili vedno enako sliko. Rezultati so v Preglednici 1.

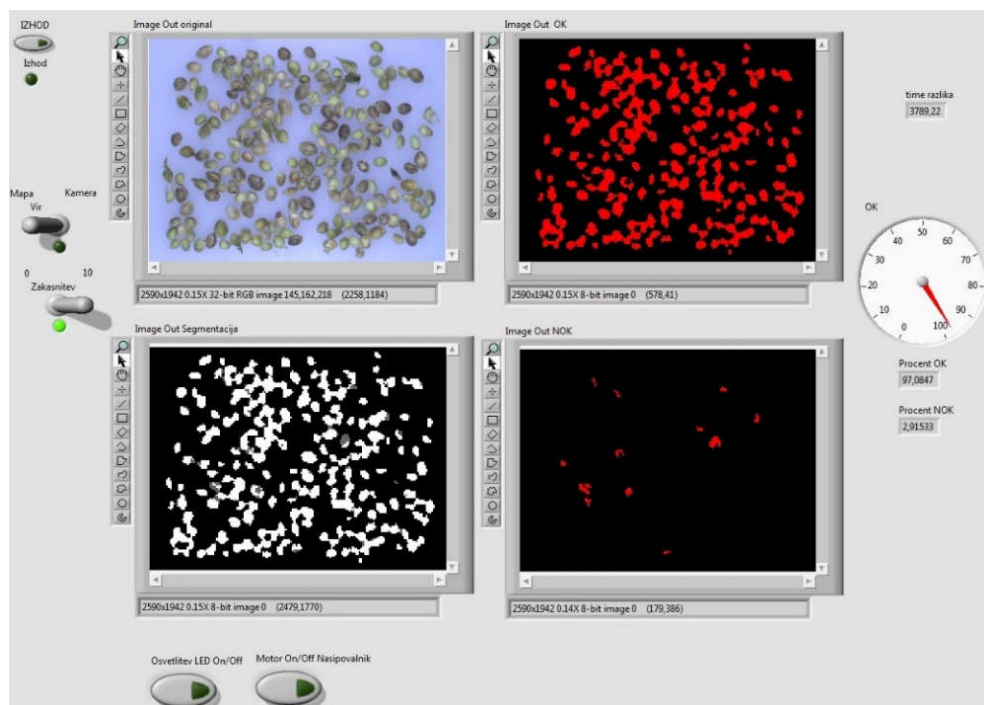
**Preglednica 1:** Primerjava časov izvajanja segmentacije

Algoritem	Čas [ms]
Čas rezanja in sestavljanja slike	150
Strojni vid z običajno segmentacijo	2550
Strojni vid z vzporedno segmentacijo	1450

V preglednici 1 vidimo, da običajna segmentacija traja 2550 ms. Če ta čas razpolovimo zaradi vzporednega izvajanja, dobimo 1275 ms. Temu času moramo prišteti čas rezanja in sestavljanja slike, ki znaša 150 ms. Seštevek je torej 1425 ms in je podoben času vzporedne segmentacije. Tako ugotovimo, da smo čas izvajanja strojnega vida skrajšali za 1100 ms ali 43 %.

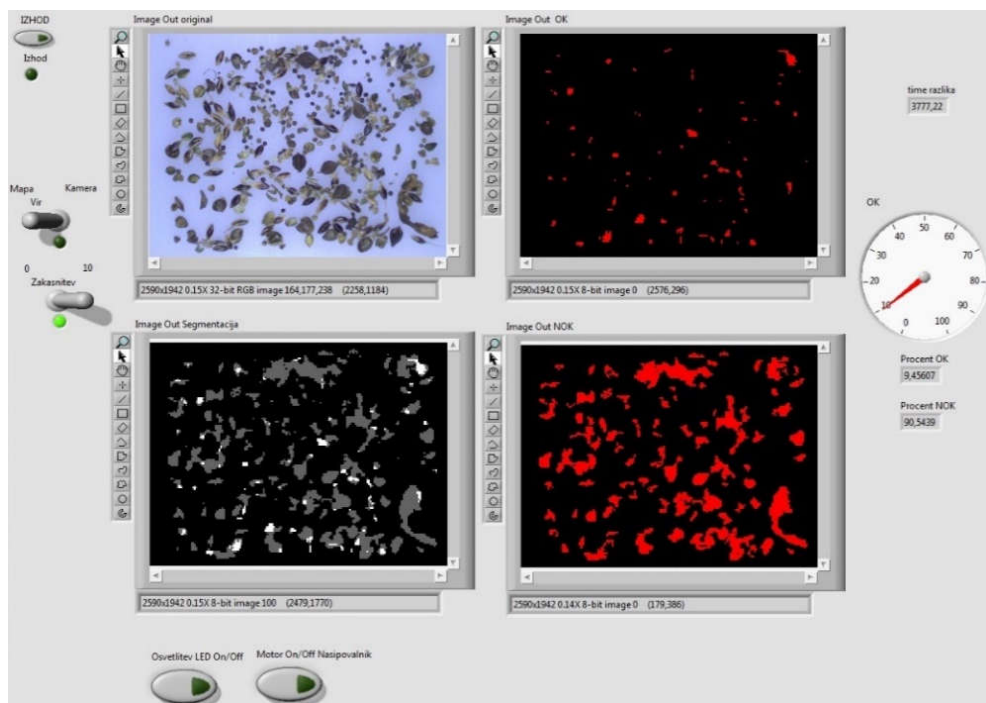
## 6. TESTIRANJE DELOVANJA SISTEMA IN UGOTOVITVE

Opravili smo testiranje, s katerim smo preverili točnost algoritma. Vzorec industrijske konoplje smo ročno sortirali na semena in druge primesi. Sledila sta slikanje semen in primesi posebej ter preverjanje z algoritmom. Načeloma bi algoritem pri semenih moral pokazati, da je vzorec 100 % OK, pri primeseh pa, da je 100 % NOK.



*Slika 7: Optični pregled vzorca semen*

Na Sliki 7 je prikazano testiranje optičnega pregleda vzorcev semen. Rezultat je 97 % za semena. Po pregledu semen smo ugotovili, da je v vzoru nekaj semen, ki so zelo temna in podobna primesem. Te delčke je sistem prepoznal kot primesi. Na Sliki 8 vidimo testiranje optične analize primesi. Rezultat je 90 % za primesi. Tudi pri primeseh je nekaj delčkov, ki so podobni semenom in jih je sistem napačno razvrstil.



*Slika 8: Optični pregled vzorca primesi*

Za ocenjevanje učinkovitosti delovanja sistema smo opravili več testiranj, rezultati so predstavljeni v Preglednici 2.

*Preglednica 2: Testiranje algoritma*

Vzorec	Ročno sortirano iz mešanice semen in primesi		Rezultati testiranja z algoritmom	
	Masa semen [g]	Masa primesi [g]	Semena [%]	Primesi [%]
1	0,5	0	<b>93,3</b>	6,7
2	0,7	0	<b>87,7</b>	12,3
3	0,5	0	<b>79</b>	21
4	1,05	0	<b>87,1</b>	12,9
5	1,7	0	<b>97,4</b>	2,6
6	0	0,3	7,3	<b>92,7</b>
7	0	0,6	7	<b>93</b>
8	0	0,4	6,1	<b>93,9</b>
9	0	0,5	5,3	<b>94,7</b>
10	0	0,8	10,8	<b>89,2</b>

V Preglednici 2 vidimo:

- da smo opravili pet testiranj za vzorce samo s semeni in pet testiranj za vzorce samo s primesmi;

- bolj, kot se rumeno obarvane vrednosti Semena [%] in Primesi [%] v Preglednici 2 približujejo vrednosti 100 %, bolj natančno je ocenjevanje razmerja semen in primesi;
- razvidno je tudi, da algoritem pri določanju deleža semen deluje manj natančno, in sicer s povprečno natančnostjo 88,9 %, kot pri določanju deleža primesi, kjer prepozna primesi s povprečno natančnostjo 92,7 %.

Za testiranje sistema smo uporabili klasifikator  $k$ -NN s tremi najbližjimi sosedi in 552 vzorci. Učinkovitost delovanja sistema bi lahko izboljšali z dodatnim učenjem klasifikatorja. V celoti bi napake težko odpravili, ker so si nekatera semena in primesi zelo podobni.

## 7 SKLEPI

Z raziskavo smo rešili problem določanja deleža semen in primesi v pridelku industrijske konoplje. Z razvitim sistemom lahko določimo delež semen z 88,9-odstotno natančnostjo, delež primesi pa z 92,7-odstotno natančnostjo. Rezultati so slabši pri določanju deleža semen. Podana natančnost je povprečje petih testiranj za posamezni razred.

Naše delo bi se lahko nadaljevalo v smeri dodelave algoritma in uporabniškega vmesnika.

Algoritem bi lahko še dodatno pohitrili z vzporednim izvajanjem. Zdaj segmentacija poteka vzporedno z razrezom slike na dva dela, lahko pa bi jo lahko nadgradili tako, da bi zajeto sliko razrezali na več delov in s tem delovanje sistema še dodatno pospešili. Narediti bi morali teste, da bi ugotovili, kakšno je optimalno število vzporednih segmentacij. Upoštevati moramo še, da nekaj časa porabimo tudi za razrez in sestavljanje slik.

## 8 LITERATURA

- Aquino, A., Ponce, J. M. in Andújar, J. M. Identification of olive fruit, in intensive olive orchards, by means of its morphological structure using convolutional neural networks. *Computers and Electronics in Agriculture*. 2020; 176. doi:10.1016/j.compag.2020.105616
- Bargoti, S. in Underwood, J. Image Segmentation for Fruit Detection and Yield Estimation in Apple Orchards. *Journal of Field Robotics*. 2016.
- Ivorra, E., Sánchez, A. J., Camarasa, J. G., Diago, M. P. in Tardaguila, J. Assessment of grape cluster yield components based on 3D descriptors using stereo vision. *Food Control*. 2015; 50, 273-282. doi:10.1016/j.foodcont.2014.09.004
- Koirala, A., Walsh, K. B., Wang, Z. in McCarthy, C. Deep learning – Method overview and review of use for fruit detection and yield estimation. *Computers and Electronics in Agriculture*. 2019; 162, 219-234. doi:10.1016/j.compag.2019.04.017



- Mekhalfi, M. L., Nicolò, C., Ianniello, I., Calamita, F., Goller, R., Barazzuol, M. in Melgani, F. Vision System for Automatic On-Tree Kiwifruit Counting and Yield Estimation. *Sensors (Basel, Switzerland)*. 2020; 20(15). doi:10.3390/s20154214
- National Instruments. Color Classification. Dostopno na: [https://zone.ni.com/reference/en-XX/help/372916T-01/nivisionconcepts/color\\_classification/](https://zone.ni.com/reference/en-XX/help/372916T-01/nivisionconcepts/color_classification/) (2020, September 23).
- National Instruments. Color Segmentation. Dostopno na: [https://zone.ni.com/reference/en-XX/help/372916T-01/nivisionconcepts/color\\_segmentation/](https://zone.ni.com/reference/en-XX/help/372916T-01/nivisionconcepts/color_segmentation/) (2020, September 23).
- Ola, D. C., Budde, J. in Gusovius, H. J. A THERMOVISION ASSESSMENT METHOD OF QUALITY FOR OILY SEEDS (*Cannabis Sativa* L.). *Bulletin of the Transilvania University of Brasov, Series II. Forestry, Wood Industry, Agricultural Food Engineering*. 2015; 8(2), 91-98.
- Pahole, I., Pal, M., Belca, U. in Belšak, A. Tehnološke zahteve za kombajne na njivah s konopljo v Sloveniji. *Hmeljarski bilten*. 2017; 24, 129-137.
- Payne, A. B., Walsh, K. B., Subedi, P. P. in Jarvis, D. Estimation of mango crop yield using image analysis – Segmentation method. *Computers and Electronics in Agriculture*. 2013; 91, 57-64. doi:10.1016/j.compag.2012.11.009
- Reza, M. N., Na, I. S., Baek, S. W. in Lee, K.-H. Rice yield estimation based on K-means clustering with graph-cut segmentation using low-altitude UAV images. *Biosystems Engineering*. 2019; 177, 109-121. doi:10.1016/j.biosystemseng.2018.09.014
- Sánchez-Carnerero Callado, C., Núñez-Sánchez, N., Casano, S. in Ferreiro-Vera, C. The potential of near infrared spectroscopy to estimate the content of cannabinoids in *Cannabis sativa* L.: A comparative study. *Talanta*. 2018; 190, 147-157. doi:10.1016/j.talanta.2018.07.085
- Shin, J. S., Lee, W. S. in Ehsani, R. Postharvest citrus mass and size estimation using a logistic classification model and a watershed algorithm. *Biosystems Engineering*. 2012; 113(1), 42–53. doi:10.1016/j.biosystemseng.2012.06.005

***Cannabis sativa* L. AND ITS POTENTIAL APPLICATIONS IN ENVIRONMENTAL BIOREMEDIATION. A REVIEW.**Richwell ALUFASI<sup>1</sup>, Silvija ZEMAN<sup>2</sup>, Tanja BAGAR<sup>3</sup> and Walter CHINGWARU<sup>4</sup>

Review article / pregledni znanstveni članek

Received / prispelo: 30. 9. 2020

Accepted / sprejeto: 4. 11. 2020

**Abstract**

The rapid population growth, urbanisation and industrialisation as well as modern agricultural practices, have resulted in production of large volumes of various kinds of wastes that pollute the environment. Management of waste is a serious challenge in both developed and developing countries. Hemp / marijuana, scientifically referred to as *Cannabis sativa* L., is a controversial herb in all spheres of society. While the plant is praised for its therapeutic and perhaps prophylactic properties against a number of ailments, hemp has also found a place in bioremediation, with applications that include ridding environments of biological and chemical contaminants, particularly in wastewater and solid waste. The following account appraises the known and potential applications of hemp in environmental remediation. Studies have shown that *Cannabis sativa* L. can take up and accumulate heavy metals in its tissues. The specific mechanisms that hemp employs in the bioremediation processes include: (i) phytoextraction, (ii) rhizofiltration, (iii) phytodegradation and (iv) phytovolatilisation. Based on the novelty of applications of hemp in bioremediation, further research is urged to unravel the full potential of the plant in all spheres of environmental management.

**Key words:** Solid waste, phytoremediation, *Cannabis sativa* L., hemp, heavy metals, leachate

---

<sup>1</sup> PhD student, Biological Sciences Department, Bindura University of Science Education, P. Bag 1020 Bindura, Zimbabwe, e-mail: alufasirichie@gmail.com

<sup>2</sup> doc. dr., The Polytechnic of Međimurje, Bana J. Jelačića 22a, Čakovec, Croatia, e-mail: szeman@mev.hr

<sup>3</sup> doc. dr., ICANNA - Mednarodni inštitut za kanabinoide, Ulica Carla Benza 16, Ljubljana, Slovenia, e-mail: tanja.bagar@institut-icanna.com, corresponding author

<sup>4</sup> Prof. dr., Biological Sciences Department, Faculty of Science, Bindura University Science Education, P. Bag 1020, Bindura, Zimbabwe; e-mail: wchingwaru@yahoo.co.uk

## ***Cannabis sativa* L. IN NJENA POTENCIALNA UPORABA ZA BIOREMEDIACIJO OKOLJA. PREGLEDNI ČLANEK**

### **Izveleček**

Zaradi hitre rasti števila prebivalcev, urbanizacije in industrializacije ter sodobnih kmetijskih praks nastajajo velike količine različnih vrst odpadkov, ki onesnažujejo okolje. Ravnanje z odpadki je resen izziv tako v razvitih državah kot v državah v razvoju. Konoplja, znanstveno imenovana *Cannabis sativa* L., je kontroverzna rastlina na vseh področjih družbenega delovanja. Poleg svojih terapevtskih in morda tudi profilaktičnih lastnosti pri številnih boleznih, je konoplja našla svoje mesto tudi v ekologiji. Konoplja kaže dober potencial za aplikacije v bioremediaciji, ki vključuje odstranjevanje bioloških in kemičnih onesnaževal, zlasti iz odpadnih voda ter trdnih odpadkov iz tal. Ta članek opisuje znane in potencialne načine uporabe konoplje pri sanaciji okolja. Študije so pokazale, da *Cannabis sativa* L. lahko vsrka in kopiči težke kovine v svojih tkivih. Specifični mehanizmi, ki jih konoplja uporablja v procesih bioremediacije, vključujejo: (i) fitoekstrakcijo, (ii) rizofiltracijo, (iii) fitorazgradnjo in (iv) fitovolatilizacijo. Na podlagi obstoječih študij in potenciala, ki ga tovrstno čiščenje nosi, se poziva k nadaljnjim raziskavam o uporabi konoplje za čiščenje okolja, da se razkrije celoten potencial te rastline na vseh področjih ravnanja z okoljem.

**Ključne besede:** trdni odpadki, fitoremediacija, *Cannabis sativa* L., konoplja, težke kovine, izcedna voda

## **1 INTRODUCTION**

Soil pollution is a serious environmental problem, especially in highly industrialised western countries (Di et al., 2020). The rapid population growth, urbanisation and industrialisation as well as modern agricultural practices, have resulted in production of large volumes of various kinds of wastes containing both organic and inorganic compounds (Bakhshoodeh et al., 2020; Kumar et al., 2017; Singh et al., 2016). Human activities such as release of industrial effluents, municipal wastes and waste sludge is highly implicated in contamination of soil (Asad et al., 2015). In addition, mining and smelting of metalliferous ores as well as the use of pesticides and fertilizers, have reportedly resulted in contamination of large areas of land with heavy metals (Singh et al., 2016). Although some heavy metals including Fe, Mn, Zn, Cu, Mg, Mo and Ni are necessary for plant growth, they are detrimental to the environment at high concentrations (Husain et al., 2019). The persistent nature of the heavy metals and their leaching into the environment is a serious health threat to living organisms and the environment (Citterio et al., 2003b; Asad et al., 2015; Singh et al., 2016; Kumar et al., 2017; Hussain et al., 2019). Studies have shown that heavy metals negatively affect the

nervous, renal, gastrointestinal, reproductive, cardiovascular, skeletal and muscular systems of organisms (Di et al., 2020).

The rapid growth in human population and associated consumptive lifestyle have caused a significant growth in the volume of municipal solid waste (MSW) generated by communities (Bakhshoodeh et al., 2020). Globally, there is an unprecedented increase in the volume MSW and its generation is estimated to increase to 3.4 billion tons per annum in 2050 (Kaza et al., 2018). In most developing countries, landfilling is the common method for disposal of almost all the generated solid waste (Aljaradin, 2012). Percolation of precipitation through the landfills and internal biological processes generates leachate which contains a mixture of dissolved organic and inorganic compounds including heavy metals (cadmium-Cd, chromium-Cr, copper-Cu, lead-Pb, nickel-Ni and zinc-Zn) and xenobiotic compounds (Jones et al., 2006; Rosenkranz, 2013). The leachate migrate through the soil spreading the contaminants to the surrounding ecosystems (Tangahu et al., 2011). The dissolved organic and inorganic compounds are usually in high concentrations and are a threat to the environment and human health (Husain et al., 2019; Saxena et al., 2019). There is therefore a need for appropriate treatment of the leachate before releasing it into the environment.

In vast majority of countries, both developing and developed, prioritise management of contaminated soils, the sustainability of the remediation methods in place is a challenge. There are several remediation technologies that were developed and applied in the remediation of ecosystems contaminated with toxic wastes. Common technologies for toxic pollutant removal include stabilization/solidification, incineration, solvent extraction, soil washing, thermal treatment, chemical treatment, air sparging and verification (Kumar et al., 2017). However most of these technologies are costly, technically difficult, environmentally unsustainable and perform below expectation (Tangahu et al., 2011). For example remediation of heavy metal contaminated ecosystems using excavation and disposal to a landfill method is a matter of shifting the contamination problem to another site (Tangahu et al., 2011). There is need to develop robust technologies that are efficient, cost effective, technically easy and environmentally sustainable for the remediation of contaminated environments such as phytoremediation.

Phytoremediation, a technology which uses plants and their associated rhizospheric microorganisms to remove, degrade, or immobilize various contaminants from polluted soils (Marques et al., 2009), has emerged as promising alternative measure for remediation of contaminated soils. The technology uses naturally occurring processes involving plants and their microbial rhizosphere organisms to sequester, degrade or immobilize or detoxify pollutants in the remediation of contaminated soils (Marques et al., 2009; Rosenkranz, 2013; Gomes, 2012; Kumar et al., 2017).

The technology is cost effective and environmentally friendly and has gained environmentalists interest as a sustainable approach for eradicating toxic soil contaminants (Tangahu et al., 2011; Kumar et al., 2017; Husain et al., 2019). Several studies investigated the potential of various plants to remove toxic substances from contaminated soils. A number of the studied plants have displayed potential for application in phytoremediation (Husain et al., 2019) with more than 400 species being able to absorb and accumulate metals (Asad et al., 2015). In addition a wide range of pollutants like inorganic chemicals including heavy metals and metalloids, many organic substances including persistent organic pollutants and radioactive materials have reportedly been removed by plants from contaminated environments (Pandey et al., 2016, Yao, 2017, Vaverkova et al., 2017). However there are disadvantages in the use of plants in remediation as the process quite slow and usually takes several years (Shi & Cai, 2009) due to low biomass and root penetration depth of selected plants, in some cases (Citterio et al., 2003b). Nevertheless, studies reported in recent years have focused on studying the phytoextraction capabilities of species with a high production capacity which could compensate for the lower accumulation levels through higher biomass production (Di et al., 2020). Researchers have shown great interest on *Cannabis sativa* L. and several studies have investigated its ecoremediation potential (Citterio et al., 2003b; Citterio et al. 2005; Hussain et al., 2019; Galić et al., 2019; Di et al., 2020).

Hemp / marijuana, scientifically referred to as *Cannabis sativa* L., is a controversial plant in all spheres of society that has been cultivated for over 6000 years (Vaverkova et al., 2017). While the plant is praised for its known and novel therapeutic and perhaps prophylactic properties against a number of ailments, including cancer, lupus, asthma, rheumatoid arthritis, depression and hypertension (Piluzza et al., 2013; Caffarel et al., 2012), the herb has gained interest for its psychoactive properties, hence a major drug of (ab)use. *Cannabis sativa* L. has proved to be a major source of materials of industrial importance, as a source of seed oil, industrial fibre (Musio, Müssig, & Amaducci, 2018), livestock feed, food as well as for recreation, religious and spiritual practices (Kumar et al., 2017), paper-making, cosmetics, personal care and pharmaceutical product manufacturing (Vaverkova et al., 2017) and lately the plant has found a place in the field of environmental protection. Of interest in the field of environmental protection, is the use of hemp in bioremediation, with applications that include ridding environments of organic and inorganic contaminants. The plant also has a rapid growth, high biomass production, extensive and deep root system, short growing cycle, decreased need for pesticides, high tolerance to drought and heavy metal, stress as well as high metals accumulating capability which makes it an ideal candidate for phytoremediation studies (Ahmad et al., 2015; Husain et al., 2019; Pietrini et al., 2019; Di et al., 2020). Against this background, we evaluate organic and inorganic contaminant removal of *Cannabis sativa* L. and its potential application in

bioremediation of sites contaminated with toxic or hazardous anthropogenic wastes.

## 2 THE POTENTIAL USE OF *Cannabis sativa* L. BIOREMEDIATION

### 2.1 Using *Cannabis sativa* L. for soils contaminated with heavy metals

Pollution of the environment with heavy metals has dramatically accelerated during the last century (Barazani et al., 2004; Di et al., 2020) as humans began to engage in mining, smelting, manufacturing and disposal of municipal waste (Ayers, 1992). Soil contamination by heavy metals is a major problem to the world today (Ahmad et al., 2015). Heavy metals are known to persist in the environment since they are not chemically or biologically degradable (Barazani et al., 2004; Marques et al., 2009). Several studies have explored the use of *Cannabis sativa* L. in the remediation of heavy metal contaminated soils. Uptake and accumulation of a variety of heavy metals including Ni, Pb, Cd, Zn, Cu and Cr in hemp tissues have been reported (Linger et al., 2002; Kos et al., 2003; Piotrowsk-Cyplik and Czarnecki, 2003; Tlustoš et al., 2006; Ahmad et al., 2015; Linger et al., 2005). A study by Linger et al. (2002), in Germany, examined the capability of *Cannabis sativa* L. to decontaminate heavy metal polluted soils. Field based experiments using soil polluted with sewage sludge containing Cd, Ni and Pb revealed that hemp can indeed take up the heavy metals and distribute them throughout the tissues (seeds, leaves, fibres and hurds).

With regards to Cd, Linger et al. (2002) reported that *Cannabis sativa* L. extracted approximately 120 g/ha over a period of 3–4 months. The concentration of these metals differed between tissues and the highest concentration was recovered in leaves. However in another study, Linger et al. (2005), using pot experiments in a greenhouse, to investigate phytoextraction of Cd by *Cannabis sativa* L., revealed that the roots accumulated the highest Cd concentrations, reaching a maximum of 830 mg kg<sup>-1</sup> dry mass after 24 days with stems and leaves accumulating up to 87 and 68 mg kg<sup>-1</sup>, respectively. A similar study was conducted in Pakistan. Ahmad et al. (2015), focused on phytoextraction of Cu, Cd and Ni by hemp growing on heavy metal contaminated soil. Heavy metals accumulation rates of 1530 mg kg<sup>-1</sup> Cu, 151 mg kg<sup>-1</sup> Cd and 123 mg kg<sup>-1</sup> Ni were recorded, making the plant a suitable candidate for remediation of soils contaminated with these metals. For each heavy metal, the concentration recovered from tissues differed. Clitterio et al. (2003b) reveals that the order of accumulation by *Cannabis sativa* L. is Cd>Ni>Cr. Contrary to the findings by Clitterio et al. (2003b), a recent field study, at Mazovian Agricultural Advisory Centre in Poland, found the concentration of heavy metal accumulation by hemp to be the highest for Fe followed by Mn, Zn, Cr, Cu, Ni, and then Cd (Zielonka et al., 2020). Over all, some concentrations of heavy metals recovered from the tissues of hemp reported, qualify the plant for

hyperaccumulation (Under & Conditions, 2020). More investigations are required as there are reports to the contrary. However studies have demonstrated that hemp meets the criterion of a phytoextractor related to the heavy metal transfer from root to shoot.

The distribution of heavy metals within *Cannabis sativa* L. tissues are contradictory. A field study by Angelova et al. (2004) showed that heavy metals distribution along the plant axis is selective and the contents in hemp decreased in the following order: roots > stems > leaves > seeds. These findings are consistent with results by Ahmad et al. (2015). Shi et al. (2012) used pot tests to investigate Cd accumulation potential of eighteen hemp cultivars under greenhouse conditions at Huaibei Normal University in China. Cd accumulation rates and distribution in root and shoot tissues of the plant were shown to be significantly different ( $p < 0.001$ ). Hemp roots were shown to accumulate high Cd concentrations (217–481 mg kg<sup>-1</sup>) compared to the shoots (11.4–24.9 mg kg<sup>-1</sup>). This trend was also observed for the removal of radioactive materials from the environment by *Cannabis sativa* L. A study by Hoseini et al. (2012) in Tehran, Iran, confirms that roots absorb the highest concentrations of strontium (Sr) with 45% absorbed by the roots, 40% by the stem, and 15% by the leaves. This is in contrast to earlier reports by Linger et al. (2002) that high concentrations of Cd accumulate in leaves. It is however advantageous for heavy metals to be highly concentrated in the above ground tissues as harvesting of these parts ensure removal of the contaminants from the environment.

Regardless of the discrepancies in the distribution of heavy metal within the *Cannabis sativa* L. tissues, the plant have generally shown tolerance to heavily polluted soils (Shi & Cai, 2009; Shi et al., 2012). Tolerance of the plant to heavy metals depends on the species ability to activate molecular mechanisms, for example heavy metal sequestration in the cell wall and/or in vacuoles (Citterio et al., 2003b). This is based on genetic, morphological, physiological and anatomical characteristics of the plant (Galić et al., 2019). Although Linger et al. (2002) reported that increasing concentrations of metals in soils leads to increased translocation from roots to leaves and shoots of hemp plants, Tlustoš et al. (2006) observed that increasing concentration of heavy metals increases plant growth inhibition due to element toxicity in soil. However *Cannabis sativa* L. roots demonstrated a strong resistance to heavy metals as well as hyperaccumulator like potential (more than 100 mg kg<sup>-1</sup> Cd in dry tissue) (Girdhar & Raj, 2014). In 2005 Linger et al. (2005) investigated the effects of different Cd concentrations on *Cannabis sativa* L. growth (i.e. on roots, stem and leaves) and on photosynthesis. Study reports high tolerance to Cd (>800 mg of Cd kg<sup>-1</sup>(d.m)) of roots and no major effect on *Cannabis sativa* L. growth. However Cd concentrations of 50–100 mg kg<sup>-1</sup> (d.m) adversely effected the viability and vitality of leaves and stems. The high Cd concentration affected chlorophyll synthesis as well the photosynthesis

machinery lowering overall plant productivity (Linger et al., 2005). Plants grown in soil with high Cd concentration ( $71.7 \pm 8.2$  mg (Cd)  $\text{kg}^{-1}$ (soil), showed very strong growth inhibition, necrosis and most plants survived for 4 to 5 weeks post sowing. However pot experiments conducted by Shi et al. (2012) observed that some hemp cultivars such as Longxi, Lu'an, Xingtai, Yunma 2, Yunma 3, Yunma 4, and Qijing could tolerate 25 mg Cd  $\text{kg}^{-1}$  soil stress and therefore can be cultivated in Cd contaminated soils. Generally results reported by Di et al. (2020) confirm that soil heavy metal concentrations do not significantly interfere with hemp growth. This further confirms the suitability of the various cultivars suitable for phytoremediation of heavy metal contaminated soils.

The high tolerance of hemp to heavy metals reported could be attributable to presence of heavy metal genes (*GSR* and *PLD $\alpha$* ) (Citterio et al., 2003b; Ahmad et al., 2015). A study by Linger et al. (2005) showed that hemp is a Cd-tolerant plant, with strong resistant roots and is capable of long-term acclimation. Hemp plants activate mechanisms that prevent damage such as production of glutathione and phytochelatins which inactivate excess of absorbed metals (Citterio et al., 2003b). Phytochelatins synthesised in the cytosol, are involved in the formation of ligand complexes with metals which are then sequestered into vacuoles (Girdhar & Raj, 2014). With regards to Cd, Angelova et al. (2004) found that some genotypes respond sensitively to Cd changes in the soil, with increased Cd concentration in soil causing its increased transport from roots to above-grounds plant parts. This mechanism ensures that more Cd can be taken up from the soil.

## 2.2 Using *Cannabis sativa* L. for remediation of landfill leachate

Landfills are considered a convenient and cost-effective method for solid waste management in many countries across the globe. Of note is the fact that solid waste materials in a landfill undergo physical, chemical and biological transformation which produces leachates (Zloch et al., 2017). The leachate, which is a major source of pollution, commonly contains large amounts of organic matter, ammonium, heavy metals, and chlorinated organic and inorganic salts, which in turn are a major threat to soils and water sources in the vicinity of the landfill (Vaverková et al., 2017).

Hemp has reportedly been used in the treatment of landfill leachate. Studies indicate that leachate can induce both positive and negative responses in the plants (Mor et al., 2013). In 2017, Vaverkova et al. (2017), evaluated the potential of *Cannabis sativa* L. for toxicity removal from landfill leachate. Laboratory based hydroponic experiments were carried out using raw leachate collected from the pond of untreated leachate at a sanitary landfill in Czech Republic to investigate effects of different concentrations of leachate on seed germination and seedling growth of three hemp cultivars. Study results indicate that leachate can severely



inhibit plant growth particularly concentrations greater than 90%. However leachate concentrations lower than 25% stimulated growth. Furthermore the response to leachate toxicity differed. The toxic effect of leachate on plants depends on several factors including the plant species and the composition of the leachate. Leachate contains a wide range of inorganic and xenobiotic organic (XOCs) compounds like hydrophobic, volatile, aromatic and aliphatic organic substances (Vaverkova et al., 2017). No studies to show the toxicity of the individual components on hemp plants were found.

A recent field based study by Zloch et al. 2017 investigated reaction of two *Cannabis sativa* L. varieties (Bialobrzieskie and Monoicaon) to leachate irrigations. Comparisons were made in terms of growth between plants that were irrigated with leachate and those with rainwater, the controls. Study results indicate that Bialobrzieskie and Monoicaon varieties watered with rainwater grew 26% and 34% taller on average respectively, than plants watered with leachate. This result supports earlier results by Vaverkova et al. (2017) indicating that leachate inhibit growth of *Cannabis sativa* L. However growth inhibition and or toxicity may not be the same in seeds, seedling and older plants. Further investigations are therefore necessary on the toxicity of leachate on hemp plants, that is, in terms which cultivar can tolerate leachate toxicity and toxic substance removal from leachate. Although results indicate high levels of inhibition to growth of hemp, other studies conducted revealed that it can accumulate a considerable amount of heavy metals making it a good candidate for remediation.

Several studies explored the potential use of various plants in environmental protection through phytoremediation. Indications are that plants can be used sustainably to decontaminate polluted environments.

### 3 MECHANISMS FOR HEAVY METAL REMOVAL

Heavy metal uptake and accumulation capabilities of plants cannot be explained by passive ion uptake and the metal tolerance genes only. There are many more mechanisms involved in phytoremediation including, phytoextraction, phytovolatilization, rhizofiltration, and phytodegradation (Jones et al., 2006; Rosenkranz, 2013; Girdhar & Raj, 2014). Plants uses phytoextraction, a process of extraction of pollutants from the soil and accumulation in the plant tissue, to remove metals from the environment (Rosenkranz, 2013). The metals enter the roots either by following the apoplastic pathway or symplastic pathway. However the uptake and accumulation of metals is influenced by several factors.

Soil factors, including pH, soil organic matter content, redox potential, clay content, cation exchange capacity, nutrient balance, concentrations of other trace elements in soil, soil moisture and soil temperature influence phytoextraction in

plants (Galić et al., 2019; Di et al., 2020 ). Soil pH affect mobility and bioavailability of metals in the soil solution (Husain et al., 2019). Study by Pietrini et al. (2019) on metal absorption by hemp showed that alkaline conditions negatively affected the mobility and bioavailability of metals thereby reducing their uptake. Suitable pH is therefore critical, for example most heavy metals, including Cd, Cr, Cu, Ni, Pb and Zn, reportedly become more bioavailable under acidic soil conditions (Galić et al., 2019).

Besides pH, heavy metal removal from the soil is reportedly enhanced by biodegradable chelating agents that increase bioavailability of metal elements (Malhotra et al., 2014). A study conducted by Kos et al. (2003) in Slovenia investigated the effects of chelates ethylenediamine-tetracetic acid (EDTA) and ethylenediamine-disuccinic acid (EDDS) on phytoextraction of Pb, Zn and Cd by fourteen plant species. EDDS significantly improved phytoextraction in *Cannabis sativa* L. but was generally less effective in other tested plants. In the case of Pb, phytoextraction potential 26.3 kg/ha were recorded for *Cannabis sativa* L., which was much higher than 126 g/ha as reported by Linger et al. (2002). This improves the prospects of hemp as a remediation agent. Further investigations are needed on this aspect to improve phytoextraction of heavy metals even in the management of solid waste and wastewater.

#### 4 CONCLUSION

Phytoremediation is fast developing field and metals uptake by plants seems to be an economic and sustainable way to remediate contaminated environment. Evidence from the studies above indicates that *Cannabis sativa* L. (hemp) can tolerate heavy metals thus can grow in heavy metal contaminated soils removing metal contaminants from soils and landfill leachate. The improved uptake of metals due to application of chelating agents and the presence of metal tolerance genes affirms the suitability of this plant species for phytoremediation. Furthermore, hemp can accumulate significant amounts of heavy metals in its tissues due to its high biomass productivity and deep roots. This makes it a good candidate for phytoremediation. Although little research has been done in the application of phytoremediation of landfill leachate, the potential of hemp in cleaning up contaminants from leachate is promising. Based on the novelty of applications of hemp in bioremediation, further research is urged to unravel the full potential of the plant in all spheres of environmental management.

**Acknowledgements.** This paper describes the results of research being carried out within the project “Centar održivog razvoja”/“Center of sustainable development”, co-financed by the European regional development fund and implemented within Operational Programme Competitiveness and Cohesion 2014 – 2020, based on the

call "Investing in Organizational Reform and Infrastructure in the Research, Development and Innovation Sector".

## 5 REFERENCES

- Ahmad, R., Tehsin, Z., Tanvir-Malik, S.T., Asad, S.A., Shahzad, M., Bilal, M., Shah, M.M., & Khan, S.A. (2016). Phytoremediation potential of hemp (*Cannabis sativa* L.): identification and characterization of heavy metals responsive genes. *Clean-Soil Air Water*, 44, 195–201.
- Aljaradin, M. (2012). Environmental Impact of Municipal Solid Waste Landfills in Semi-Arid Climates - Case Study – Jordan. *The Open Waste Management Journal*, 5(1), 28–39. <https://doi.org/10.2174/1876400201205010028>
- Amaducci, S., Zatta, A., Raffanini, M., & Venturi, G. (2008). Characterisation of hemp (*Cannabis sativa* L.) roots under different growing conditions. *Plant and Soil*, 313(1–2), 227–235. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9695-0>
- Angelova, V., Ivanova, R., Delibaltova, V., & Ivanov, K. (2004). *Bio-accumulation and distribution of heavy metals in fibre crops ( flax , cotton and hemp )*. 19, 197–205. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2003.10.001>
- Asad, S. A., Muhammad, S., & Shah, M. M. (2015). *Phytoremediation Potential of Hemp ( Cannabis sativa L .): Identification and Characterization of Heavy Metals Responsive Genes*. (November 2017). <https://doi.org/10.1002/clen.201500117>
- Ayers, R.U. (1992) Toxic heavy metals, materials cycle optimization. *Proc. Nat. Sci. USA* 89, 815-820.
- Bakhshoodeh, R., Alavi, N., Oldham, C., Santos, R. M., Babaei, A. A., Vymazal, J., & Paydary, P. (2020). Constructed wetlands for landfill leachate treatment: A review. *Ecological Engineering*, 146(May 2019). <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2020.105725>
- Barazani, O., Sathiyamoorthy, P., Manandhar, U., Vulkan, R., & Gola-Goldhirsh, A. (2004). Heavy metal accumulation by *Nicotiana glauca* Graham in a solid waste disposal site. *Chemosphere*, 54, 867-872.
- Caffarel MM, Andradas C, Pe´rez-Go´mez E, Guzman´n M, Sa´nchez C (2012) Cannabinoids: a new hope for breast cancer therapy? *Cancer Treat Rev* 38:911–918
- Citterio, S., Santagostino, A., Fumagalli, P., Prato, N., Ranalli, P., & Sgorbati, S. (2003a). Heavy metal tolerance and accumulation of Cd, Cr and Ni by *Cannabis sativa* L. *Plant and Soil*, 256(2), 243–252. <https://doi.org/10.1023/A:1026113905129>
- Citterio, S., Santagostino, A., Fumagalli, P., Prato, N., Ranalli, P., & Sgorbati, S. (2003b). *Heavy metal tolerance and accumulation of Cd , Cr and Ni by Cannabis sativa L .* (2001), 243–252.
- Citterio, S., Santagostino, A., Fumagalli, P., Prato, N., Ranalli, P., & Sgorbati, S. (2003c). *Heavy metal tolerance and accumulation of Cd , Cr and Ni by Cannabis sativa L . Author ( s ) : Sandra Citterio , Angela Santagostino , Pietro Fumagalli , Nadia Prato , Paolo Ranalli and Sergio Sgorbati Published by : Springer Stable URL : http://www.jstor. 256(2), 243–252.*
- Di, D., Delle, S., Vegetali, P., Suolo, D., Ambiente, E. D., Candito, M. Di, ... Re, L. D. (2020). *Heavy metal tolerance and uptake of Cd , Pb and Tl by hemp*. 18(3), 138–144.
- Galić, M., Perćin, A., Zgorelec, Ž., & Kisić, I. (2019). Evaluation of heavy metals accumulation potential of hemp (*Cannabis sativa* L.). *Journal of Central European Agriculture*, 20(2), 700–711. <https://doi.org/10.5513/JCEA01/20.2.2201>

- Girdhar, M., & Raj, N. (2014). *Comparative assessment for hyperaccumulatory and phytoremediation capability of three wild weeds*. 579–589. <https://doi.org/10.1007/s13205-014-0194-0>
- Gomes, H.I. (2012) Phytoremediation for bioenergy challenges and opprtunities. *Environmental Technology Reviews*, 1(1), 59-66.
- Hoseini, P. S., Poursafa, P., Moattar, F., Amin, M. M., & Rezaei, A. H. (2012). *Ability of phytoremediation for absorption of strontium and cesium from soils using Cannabis sativa*. 1(2), 1–5. <https://doi.org/10.4103/2277-9183.96004>
- Husain, R., Weeden, H., Bogush, D., Deguchi, M., Soliman, M., Potlakayala, S., ... Id, S. R. (2019). *Enhanced tolerance of industrial hemp ( Cannabis sativa L .) plants on abandoned mine land soil leads to overexpression of cannabinoids*. 1–14.
- Jones, D. L., Williamson, K. L., & Owen, A. G. (2006). Phytoremediation of landfill leachate. *Waste Management*, 26(8), 825–837. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2005.06.014>
- Kos, B., Grčman, H., & Leštan, D. (2003). Phytoextraction of lead, zinc and cadmium from soil by selected plants. *Plant Soil Environ*, 49(12), 548–553.
- Kumar, S., Singh, R., Kumar, V., & Rani, A. (2017). *Cannabis sativa: A Plant Suitable for Phytoremediation and Bioenergy Production*. (May 2018). <https://doi.org/10.1007/978-981-10-3084-0>
- Linger, P., Mussig, J., Fischer, H., & Kobert, J. (2002). Industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) growing on heavy metal contaminated soil: fibre quality and phytoremediation potential. *Industr. Crops Protect*, 16, 33–42.
- Linger, P., Ostwald, A., Haensler, J. (2005): *Cannabis sativa* L. growing on heavy metal contaminated soil: growth, cadmium uptake and photosynthesis. *Biol. Plant*, 49, 567–576
- Losfeld, G., de la Blache, P. V., Escande, V., & Grison, C. (2012). Zinc hyperaccumulating plants as renewable resources for the chlorination process of alcohols. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 5(3), 451–456. <https://doi.org/10.1080/17518253.2012.667157>
- Mal Ihotra, R., Agarwal, S., & Gauba, P. (2014). Phytoremediation of Radioactive Metals. *Journal of Civil Engineering and Environmental Technology*, 1(5), 75 – 79.
- Marques, A. P. G. C., Rangel, A. O. S. S., Castro, P. M. L., Marques, A. P. G. C., Rangel, A. O. S. S., & Castro, P. M. L. (2009). *Remediation of Heavy Metal Contaminated Soils : Phytoremediation as a Potentially Promising Clean-Up Technology Remediation of Heavy Metal Contaminated Soils : Phytoremediation as a Potentially Promising Clean-Up Technology* (Vol. 3389). <https://doi.org/10.1080/10643380701798272>
- Mor, S., Kaur, K., & Khaiwal, R. (2013). Growth behaviour studies of bread wheat plant exposed to municipal landfill leachate. *J. Environ. Biol.* 34, 1083–1087.
- Musio, S., Müssig, J., & Amaducci, S. (2018). *Optimizing Hemp Fiber Production for High Performance Composite Applications*. 9(November), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01702>
- Pandey, V.C., Bajpai, O., & Singh, N. (2016). Energy crops in sustainable phytoremediation. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 54, 58–73
- Pietrini, F., Passatore, L., Patti, V., Francocci, F., Giovannozzi, A., & Zacchini, M. (2019). *Morpho-Physiological and Metal Accumulation Responses of Hemp Plants ( Cannabis Sativa L .) Grown on Soil from an Agro-Industrial Contaminated Area*.
- Piluzza, G., Delogu G., Cabras A., Marceddu S and Bullitta S (2013). Differentiation between fiber and drug types of hemp (*Cannabis sativa* L.) from a collection of wild and

- domesticated accessions. *Genet Resour Crop Evol*, 60:2331–2342
- Piotrowska-Cyplik, A., and Czarnecki Z (2003) Phytoextraction of Heavy Metals by Hemp during Anaerobic Sewage Sludge Management in the Non-Industrial Sites. *Polish Journal of Environmental Studies*, 12, (6), 779-784.
- Rosenkranz, T. (2013). Phytoremediation of landfill leachate by irrigation to willow short-rotation coppice. *Master's Thesis. Department of Crop Production Ecology. Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences. University.*
- Shi, G., & Cai, Q. (2009). Cadmium tolerance and accumulation in eight potential energy crops. *Biotechnology Advances*, 27(5), 555–561.  
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.04.006>
- Shi, G., Lui, C., Cui, M., Ma, Y & Cai, Q. (2012). Cadmium Tolerance and Bioaccumulation of 18 Hemp Accessions. *Appl Biochem Biotechnol*, 168, 163–173
- Singh, S., Parihar, P., Singh, R., Singh, V. P., & Prasad, S. M. (2016). Heavy metal tolerance in plants: Role of transcriptomics, proteomics, metabolomics, and ionomics. *Frontiers in Plant Science*, 6(FEB2016), 1–36. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01143>
- Tangahu, B. V., Sheikh Abdullah, S. R., Basri, H., Idris, M., Anuar, N., & Mukhlisin, M. (2011). A review on heavy metals (As, Pb, and Hg) uptake by plants through phytoremediation. *International Journal of Chemical Engineering*, 2011.  
<https://doi.org/10.1155/2011/939161>
- T lustoš, P., Szakova, J., Hrubý, J., Hartman, I., Najmanová, J., Nedělník, J., Pavlíková, D., & Batysta, M. (2006). Removal of As, Cd, Pb, and Zn from contaminated soil by high biomass producing plants. *Plant Soil Environ*, 52(9), 413–423.
- Zielonka, D., Szulc, W., Skowronska, M., Rutkowska, B., Russel, S. (2020). *Hemp-Based Phytoaccumulation of Heavy Metals from Municipal Sewage Hemp - Based Phytoaccumulation of Heavy Metals from Municipal Sewage Sludge and Phosphogypsum Under Field Conditions.* (June).  
<https://doi.org/10.3390/agronomy10060907>
- Vaverková, M. D., Zloch, J., Adamcová, D., Radziemska, M., Vyhnanek, T., Trojan, V., Winkler, J Đorđević, B., Elbl, J., & Brtnický, M. (2017) Landfill Leachate Effects on Germination and Seedling Growth of Hemp Cultivars (*Cannabis Sativa L.*) *Waste Biomass Valor.*
- Yao, P. 2017. Perspectives on technology for landfill leachate treatment. *Arabian Journal of Chemistry*, 10(2), 2567±2574
- Zloch, J., Mendel, P, Adamcova, D., Vyhnanek, T., Trojan, V., Winkler, J., Dordevic, B., Bjelkova, M., Radziemska, M., Brtnicky, M., Vaverkova, M.D. (2017). Use of hemp (*Cannabis sativa L.*) in management of landfill leachate: preliminary analysis and reaction on leachate irrigations.

## KANABIGEROL (CBG) V KONOPLJI (*Cannabis sativa* L.) IN NJEGOVI POZITIVNI UČINKI NA ZDRAVJE

Marjeta ERŽEN<sup>1</sup>, Samo KREFT<sup>2</sup> in Andreja ČERENAK<sup>3</sup>

Pregledni znanstveni članek / review article

Prispelo / received: 25. 10. 2020

Sprejeto / accepted: 28. 11. 2020

### Izvleček

Konoplja je rastlina z več kot 500 različnimi fitokemikalijami. Med najbolj preučevane spadajo kanabinoidi in sicer THC in CBD, vse bolj pogoste pa so tudi raziskave na kanabinoidih CBC in CBG. Kanabinoidi nastajajo po dveh različnih biosinteznih poteh; po poliketidni poti in po plastidni 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfatni poti, ki vodita do nastanka kanabinoida CBG-A. CBG-A je prekurzor za nastanek glavnih kanabinoidov. Leta 1987 so prvič omenili kemotip IV, ki ima višjo vsebnost kanabinoida CBG in nizko vsebnost ostalih kanabinoidov. CBG rastline imajo B<sub>0</sub>B<sub>0</sub> genotip. V kombinaciji z alelom B<sub>D</sub> je B<sub>0</sub> popolnoma recesiven in ga je zato s trenutnimi molekularnimi tehnikami težko zaznati ter težko ločiti kemotip IV od kemotipa III (B<sub>D</sub>B<sub>D</sub> genotip). CBG se lahko veže na različne receptorje v telesu in s tem deluje pozitivno na zdravje ljudi in živali. Ima blago proti gliivično delovanje, antidepresivne učinke, antioksidativne učinke, na osnovnih raziskovalnih modelih deluje proti rakavim celicam, ima pozitivne učinke pri zdravljenju kolitisa pri miših, deluje pri zdravljenju kroničnega vnetja črevesja in ima antibakterijsko delovanje proti določenim sevom meticilin odpornih bakterij *Staphylococcus aureus* MRSA. Je stimulator apetita in inhibira aldoza reduktazo, ki vodi v diabetes. Glede na do sedaj znana dejstva o CBG je v znanosti še veliko prostora za nadaljnje raziskave na tem področju.

**Ključne besede:** kanabigerol, CBG, kemotip, učinki na zdravje, konoplja

## CANNABIGEROL (CBG) IN HEMP (*Cannabis sativa* L.) AND ITS POSITIVE EFFECTS ON HEALTH

### Abstract

Cannabis is a plant with more than 500 different phytochemicals. The most studied components are cannabinoids especially CBD and THC, but also researches on the

<sup>1</sup> Mag., inž. agr., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Cesta Žalskega tabora 2, 3310 Žalec, Slovenija, e-pošta: marjeta.erzen@ihps.si

<sup>2</sup> Prof. dr., Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Aškerčeva cesta 7, 1000 Ljubljana, e-pošta: samo.kreft@ffa.uni-lj.si

<sup>3</sup> Izr. prof., dr., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Cesta Žalskega tabora 2, 3310 Žalec, Slovenija, e-pošta: andreja.cerenak@ihps.si

cannabinoids CBC and CBG are becoming more common. Cannabinoids have two different biosynthetic pathways; polyketide pathway and plastidal 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway which both lead to CBG-A formation, a precursor for the main cannabinoids. In 1987, chemotype IV with high content of CBG and low content of other cannabinoids was first time mentioned. CBG plants have B<sub>0</sub>B<sub>0</sub> genotype. Allele B<sub>0</sub> is in combination with B<sub>D</sub> allele completely recessive and therefore hard to detect with current molecular techniques and also hard to differentiate chemotype IV from chemotype III (B<sub>D</sub>B<sub>D</sub> genotype). CBG can bind with different receptors in body and therefore have positive effects on human and animal health. CBG can have mild antifungal properties, antidepressive and antioxidant effects. It has anticancer properties on basic animal models, beneficial effects on murine colitis in mice, positive effects on inflammatory bowel disease and has antibacterial properties against MRSA. CBG is appetite stimulator and has inhibitory effects on aldose reductase activity which can cause diabetes. According to the known facts about CBG there is still a lot of potential for further research in this field.

**Keywords:** cannabigerol, CBG, chemotype, health effects, hemp

## 1 UVOD

Konoplja (*Cannabis sativa* L.), ki izvira iz Centralne Azije, vsebuje številne spojine, ki imajo terapevtski učinek in pozitivno delujejo na zdravje ljudi in živali (Andre in sod., 2016). Več kot 500 različnih fitokemikalij je bilo do sedaj določenih v konoplji (Namdar in sod., 2018). Poleg kanabinoidov se v konoplji nahajajo še terpenoidi, steroidi, alkaloidi, lignani, flavonoidi. Danes je poznanih več kot 100 različnih kanabinoidov (Namdar in sod., 2018), med katerimi ima samo  $\Delta$ -9-tetrahidrokanabinol (THC) psihoaktivne učinke (DeLong in sod., 2010) in ravno zaradi tega kanabinoida je konoplja dobila status najbolj preganjane rastline. Poleg THC so pomembni še kanabinoidi kanabidiol (CBD), kanabikromen (CBC) in kanabigerol (CBG) (Hillig in Mahlberg, 2004). Kanabinoidi so znani predvsem po svojih pozitivnih učinkih na zdravje kot so zdravljenje epilepsije, Alzheimerjeve bolezni, Parkinsonove bolezni, multiple skleroze, zmanjšujejo bolečino in slabost pri rakavih bolnikih, imajo pozitivne učinke na zdravljenje diabetesa in prehranskih motenj. Poleg naštetega imajo protivnetne, antioksidativne učinke, delujejo protibolečinsko (Namdar in sod., 2018). Kanabinoidi imajo lahko s terpeni oz. spojinami eteričnega olja sinergistične učinke na zdravje (Russo, 2011). Največja vsebnost kanabinoidov je v trihomih, in sicer do 60 %, v neoprašenih ženskih socvetjih do 30 %, v opršenih socvetjih do 13 %, v listih do 0,05 % in v steblih do 0,02 %. V semenih in koreninah se kanabinoidi ne nahajajo (Russo in Marcu, 2017).

Glede na kemijsko sestavo lahko konopljo razdelimo na pet glavnih kemotipov: kemotip I, kjer je vsebnost THC višja od 0,3 %, vsebnost CBD pa nižja od 0,5 %, kemotip II oz. mešani tip, kjer je vsebnost THC in CBD približno enaka, kemotip III; kje je vsebnost CBD višja od 0,3 %, vsebnost THC pa nižja, kemotip IV, pri katerem prevladuje vsebnost CBG in kemotip V, pri katerem vsebnosti kanabinoidov ni mogoče zaznati (Small in Beckstead, 1973; Fournier in sod., 1987).

V preteklosti je bilo največ raziskav namenjenih kanabinoidoma THC in CBD, danes pa se v raziskovanje vedno bolj vključuje tudi kanabinoid CBG, ki je znan po svojih številnih pozitivnih učinkih na zdravje ljudi. Naš namen preglednega članka je povzeti dosedanje raziskave namenjene kanabinoidu CBG, predstaviti biosintezne pot in dedovanje kemotipov.

## 2 BIOSINTEZNA POT IN DEDOVANJE KEMOTIPA PRI CBG

Kanabinoidni prekurzorji nastajajo s kombinacijo dveh biosinteznih poti in sicer preko a) poliketidne poti kjer nastaja olivetolna kislina (OLA) in b) plastidna 2-C-metil-D-eritritol 4 fosfatna (MEP) pot kjer se sintetizira geranil difosfat (GPP). Geranilpirofosfat:olivetolat geraniltransferaza katalizira alkilacijo OLA in GPP, kar vodi do nastanka kanabinoida CBG-A, ki pa je glavni prekurzor za nastanek različnih kanabinoidov.  $\Delta$ -9-tetrahidrokanabinolno kislinska (THC-A) sintaza pretvarja kanabigerolno kislino (CBG-A) v THC-A, kanabidiolno kislinska (CBD-A) sintaza pretvarja CBG-A v CBD-A in kanabikromensko kislinska (CBC-A) sintaza pretvarja CBG-A v CBC-A (Andre in sod., 2016). Kanabinoidi, ki imajo C5 stransko verigo oz. propilno stransko verigo nastanejo kadar GPP kondenzira z divarinsko kislino v kanabigerovarin (CBG-V), ki se s pomočjo treh različnih sintaz pretvarja v kanabidivarin (CBD-V), kanabikormevarin (CBC-V) in v  $\Delta$ -9-tetrahidrokanabivarin (THC-V) (De Meijer in sod., 2009).

Leta 1987 so Fournier in sod. (1987) prvič opisali kemotip IV, pri katerem prevladuje vsebnost CBG (do 94 %), vsebnost THC in CBD pa je nižja od 0,3 %. CBD in THC imata približno enako afiniteto do CBG, medtem ko ima kanabinoid CBC višjo afiniteto (De Meijer in Hammond, 2005).

De Meijer in Hammond (2005) sta preučevala izražanje alelov v različnih populacijah, in sicer eno populacijo s prevladujočim kanabinoidom CBG, eno populacijo s prevladujočim kanabinoidom THC in tri populacije s prevladujočim kanabinoidom CBD. Ugotovila sta, da se preučevani kemotipi razlikujejo glede na lokus B, ki ima dva alela in sicer alel B<sub>D</sub> in alel B<sub>T</sub>, ki določata CBD- in THC-sintazo, ter redkejši alel B<sub>0</sub>, ki določa sintazni encim »z napako« in s tem kopičenje CBG-A. Glede na to predpostavko vsebujejo rastline s prevladujočim CBD kanabinoidom B<sub>D</sub>B<sub>D</sub> genotip in rastline s prevladujočim THC kanabinoidom B<sub>T</sub>B<sub>T</sub>



genotip. Za rastline s prevladujočim CBG kanabinoidom se predvideva  $B_0B_0$  genotip. Križanci med CBG prevladujočo rastlino in CBD prevladujočo rastlino bi v  $F_1$  generaciji imeli potomce genotipa  $B_D B_0$ , medtem ko bi križanci med CBG prevladujočo rastlino in THC prevladujočo rastlino imeli potomce genotipa  $B_T B_0$ . V  $F_1$  generaciji pa se lahko pojavijo tudi rastline s prevladujočim CBD ali THC kanabinoidom, kar bi lahko pojasnili z domnevo, da se alel  $B_0$  v kombinaciji z aleloma  $B_D$  in  $B_T$  izraža recesivno zaradi sintaze z napako, ki jo kodira ta alel. Ugotovila sta tudi, da se v  $F_2$  generaciji pri rastlinah s prevladujočim  $B_0$  genotipom lahko pojavi do 15 % kanabinoida CBD, kar kaže na to, da ima sintaza z napako, ki kodira  $B_0B_0$  alel v majhnih količinah sposobnost pretvarjanja CBG v CBD. Prav tako so v  $F_2$  generaciji pri križancih med CBG in CBD/THC maternimi rastlinami vse ostale rastline, ki nimajo  $B_0B_0$  genotipa, CBD/THC prevladujoče. S tem se lahko potrdi, da imajo CBG prevladujoče rastline na lokusu B prisoten homozigoten alel  $B_0$ . V kombinaciji z alelom  $B_D$  je alel  $B_0$  v celoti recesiven. Glede na to, da se lahko CBG v manjših količinah pretvarja v CBD predpostavljata, da je alel  $B_0$  mutirana oblika  $B_D$  alela.

## 2.1 Določanje kemotipa IV s pomočjo markerjev

Molekulske markerje uporabljamo za določanje genetskih variabilnosti na nivoju DNA, in sicer na osnovi polimorfizmov nukleinskih kislin. Z genetskimi markerji lahko zagotovimo obširne podatke, ki se lahko uporabijo pri določanju in izboljšavi genetskega materiala ter pri nadaljnjem žlahtnjenju. Pri konoplji se markerji uporabljajo predvsem zaradi določanja genetskih raznolikosti, izvora genetskega materiala, določanja in razvrščanja različnih sort, sestavljanja genetskih kart, določanja spola in določanja kemotipov (Hesami in sod., 2020).

Pacifico in sod. (2006) so preučevali 12 različnih sort in akcesij konoplje različnega izvora. S pomočjo plinsko kromatografskih (GC) analiz so določili vsebnost kanabinoidov ter s pomočjo SCAR markerjev B190/B200 in B1080/B1192 določili njihovo povezavo s kemotipom. Na podlagi GC analiz so kemotip IV določili pri dveh akcesijah in sicer pri 5 od 9 rastlin sorte Barnabeo in pri vseh preučevanih rastlinah  $F_1$  generacije sorte Barnabeo. Ko so določili kemotipe z markerji, se kemotipa IV in V na genetskem nivoju nista razlikovala od kemotipa III. Predpostavljajo, da je pri vseh rastlinah kemotipa IV prišlo do obratnega razmerja med CBG in CBD. Pri križancih z visoko vsebnostjo CBG so takšna opažanja podali tudi drugi avtorji (De Meijer in sod., 2009). Zaradi prej omenjenih ugotovitev, da je alel  $B_0$  mutirana oblika  $B_D$  alela, na podlagi markerjev, ki so jih uporabili v raziskavi (Pacifico in sod., 2006) niso bili uspešni pri razlikovanju med obema kemotipoma.

Onofri in sod. (2015) so preučevali heterogenost CBD-A sintaze in THC-A sintaze. Tudi oni so ugotovili, da se CBG(A) kemotip pojavi zaradi minimalne

funkcionalnosti CBD-A in THC-A sintaze in tako prihaja do sprememb na proteinskem nivoju, kar onespособijo delovanje omenjenih sintaz in akumulacijo CBD(A), kar so dokazali s SNP analizo.

### 3 CBG IN UČINKI NA ZDRAVJE

CBG je bil izoliran leta 1964 (Russo, 2011, Gaoni in Mechoulam, 1964). V konoplji ga ponavadi najdemo pri nižji koncentraciji, z novimi žlahtniteljskimi tehnikami pa lahko določeni kemotipi dosežejo tudi do 100 % zastopanost med kanabinoidi (De Meijer in Hammond, 2005).

Ljudje imamo v telesu endokanabinoidni sistem, kjer so prisotni endokanabinoidi (tako kot v konoplji kanabinoidi) poleg tega pa so prisotni tudi kanabinoidni receptorji, na katere se kanabinoidi vežejo. Najbolj znana receptorja sta CB1 in CB2 (Bíró et al. 2009). CBG ima relativno šibko afiniteto do glavnih dveh receptorjev, se pa lažje veže na receptorje kot so TRPV1, TRPV2, TRPA1, TRPV3, TRPV4 in  $\alpha$ 2-adrenoceptor. Ti receptorji so pomembni pri uravnavanju bolečine, vnetja, in zaznavanju toplote (De Petrocellis in sod., 2011). CBG je potencialen antagonist receptorja TRPM8, ki uravnava bolečine v mehurju in deluje pri raku prostate (De Petrocellis in Di Marzo, 2010).

CBG deluje blago proti glivično in ima antidepresivne učinke. Ligresti in sod., (2006) so dokazali, da CBG deluje proti raku pri osnovnih raziskovalnih modelih, še posebej pri raku dojk, kar so dokazali na miših. Andre in sod. (2016) pa navajajo pozitivne učinke na kolitis pri miših. Borrelli in sod. (2013) so ugotovili pozitivne učinke zdravljenja s CBG pri kroničnem vnetju črevesja, CBG namreč zmanjšuje razmerje med dolžino in težo črevesja, ki je indikator odziva na vnetje. Dokazali so, da pri 30 mg/kg CBG zmanjšuje poškodbe na črevesju. Preučevali so tudi možne antioksidativne učinke CBG na črevesno sluznico, kjer zmanjšuje oksidativni stres. CBG ima pomembno vlogo tudi kot antibakterijsko sredstvo proti določenim sevom MRSA kot sta EMRSA-15 in EMRSA-16 (Appendino in sod., 2008).

Leta 2016 so Brierley in sod. (2016) preiskovali učinek CBG na vnos hrane in hranjenje pri podganah. CBG se je pri testu izkazal kot stimulator apetita pri odmerku 120-140 mg/kg. Ta odmerek je sicer nepredstavljivo visok, saj bi to pomenilo vsaj 10 g čistega CBG za 70 kg težko osebo. Predhodna raziskava je pokazala, da pri 4 urnem testu odmerek CBG pri 0,176-17,60 mg/telesno maso ni imel bistvenega učinka na prehranjevalni vzorec podgan (Farrimond in sod., 2012). Hiperfagija (zauživanje večje količine hrane, kot je potrebno) povzročena z vnosom CBG je rezultat antagonističnega učinka CBG z receptorjem  $\alpha$ 2-adrenoceptor (Brierley in sod., 2016). Te ugotovitve so pomembne za nadaljnje

raziskave v zvezi z zdravljenjem raka in pri kemoterapijah za spodbujanje apetita pri pacientih.

Aldoza reduktaza povzroča medcelično akumulacijo sorbitola in povečuje nivo glukoze v krvi kar vodi v diabetes. Smeriglio in sod. (2018) so preučevali inhibicijo aldoza reduktaze s kanabinoidoma CBG in CBD, ki sta pokazala statistično značilno inhibicijo. Inhibicijo pa sta prav tako pokazala tudi kanabinoida CBG-A in CBD-A. S to raziskavo in s pomočjo teh kanabinoidov bi lahko preprečili oz. zdravili diabetes in z njim povezane bolezni.

V raziskavi leta 2007 sta Wilkinson in Williamson (2007) dokazala anti-proliferativni učinek (zaviranje rasti določenih celic) kanabinoida CBG, namreč v raziskavi je CBG poleg kanabinoidov  $\Delta$ -9-THC, CBD in CBN inhibiral proliferacijo keratinocitov kar lahko pomembno vpliva na zdravljenje luskavice.

#### 4 ZAKLJUČEK

Poleg raziskovanja in pozitivnih učinkov kanabinoidov CBD in THC postajajo študije na področju pozitivnih učinkov CBG na zdravje vse bolj v porastu. Tako kot ostali kanabinoidi razen THC, CBG nima psihoaktivnih učinkov in je zato še bolj primeren za uporabo v zdravstvene namene in za uporabo v kliničnih raziskavah na ljudeh, saj je bilo do sedaj večina raziskav narejenih na živalih. Glede na dokaj nizko vsebnost tega kanabinoida v rastlinah, razen pri kemotipu IV, obstaja velik potencial na področju žlahtnjenja rastlin konoplje za višjo vsebnost CBG. Prav tako se velik potencial kaže tudi pri raziskavah na genetskem nivoju, saj sta glede na literaturo na tem področju kar se kanabinoidov tiče podrobneje preučevani samo CBD-A in THC-A sintaza.

#### 5 REFERENCE

- Andre C. M., Hausman J. F., Guerriero G. Cannabis sativa: The plant of the thousand and one molecules. *Frontiers in Plant Science*. 2016; 7: 1–17.
- Appendino G., Gibbson S., Giana A., Pagani A., Grassi G., Stavri M., Rahman M. M. Antibacterial cannabinoids from Cannabis sativa: A structure-activity study. *Journal of Natural Products*. 2008; 71: 1427–1430.
- Bíró T., Tóth B. I., Haskó G., Paus R., Pacher P. The endocannabinoid system of the skin in health and disease: novel perspectives and therapeutic opportunities. *Trends in Pharmacological Science*. 2009; 30: 411–420.
- Borrelli F., Fasolino I., Romano B., Capasso R., Maiello F., Coppola D., Orlando P., Battista G., Pagano E., Di Marzo V., Izzo A. A. Beneficial effect of the non-psychoactive plant cannabinoid cannabigerol on experimental inflammatory bowel disease. *Biochemical Pharmacology*. 2013; 85: 1306–1316.

- Brierley D. I., Samuels J., Duncan M., Whalley B. J., Williams C. M. Cannabigerol is a novel, well-tolerated appetite stimulant in pre-satiated rats. *Psychopharmacology*. 2016; 233: 3603–3613.
- De Meijer E. P. M. in Hammond K. M. The inheritance of chemical phenotype in *Cannabis sativa* L. (II): Cannabigerol predominant plants. *Euphytica*. 2005; 145: 189–198.
- De Meijer E. P. M., Hammond K. M., Micheler M. The inheritance of chemical phenotype in *Cannabis sativa* L. (III): Variation in cannabichromene proportion. *Euphytica*. 2009; 165: 293–311.
- De Petrocellis L. in Di Marzo, V. Non-CB1, Non-CB2 Receptors for Endocannabinoids, Plant Cannabinoids, and Synthetic Cannabimimetics: Focus on G-protein-coupled Receptors and Transient Receptor Potential Channels. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. 2010; 5: 103–121.
- De Petrocellis L., Ligresti A., Moriello A. S., Allara M., Bisogno T., Petrosino S., Stott C. G. Di Marzo V. Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched *Cannabis* extracts on TRP channels and endocannabinoid metabolic enzymes. *British Journal of Pharmacology*. 2011; 163: 1479–1494.
- DeLong G. T., Wolf C. E., Poklis A., Lichtman A. H. Pharmacological evaluation of the natural constituent of *Cannabis sativa*, cannabichromene and its modulation by  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol. *Drug and Alcohol Dependence*. 2010; 112: 126–133.
- Farrimond J. A., Whalley B. J., Williams C. M. Cannabinol and cannabidiol exert opposing effects on rat feeding patterns. *Psychopharmacology*. 2012; 223: 117–129.
- Fournier G., Richez-Dumanois C., Duvezin J., Mathieu J. P., Paris M. Identification of a new chemotype in *Cannabis sativa*: Cannabigerol-dominant plants, biogenetic and agronomic prospects. *Planta Medica*. 1987; 53: 277–280.
- Hesami M., Pepe M., Alizadeh M. Recent advances in cannabis biotechnology. *Industrial Crops and Products*. 2020; 158: 113026.
- Hillig K. W. in Mahlberg P. G. A chemotaxonomic analysis of cannabinoid variation in *Cannabis* (Cannabaceae). *American Journal of Botany*. 2004; 91: 966–975.
- Ligresti A., Moriello A. S., Starowicz K., Matias I., Pisanti S., De Petrocellis L., Laezza C., Portella G., Bifulco M., Di Marzo V. Antitumor activity of plant cannabinoids with emphasis on the effect of cannabidiol on human breast carcinoma. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutic*. 2006; 318: 1375–1387.
- Namdar D., Mazuz M., Ion A., Koltai H. Variation in the compositions of cannabinoid and terpenoids in *Cannabis sativa* derived from inflorescence position along the stem and extraction methods. *Industrial Crops and Products*. 2018; 113: 376–382.
- Onofri C., De Meijer E. P. M., Mandolino G. Sequence heterogeneity of cannabidiolic- and tetrahydrocannabinolic acid-synthase in *Cannabis sativa* L. and its relationship with chemical phenotype. *Phytochemistry*. 2015; 116: 57–68.
- Pacifico D., Miselli F., Micheler M., Carboni A., Ranalli P., Mandolino G. Genetics and marker-assisted selection of the chemotype in *Cannabis sativa* L. *Molecular Breeding*. 2006; 17: 257–268.
- Russo E. B. in Marcu J. Cannabis Pharmacology: The Usual Suspects and a Few Promising Leads. *Advances in Pharmacology*. 2017; 80: 67-134.
- Russo E. B. Taming THC: Potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *British Journal of Pharmacology*. 2011; 163: 1344–1364.
- Small E. in Beckstead H. D. Common cannabinoid phenotypes in 350 stocks of *Cannabis*. *Lloydia*. 1973; 36: 144–165.

Smeriglio A., Giofre S. V., Galati E. M., Monoforte M. T., Cicero N., D'Angelo V., Grassi G., Circosta C. Inhibition of aldose reductase activity by *Cannabis sativa* chemotypes extracts with high content of cannabidiol or cannabigerol. *Fitoterapia*. 2018; 127: 101–108.

Wilkinson J. D. in Williamson E. M. Cannabinoids inhibit human keratinocyte proliferation through a non-CB1/CB2 mechanism and have a potential therapeutic value in the treatment of psoriasis. *Journal of Dermatological Science*. 2007; 45: 87–92.

**VPLIV LOKACIJE PRIDELOVANJA NAVADNEGA OŽEPKA  
(*Hyssopus officinalis* L.) NA PRIDELEK IN VSEBNOST  
ETERIČNEGA OLJA**

Nataša FERANT<sup>1</sup> in Barbara ČEH<sup>2</sup>

Strokovni članek / professional article

Prispelo / received: 21. 10. 2020

Sprejeto / accepted: 3. 12. 2020

**Izvleček**

V triletnem poskusu smo proučevali pridelek in vsebnost eteričnega olja pri navadnem ožepku (*Hyssopus officinalis* L.) na treh lokacijah v Sloveniji. Dve sta bili nižinski z različnimi karakteristikami, ena višinska. Pridelek je bil v vseh treh letih največji na nižinski lokaciji Žalec, kjer je tehnologija pridelave vključevala tudi namakanje. V triletnih nasadih smo lahko izvedli dve žetvi. Največji pridelek je v tretjem letu dosegla lokacija Žalec s pridelkom obeh žetev skupaj 130 kg/100 m<sup>2</sup> suhe snovi. Poskus je pokazal, da je nasad ožepka potrebno v poletni suši, vsaj po prvi žetvi, namakati, ne glede na to, ali gre za pridelavo na foliji ali ne, sicer rastline zastanejo v rasti. Na nižinski lokaciji Vrhnika je bil pridelek prve žetve v tretjem letu namreč bistveno večji kot na lokaciji Žalec (114 kg/100 m<sup>2</sup> v primerjavi s 56 kg/100 m<sup>2</sup>), po prvi žetvi pa je rast zastala, saj se nasad ni namakal, poletje 2017 pa je bilo zelo sušno in vroče. Pridelek druge žetve je bil posledično zelo majhen (4 kg/100 m<sup>2</sup>; torej v praksi žetev ne bi bila smiselna). Vsebnost eteričnega olja se je med lokacijami in leti pridelovanja razlikovala, a je bila na vseh obravnavanih lokacijah nad mejno vrednostjo.

**Ključne besede:** ožepak, *Hyssopus officinalis* L., lokacija pridelave, pridelek, eterično olje

**THE IMPACT OF PRODUCTION LOCATION ON HYSSOP (*Hyssopus officinalis* L.) YIELD AND ESSENTIAL OIL CONTENT**

**Abstract**

In a three-year field experiment, the yield and essential oil content of hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) at three locations in Slovenia were studied. Two locations were in lowland with different characteristics, one in highland. The yield was the highest in all three years at the Žalec lowland location, where the production technology included irrigation. There were two harvests in three-year plantations.

<sup>1</sup> Mag., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Cesta Žalskega tabora 2, 3310 Žalec, e-pošta: natasa.ferant@ihps.si

<sup>2</sup> Dr., isti naslov, e-pošta: barbara.ceph@ihps.si

The highest yield in the third year was achieved by the Žalec location with the yield of 130 kg/100 m<sup>2</sup> of dry matter (both harvests together). The experiment showed that the plantation of hyssop needs to be irrigated in the summer drought, at least after the first harvest, regardless of whether it is grown on foil or not, otherwise the plants stagnate in growing. At the lowland location of Vrhnika, the yield of the first harvest in the third year was significantly higher than at the location of Žalec (114 kg/100 m<sup>2</sup> compared to 56 kg/100 m<sup>2</sup>), but after the first harvest the plant growth was stagnated. This plantation was not irrigated, while the summer of 2017 was very dry and hot, namely. The yield of the second harvest was consequently very low (4 kg/100 m<sup>2</sup>; therefore in practice the harvest would not make sense). The content of essential oil varied between locations and years of production, but it was above the limit value at all locations.

**Key words:** hyssop, *Hyssopus officinalis* L., production location, yield, essential oil

## 1 UVOD

Pridelava zelišč je zaradi različnih naravnih danosti (raznolike vremenske razmere in različni tipi tal) lahko zelo pestra (različne vrste, ki imajo različne rastne zahteve) in tudi tržno zanimiva. Ker so naravni viri omejeni in ker nabiranje zelišč v naravi negativno vpliva na biodiverzitetu, je poleg tega tudi nujno potrebno pridelovanje zelišč (MKGP, 2016). Perspektivna je kot osnovna in kot dopolnilna kmetijska dejavnost. Predvsem zanimiva je trenutno pri nas ročna pridelava na kmetijah, kjer so površine manj primerne za pridelovanje osnovne hrane, npr. kmetije v hribovitih predelih in na vodovarstvenih območjih, so pa tudi težnje po pridelavi na večjih površinah, kot so tudi drugod po svetu (MKGP, 2016). Podatek površin, kjer se v svetu pridelujejo zelišča je težko pridobiti. Evropa je uvozila 533 tisoč ton zelišč v letu 2014 in jih izvozila 289 tisoč ton (MKGP, 2016). V Sloveniji je v letu 2019 pridelava potekala na 149,9 ha (SURSA). Pridelava se v zadnjih desetih letih zelo povečuje (SURSA). V Sloveniji večji odkup v Sloveniji pridelanih zelišč surovine žal še ni zaživel (MKGP, 2016).

Glede na različne habitate v Sloveniji je potrebno pridelavo tržno zanimivih zelišč preizkusiti na več različnih lokacijah, s čimer je omogočeno pridobivanje podatkov za zainteresirane pridelovalce - kje je pridelava mogoča in priporočljiva in na kakšen način. V zadnjem obdobju smo priča klimatskim spremembam in s tem tudi spremenjenim razmeram za pridelavo. Zelišča vključujejo tudi vrste, ki uspevajo v bolj sušnih razmerah. Smiselno jih je preizkusiti na drugačnih lokacijah, kot so zanje značilne.

Ožepok je do 50 cm visok trajen polgrmiček iz družine ustnatic (*Lamiaceae*). Ima dobro razvit in globok koreninski del iz katerega izraščajo poganjki, ki v drugem

letu olesenijo. Porasli so z majhnimi suličastimi listi, ki so pri dnu zaokroženi, pri vrhu pa nekoliko zavihani. Na obeh straneh listov so žleze, ki dajo rastlini značilen, močan vonj. V zgornjem delu stebela se v zalistju pojavijo cvetovi, ki so vedno nameščeni na eni strani stebela in so v skupinah po 3-7. Cvetovi so temnomodre do vijoličaste barve. Cveti od julija do avgusta. Seme dozori septembra, je drobno in jajčaste oblike. Ožepok je rastlina toplih in sončnih krajev, zato mu izberemo sončno, prisojno lego z dovolj svetlobe in toplote. Lega mora biti zaščitena proti vetru. Glede tal nima posebnih zahtev. Dobro uspeva tudi na najbolj siromašnih tleh, kar mu omogoča dobro razvit koreninski sistem, ki prodira globoko v zemljo. Če ga gojimo, lahko ostane na istem mestu 8-10 let. V ljudskem zdravilstvu, fitoterapiji in za začinjanje hrane (posušen uporabni del zdravilne rastline) se uporablja zel cvetoče rastline (Herba Hyssopi). Žetev opravimo, ko začnejo rastline cveteti, ker je takrat v rastlini največ eteričnega olja. Rastline porežemo 5–10 cm nad zemljo oz. nad olesenelim delom stebela in jih posušimo v sušilnici (Rode, 2018; Wagner, 1997; Baričević D., 1996; Martinčič A., Sušnik F., 1984).

Ožepok učinkuje kot sredstvo za izkašljevanje (ekspektorant) pri prehladnih obolenjih in kot stimulans krvnega obtoka. V obliki čajev se uporablja sam ali v kombinaciji z drugimi rastlinami. Uporablja se tudi za pridobivanje eteričnih olj in v kozmetiki za izdelavo raznih parfumov. V kulinariki se uporablja kot začimba tako v mesnih, kot zelenjavnih jedeh. Ožepok pa je tudi medonosna rastlina in odlična paša za čebele (Wagner, 1997). V Sloveniji se prideluje na manjših površinah, v glavnem v kombinaciji z drugimi zelišči (MKGP, 2016).

Namen prispevka je predstaviti vpliv lokacije pridelave ožepka na pridelek, dovzetnost za bolezni in škodljivce ter vsebnost eteričnega olja.

## 2 MATERIAL IN METODE

Potreben sadilni material za poskuse (sadike ožepka) smo vzgojili iz semen rastlin (poreklo iz Češke), ki jih gojimo v Vrtni zdravilnih in aromatičnih rastlin na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS). Sadike smo vzgojili v rastlinjaku na IHPS v skladu s smernicami ekološke pridelave od jeseni 2015 do spomladi 2016. Ožepok smo preizkušali v različnih pridelovalnih razmerah – izbrali smo različne lokacije glede na pridelovalne razmere in nadmorsko višino: Žalec, Vrhnika in Idrijske Krnice oziroma Logarska dolina (preglednica 1).

Sajenje na prosto je potekalo v začetku junija 2015. Na vsako lokacijo smo posadili 50 rastlin. Razdalje sajenja so prikazane v preglednici 1. V letu 2016 smo morali spremeniti lokacijo višinske lege zaradi odpovedi v Idrijskih Krnicah. Izbrali smo lokacijo v Logarski dolini. Poskus smo zasadili konec junija 2016, ker prej ni bilo mogoče zaradi neugodnih vremenskih razmer (obilne padavine). Lastniki so poskusne nasade ustrezno oskrbovali (okopavanje, pletje, namakanje, zatiranje



polžev) in sicer v skladu z navodili IHPS in v skladu s smernicami ekološke pridelave.

**Preglednica 1: Opis poskusnih lokacij ožepka v letih 2015–2017**

	Žalec	Vrhnika	Idrijske Krnice*	Logarska dolina**
Nadmorska višina	250 m (nižinska lokacija)	320 m (nižinska lokacija, nagnjen teren, tla prekrita s folijo)	921 m (višinska lokacija)	750 m (višinska lokacija)
Tla	Srednje težka	Srednje težka	Srednje težka	Srednje težka
Sajenje poskusa	Junij 2015	Junij 2015	Junij 2015	Junij 2016
Druge posebnosti	Namakanje po potrebi	Pridelava na črni pleteni foliji, brez namakanja	Sončna vrtača nad Idrijo, ravninska lega, brez namakanja	Namakanje po potrebi
Razdalja v vrsti	20	15	60	20
Medvrstna razdalja	30	40	60	30
Žetev v letu 2015	22. september	22. september	9. september	-
Žetev v letu 2016	17. avgust	8. avgust	-	23. september
Žetev v letu 2017	20. julij in 19. september	28. julij in 21. september	-	28. julij in 21. september

\*leto 2015, \*\* leto 2016 in 2017.

Velika temperaturna nihanja spomladi 2015 ter pogosta in dolgotrajna vročina s sušo v poletnih mesecih julij – avgust so slabo vplivali na rast in razvoj rastlin v tem letu. V letu 2016 so bila v aprilu in maju velika temperaturna nihanja. Prvi dve dekadi aprila sta bili ekstremno topli, padavin je bilo relativno malo; začetek vegetacije kmetijskih rastlin je bil zgoden. Potem je sledila močna ohladitev; jutranje temperature so se na posameznih lokacijah 26. aprila spustile pod - 3 °C in povzročile pozebo. Dobra razporeditev padavin in zmerne temperature v juliju in v prvi polovici avgusta so ugodno vplivale na rast in razvoj. Prva polovica septembra je bila nadpovprečno topla in suha. Pomanjkanje padavin smo v letu 2017 zabeležili že v zimskih mesecih, ki se je nato tekom vegetacije samo še stopnjevalo. Posledice suše so konec druge dekade junija že ogrožale rast in razvoj kmetijskih rastlin. Vročinski valovi in pomanjkanje padavin tudi v poletnih mesecih so zelo slabo vplivali na rast in razvoj rastlin (ARSO, 2020).

V letu 2015 smo na lokaciji Žalec namakali 2-krat v sezoni, na ostalih dveh lokacijah namakanje ni bilo vključeno. Zaradi dovolj in enakomerno razporejenih padavin v letu 2016 ni bilo potrebno namakanje na lokacijah Žalec in Vrhnika. Na lokaciji Logarska dolina smo namakali trikrat od 1. do 7. julija 2016, ker je bilo obdobje visokih temperatur in bi lahko prvo letne mlade rastline propadle. V letu 2017 smo poskusni nasad na lokaciji Žalec zaradi pomanjkanja padavin namakali 27. 5. Na lokaciji Vrhnika se ni namakalo. V Logarski dolini namakanje ni bilo potrebno, ker je bilo dovolj vlage v tleh.

Tekom rastne dobe smo opazovali rast in razvoj, dovzetnost za boleznin in škodljivcev ter beležili število propadlih rastlin. Pridelek smo vrednotili v času tehnološke zrelosti. V letu 2015 smo izvedli eno žetev, in sicer v septembru, ker so bili nasadi prvoletni. V letu 2016 smo izvedli žetev v avgustu, v letu 2017 pa v juliju in septembru (preglednica 1). V času žetve smo poželi vse rastline na parceli in stekali pridelek sveže mase ter prešteli število rastlin vsakega obravnavanja. Določili smo pridelek sveže mase, vsebnost vlage v pridelku ter na tej podlagi pridelek suhe snovi na enoto površine in na rastlino ter vsebnost eteričnega olja. Kakovost pridelane droge smo primerjali z British Herbal Pharmacopeia 1983 (BHP 83) in Deutsches Arzneikodex (DAC) z dopolnili (EB 6).

### 3 REZULTATI Z RAZPRAVO

V letu 2015 so se prvoletne rastline na vseh poskusnih lokacijah v večini dobro vrastle in so se kljub sušnim obdobjem normalno razvijale, vendar jih je na lokaciji Žalec kljub namakanju propadlo kar 10 in v Idrijskih Krnicah 7 (preglednica 2). Menimo, da se je to zgodilo zaradi slabše kakovosti sadik. Površine so bile delno zapleveljene, kar pa po naši oceni ni imelo negativnega vpliva na rast in razvoj. V letu 2015 nismo zasledili prisotnosti boleznin in škodljivcev na nobeni lokaciji. Vse manjkajoče rastline smo sicer vsako naslednjo pomlad na vseh lokacijah dosadili.

**Preglednica 2:** Število propadlih rastlin v letih 2015 do 2017 na poskusnih lokacijah z ožepkom

Zdravilno zelišče	Lokacija	Število propadlih rastlin			Skupaj v 3 letih
		2015	2016	2017	
Ožepok	Žalec	10	5	6	21
	Vrhnika	3	10	8	21
	Idrijske Krnice	7	-	-	15
	Logarska dolina	-	3	5	

V letu 2016 so rastline dobro uspevale, bile so izenačene in v dobri kondiciji. Na lokacijah Žalec in Vrhnika, kjer so bili drugoletni poskusni nasadi, namakanje

zaradi dokaj ugodno razporejenih padavin preko vegetacije, glede na dolgoletne izkušnje pri pridelavi zelišč, ni bilo potrebno. Na lokaciji Logarska dolina, kjer smo poskus zasnovali šele 30. junija v letu 2016, so se rastline kljub temu dobro vrastle in jih ni veliko propadlo (preglednica 2). Od 1. do 7. julija 2016 smo ta poskusni nasad dvakrat namakali, ker je bilo obdobje visokih temperatur ter suše in bi lahko mlade prvoletne rastline sicer propadle. Površina je bila nekoliko zapleveljena. Prisotnosti bolezni in škodljivcev v letu 2016 nismo zasledili, razen napada pršic na lokaciji Vrhnika, a le v manjšem obsegu. V letu 2016 je propadlo največ rastlin na lokaciji Vrhnika (10 rastlin). Predvidevamo, da se je to zgodilo zaradi spomladanskih obilnejših padavin na tej lokaciji, ki je obenem bila še na nagnjeni površini in je imela tla prekrita s folijo, pod katero je zatekalo obilno deževje.

Po naših predvidevanjih bi morala biti v letu 2016 konec septembra še druga žetev ožepka, vendar rastline po prvi žetvi na lokacijah Žalec in Vrhnika niso dovolj zrastle. Zato smo na lokaciji Vrhnika vzeli vzorec tal, da bi ugotovili, če je morda težava v preskrbljenosti tal s hranili in bi to bil lahko eden od vzrokov za ta zastoj. Ugotovili smo, da so tla ustrezno preskrbljena s fosforjem, borom in organsko snovjo, prekomerno pa preskrbljena s kalijem in magnezijem (preglednica 3). Vsebnost organske snovi v tleh je bila dobra, pH pa tudi ustrezen za pridelavo kmetijskih rastlin. Torej tla glede na določene parametre niso bila vzrok za zastoj rastlin v rasti. Predvidevamo, da je mlade požete rastline požgalo sonce, saj so na spodnjem delu rastlin takoj po žetvi propadli listi, kasnejši listi v zgornjem delu rastline pa so se normalno razvijali. Posebej bi bilo v nadalje potrebno upoštevati, da se žanje takrat, ko je za naslednje dni napovedano oblačno in ne prevroče vreme. Morda bi bilo celo dobro, da se požeta površina po žetvi za nekaj dni pokrije s kopreno, ki bi varovala rastline pred sončnimi ožigi.

V letu 2017 je največ rastlin propadlo na lokaciji Vrhnika (8 rastlin), predvidoma zaradi dolgotrajne zimske suše, ki se je še bolj izrazila na nagnjenem terenu, obenem se ta lokacija ni namakala.

**Preglednica 3:** Rezultati kemijske analize tal na poskusni lokaciji v Vrhnika poleti 2016

Vpisna št.	Glob. (cm)	Oznaka vzorca	pH v KCl	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> * (mg/100 g tal)	K <sub>2</sub> O* (mg/100 g tal)	Mg* (mg/100 g tal)	B* (mg/kg)	Organska snov (%)
375/16	0-25	Vrhnika	5,9	16,3 C	31,3 D	26,9 D	0,423 C	3,7

Legenda: Glob. = globina odvzema vzorca, pH = reakcija tal (kislost tal), KCl = kalijev klorid, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> = fosfat, K<sub>2</sub>O = kalij, Mg = magnezij, B = bor

\*Črke ob številčnih vrednostih označujejo stopnjo preskrbljenosti tal z določenim hranilom:

A: siromašna tla, B: srednje preskrbljena tla, C: dobro preskrbljena tla, D: pretirano preskrbljena tla, E: ekstremno preskrbljena tla

V letu 2017 smo na vseh lokacijah že lahko izvedli dve žetvi: v juliju in septembru. Posledice zastoja rasti iz leta 2016 niso bile opazne. Na nobeni lokaciji na rastlinah nismo zasledili prisotnosti bolezni in škodljivcev. Pri prvi žetvi je bil ožepok v fazi cvetenja in visok od 50–70 cm. Za drugo žetev smo se na vseh treh lokacijah odločili za žetev še preden je ožepok cvetel, in sicer zaradi slabe dolgoročne vremenske napovedi (nizke temperature, deževno vreme). Na lokacij Žalec so bili grmi ožepka v času žetve že bujni in so že imeli cvetni nastavek. Na ostalih dveh lokacijah, Vrhnika in Logarska dolina, pa so bili grmi še v vegetativni fazi in posledično tudi niso tvorili toliko pridelka kot na lokaciji Žalec. Na Vrhniki nasada poleti niso namakali, v Logarski dolini pa je na počasno rast predvidoma vplivala višja nadmorska višina. Pridelke in rezultati kemičnih analiz (odstotek vlage in količina eteričnega olja) za vse lokacije in vsa tri preučevana leta s primerjavo zahtev po BHP 83 in DAC 2 z dopolnili (EB 6) so prikazani v preglednici 4.

**Preglednica 4: Pridelke ožepka in rezultati kemičnih analiz v letih 2015 do 2017**

Leto	Lokacija	Vlaga %	Et. olje (ml/100 g suhe snovi)	Pridelke suhe snovi (kg/100 m <sup>2</sup> )
2015	Žalec	10,5	0,61	10,3
	Vrhnika	10,3	1,04	7,8
	Idrijske Krnice	9,4	0,84	8,7
2016	Žalec	10,1	1,72	27,5
	Vrhnika	8,1	1,77	8,3
	Logarska dolina	9,4	1,31	11,6
2017	Žalec:			
	1. žetev	11,0	2,98	56,0
	2. žetev	10,9	1,75	74,0
	Vrhnika:			
	1. žetev	9,3	1,64	114,0
	2. žetev	9,9	0,80	4,0
Logarska dolina:				
1. žetev	11,6	3,52	66,0	
2. žetev	10,7	1,79	4,0	
BHP*		≤12*	Min 0,25 % *	

\* Mejna vrednost po British Herbal Pharmacopeia 1983 (BHP 83) in Deutsches Arzneikodex (DAC) z dopolnili (EB 6)

Prvoletni pridelek je bil najvišji na lokaciji Žalec, manjši pa na Vrhniki in na višinski lokaciji Idrijske Krnice, kjer je bil med seboj primerljiv. V drugem letu je bil pridelek spet večji v Žalcu v primerjavi z Vrhniko. Razlika med lokacijama ja bila 15,9 kg/100 m<sup>2</sup>, kar ne govori v prid gojenju brez namakanja, četudi je vključena folija. V letu 2017 je bila prva žetev v Vrhniki obilna, pridelek druge

žetve pa zelo majhen. Za poskus smo žetev izvedli in jo ovrednotili, v praksi bi bilo bolj miselno le-to opustiti zaradi morebitnega negativnega vpliva na rastline. Ravno tako na lokaciji Logarska dolina. To je bila posledica zastoja rasti rastlin po 1. žetvi zaradi visokih temperatur in manjka padavin preko poletja. Literatura navaja zelo različno količino pridelka, in sicer od 5–32 t/ha svežega pridelka in 0,67–3,26 t/ha suhega pridelka oz. suhih listov letno, odvisno od sorte (Jankovsky, 2002). Sicer je bil pridelek v poskusu dober pri prvih žetvah na vseh lokacijah, v Žalcu pa tudi pri drugi žetvi v tretjem letu.

Vsebnost eteričnega olja je bila v vseh letih na vseh lokacijah višja od mejne vrednosti, ki jo za opredelitev kakovostnega rastlinskega materiala določa BHP 83 (British Herbal Pharmacopeia 1983). V letu 2017 je bila pri prvi žetvi bistveno višja kot pri drugi žetvi, kar pa je posledica tega, da v času druge žetve rastline še niso bile v fazi polnega cvetenja. Najvišja vsebnost eteričnega olja v letu 2017 je bila v Logarski dolini pri obeh žetvah, sledi Žalec, najnižja vsebnost eteričnega olja pa je bila na Vrhniki. Po British Herbal Pharmacopeia 1983 (BHP 83) in Deutsches Arzneikodex (DAC) z dopolnili (EB 6) je za ožepok zahtevana minimalna količina eteričnega olja 0,25 %, kar je bilo doseženo na vseh lokacijah, pri vseh žetvah v vseh treh letih. V letu 2017 je imela prva žetev na lokacijah Žalec in Logarska dolina najvišjo vsebnost eteričnega olja v primerjavi z vsemi lokacijami v treh letih.

V literaturi navajajo, da ožepka običajno ne napadajo boleznin in škodljivci, če pa že, so to pršice (*Tetranychidae spp.*), bolhači (*Chrysomelidae ssp.*) in kapusova sovka (*Mamestra brassicae*). Ožepok se običajno uporablja v biotskem varstvu kot dober sosed v nasadu zelja in vinske trte. V našem poskusu smo zasledili le napad pršic v prvem letu na lokaciji Žalec pa še to le v zelo majhnem obsegu.

#### 4 SKLEPI

V triletnem poskusu smo proučevali pridelek in vsebnost eteričnega olja pri ožepku (*Hyssopus officinalis* L.) na treh lokacijah v Sloveniji. Dve sta bili nižinski z različnimi karakteristikami (Vrhnika: pridelava na črni pleteni foliji brez namakanja na rahlo nagnjenem terenu; Žalec: pridelava z namakanjem po potrebi na ravninskem terenu) ena pa višinska (Idrijske Krnice oziroma Logarska dolina). Lokacije pridelave, način pridelave in vremenske razmere so botrovale k neenakomernemu razvoju rastlin po Sloveniji, kar se kaže v velikih razlikah v razvojni fazi rastlin v času žetve ter kakovosti rastlinskega materiala.

Na podlagi triletnih rezultatov (2015 do 2017) ugotavljamo, da se je pokazalo pridelovanje ožepka izmed preučevanih lokacij najbolj optimalno na nižinski ravninski lokaciji z vključenim namakanjem po potrebi, kjer je bil pridelek največji v vseh treh preučevanih letih. Sklepamo, da je namakanje pomemben dejavnik v

pridelavi ožepka. V prvem letu poskusa je bil pridelek na tej lokaciji za 25 % višji kot na drugi nižinski lokaciji (nagnjen teren, pokrit s folijo, brez namakanja) in za 15 % večji kot na višinski lokaciji. V drugem letu poskusa je bil pridelek zopet največji na lokaciji Žalec, in sicer za 30 % v primerjavi z Vrhniko.

V triletnem nasadu smo lahko izvedli dve žetvi. V Vrhniki je bil pridelek prve žetve v tretje letnem nasadu (2017) sicer bistveno večji kot v Žalcu (114 kg/100 m<sup>2</sup> v primerjavi 56 kg/100 m<sup>2</sup>), vendar pa so potem v sušnem in vročem poletju rastline tam zastale v rasti in dale le majhen pridelek druge žetve (4 kg/100 m<sup>2</sup>). Skupen pridelek na lokaciji Vrhnika je bil v primerjavi z Žalcem v tem letu za 9 % manjši. Očitno bi bilo potrebno v tako sušnem in vročem poletju rastline po prvi žetvi namakati. Prav tako folija ni opravila svoje naloge oziroma je morda črna pletena folija v ta namen celo neprimerna. Smiselna je tudi žetev v dneh, ko je napovedano oblačno in ne prevroče vreme, morda se požeta površina po prvi žetvi za nekaj dni tudi pokrije s kopreno, s čemer omogočimo ugodnejše razmere za razvoj novih poganjkov. V Žalcu sta bili žetvi po pridelku v tri letnem nasadu, kjer smo namakali, primerljivi. Pridelek obeh žetev skupaj je bil 130 kg/100 m<sup>2</sup> suhe snovi.

Vsebnost eteričnega olja je bila pri vseh žetvah višja, kot jo minimalno določa BHP 83. V prvem letu je bila najvišja na lokaciji Vrhnika; na lokacijah Žalec in Idrijske Krnice je bila nižja za 41 % oz. za 20 %. V drugem letu je bila vsebnost eteričnega olja na lokaciji Žalec in Vrhnika primerljiva, na lokaciji Logarska dolina pa je bila nižja za 26 % (tam je bil nasad leto dni mlajši). V letu 2017 je bila najvišja v Logarski dolini pri 1. žetvi, sledi lokacija Žalec 1. žetev. Vsebnost eteričnega olja pri 2. žetvi na lokaciji Žalec in Logarska dolina sta bili primerljivi. V letu 2017 je bila bistveno nižja vsebnost eteričnega olja na lokaciji Vrhnika pri obeh žetvah.

## 5 LITERATURA

- ARSO, 2020. Dostopno na: <http://www.arso.gov.si/vreme/>
- Baričević D. 1996: Priročnik za ciklus predavanj pridelovanje zdravilnih rastlin I. del. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Inštitut za poljedelstvo. 72, 73 s.
- Martinčič A., Sušnik F. 1984. Mala flora Slovenije. Državna založba Slovenije. 472 s.
- MKGP: Smernice razvoja lokalne oskrbe z zelišči za obdobje 2016-2021, 2016. Dostopno na: [https://www.gov.si/assets/ministrstva/MKGP/PODROCJA/KMETIJSTVO/RASTLI\\_NSKA-PRIDELAVA/VRTNARSTVO/Zelisca-Smernice.pdf](https://www.gov.si/assets/ministrstva/MKGP/PODROCJA/KMETIJSTVO/RASTLI_NSKA-PRIDELAVA/VRTNARSTVO/Zelisca-Smernice.pdf)
- Statistični urad Republike Slovenije (SURS), Kmetijstvo, gozdarstvo, ribištvo. Dostopno na: <https://www.stat.si/StatWeb/Field/Index/11>
- Wagner T. 1997. Pridelovanje zelišč. Univerza v Mariboru, Fakulteta za kmetijstvo. 150, 151 s.
- Jankovský M., Landa T. 2002. Genus *Hyssopus* L. – recent knowledge, Hort. Sci. (Prague), 29, (3): 119–123 s.
- Rode J. 2018: Zeliščni vrt domača lekarna. Založba Kmečki glas, 168-170 s.

## INTERAKCIJE MED VIROIDI IN ŽUŽELKAMI

Maja DOBRAJC<sup>1</sup>, Stanislav TRDAN<sup>2</sup>, Jernej JAKŠE<sup>3</sup> in Sebastjan RADIŠEK<sup>4</sup>

Pregledni znanstveni članek / review article

Prispelo / received: 23. 10. 2020

Sprejeto / accepted: 6. 12. 2020

### Izvleček

Viroidi, najmanjši rastlinski patogeni, so enoverižne, kovalentno vezane in krožne molekule RNA, ki okužujejo številne gospodarsko pomembne kmetijske rastline. Za razmnoževanje in prenos uporabljajo celične mehanizme gostitelja. Glede na strukturo in mesto replikacije, viroide uvrščamo v dve družini: Avsunviroidae in Pospiviroidae. Avsunviroidi se replicirajo v kloroplastih in so razvejane oblike, medtem, ko se pospiviroidi replicirajo v jedru in imajo paličasto obliko. Viroidi in z njimi povezane bolezni so globalno razširjeni predvsem zaradi mednarodne trgovine. Poleg neposrednega prenašanja viroidov z vegetativnimi deli, semeni in pelodom, viroide posredno prenašajo tudi žuželke. Žuželke večinoma viroide prenašajo mehansko, z okuženim rastlinskim sokom, ki po hranjenju ali oprraševanju ostane na različnih delih telesa. Posredno se v prenos viroidov z žužerkami vključujejo tudi virusi, v katere se viroidi enkapsidirajo. Po okužbi se na gostitelju razvijejo značilna bolezenska znamenja, kot so venenje, vihanje in rumenenje listov, kloroze in nekroze.

**Ključne besede:** interakcija, viroidi, žuželke

## VIROID-INSECT INTERACTIONS

### Abstract

Viroids, the smallest plant pathogenes, are single-stranded, covalently closed, circular, highly structured noncoding RNAs that cause disease in several economically important crop plants. They replicate autonomously and move systemically in host plants with the aid of the host cell machinery. Based on structure and location of replication, viroids are taxonomically divided into two

---

<sup>1</sup> Mag. biol. in ekol. z naravovar., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Oddelek za varstvo rastlin, Cesta Žalskega tabora 2, SI-3310 Žalec, e-naslov: maja.dobrajc@ihps.si

<sup>2</sup> Prof. dr., Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, e-naslov: stanislav.trdan@bf.uni-lj.si

<sup>3</sup> Prof. dr., Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, e-naslov: jernej.jakse@bf.uni-lj.si

<sup>4</sup> Dr., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Oddelek za varstvo rastlin, Cesta Žalskega tabora 2, SI-3310 Žalec, e-naslov: sebastjan.radisek@ihps.si

families: Avsunviroidae and Pospiviroidae. Avsunviroidae replicate in the chloroplast, while Pospiviroidae reproduce in the nucleus. Rod-like structures are typical for the Pospiviroidae, whereas more branched structures are typical for Avsunviroidae. Viroids and viroid diseases are distributed globally. Viroids are transmitted with vegetative parts of plants, seeds, pollen and indirectly also with insects. Insects transmit viroids mostly mechanically, with infected plant sap that remains on different body parts during feeding or pollination. Indirectly viruses are also involved in viroids transmission with insects, in which viruses are encapsulated. The host symptoms of all these viroid diseases are similar, and include stunting, apical proliferation, apical leaf narrowing and yellowing, leaf crinkling, tissue brittleness and necrosis.

**Key words:** insects, transmission, viroids

## 1 UVOD

Viroidi so najmanjši znani povzročitelji bolezenskih stanj na rastlinah. So kovalentno vezane, krožne molekule RNA z dolžino 246–401 baznih parov, ki ne kodirajo peptidov ali proteinov (Flores in sod., 2005). Prvi identificiran in klasificiran viroid je bil viroid vretenatosti krompirjevih gomoljev (PSTVd, angl. potato spindle tuber viroid) (Diener, 2003). Bolezen, ki jo povzroča, so leta 1920 prvič opisali na sorti krompirja Irish Cobbler v Severni Ameriki (Martin, 1922); rastline so imele zavrto rast in podaljšane gomolje (Diener, 1971). Do leta 1967 so virusi veljali za najmanjše povzročitelje bolezni, leta 1967 pa sta Diener in Raymer dognala, da je viroid RNA molekula, brez proteinskega plašča in od 50 do 80-krat manjša od najmanjše virusne molekule. Leta 1971 je nato Diener definiral viroid kot majhno, fitopatogeno RNA molekulo z nizko molekularno maso. Večina danes znanih viroidov povzroča bolezenska stanja na gospodarsko pomembnih rastlinskih vrstah, kot so krompir (*Solanum tuberosum* L.), paradižnik (*Solanum lycopersicum* L.), hmelj (*Humulus lupulus* L.), kokosova palma (*Cocos nucifera* L.), vinska trta (*Vitis vinifera* L.), jabolana (*Malus domestica* Borkh.), avokado (*Persea americana* Mill.) in breskev (*Prunus persica* [L.] Batsch) (Kovalskaya in Hammond, 2014). Razširjeni so po vsem svetu, tveganje za širjenje pa povečujemo s transportom okuženih sadežev in semenskega materiala. Patogeneza viroidov je kompleksen fenomen, saj lahko različni viroidi na istem gostitelju izrazijo ali v latentnem stanju ali s številnimi bolezenskimi znamenji. Okužene rastline imajo zavrto rast, pojavlja se rumenenje in vihanje listov, deformacija in zaostala rast cvetov in sadežev in trohnenje koreninskega sistema (Kovalskaya in Hammond, 2014). Bolezenska znamenja so posledica interakcije med viroidom, gostiteljem in okoljem. Pri rastlini ima glavno vlogo za pojav bolezenskih znamenj njen obrambni sistem in sistem RNA utišanja genov (Flores in sod., 2015). Viroidi imajo največjo stopnjo mutacij med organizmi, kar jim omogoča širok spekter diverzitete in adaptacijo na odpornostne mehanizme gostiteljev (Ding in Itaya, 2007).



Viroide taksonomsko delimo glede na biokemijske in strukturne značilnosti molekule RNA (Hadidi in sod., 2003). Viroidno RNA gradijo posamezne domene: terminalna leva (TL), patogena (P), centralna (C), variabilna (V) in terminalna desna (TD). C domena je spodobna tvoriti dve ali več sekundarni strukturi, ki sodelujeta pri regulaciji replikacije. Prisotnost ali odsotnost C domene uvršča viroide v dve družini: Pospiviroidae in Avsunviroidae (Owens in Hammond, 2009). Družini se delita v različne rodove glede na značilnosti zgradbe RNA in filogenetske povezave med posameznimi vrstami viroidov. Viroidi iz družine Pospiviroidae so razporejeni v rodove glede na homologne sekvence v CCR domeni, terminalno ohranjene dele lasnične zanke in terminalno ohranjene regije ter vključujejo rodove *Pospiviroid*, *Hostuviroid*, *Cocaviroid*, *Apscaviroid* in *Coleviroid*. Pospiviroidi imajo širok spekter gostiteljev in okužujejo večino kritosemenk (Adkar-Purushothama in Perreault, 2019). Vrste, ki nimajo ohranjene CCR domene, pripadajo družini Avsunviroidae, in so razdeljene v tri rodove, *Avsunviroid*, *Pelamoviroid* in *Elaviroid*, glede na morfološke in strukturne značilnosti tako imenovane »hammerhead« strukture (Di Serio in sod., 2014). Avsunviroidi imajo ozek nabor gostiteljev in večinoma okužujejo vrste z njenimi bližnjimi filogenetskimi sorodniki (Singh in sod., 2003). Pospiviroidi so paličaste oblike, niso ribocimsko aktivni, njihova replikacija poteka v jedru gostitelja na način asimetričnega replikacijskega kroga, v katerega je vključen encim od DNA odvisna RNA polimeraza II. Za avsunviroide je značilna razvejana oblika, so brez posameznih domen, imajo ribocimsko aktivnost, replikacija poteka v kloroplastu na način simetričnega replikacijskega kroga z jedro kodirajočo kloroplastno RNA polimerazo (Tsagris in sod., 2008).

## 2 PRENAŠANJE VIROIDOV - SPLOŠNO

Globalni prenos viroidov je tesno povezan z mednarodno trgovino, saj je transport vegetativnih delov rastlin glavni vzrok za njihovo širjenje na nova območja. Prenášanje viroidov pa poleg okuženih vegetativnih poganjkov poteka še mehansko, z okuženimi semeni in pelodom ter posredno z žuželkami (Verhoeven, 2010). Mehansko se viroidi prenašajo z okuženim orodjem, nerazkuženimi rokami delavcev, s kontaktom med neokuženo in okuženo rastlino (Matsushita in Tsuda, 2014). Barbosa in sod. so leta 2005 opravili poskuse v rastlinjakih in na poskusnih poljih, da bi dokazali mehanski prenos viroidov CEVd (angl. citrus exocortis viroid), CBLVd (angl. citrus bent leaf viroid), HSVd (angl. hop stunt viroid), CVd-III (angl. citrus viroid III) ali CVd-IV (angl. citrus viroid IV), ki povzročajo bolezní agrumov. V rastlinjaku je potekal preliminarni poskus, kjer so kot donorske rastline uporabili agrume, okužene z viroidi CEVd, CBLVd, HSVd, CVd-III ali CVd-IV. Receptorska rastlina je bila citróna (*Citrus medica* L., klon 861-SI) cepljena na hibrid limone (*Citrus x jambhiri* Lush.). Mehansko okuževanje je potekalo v pomladanskih mesecih, ko so s sterilnim skalpelom zarezovali rastline. Posamezno zarezo so naredili pod kotom 45° v steblo donatorske rastline, okužene s

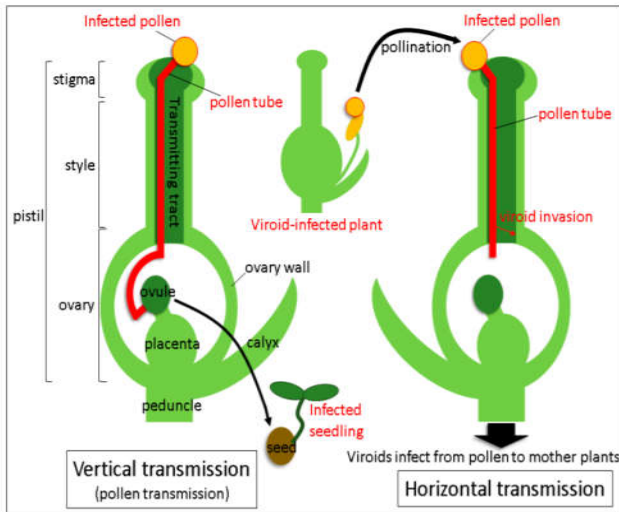
posameznim viroidom in takoj zatem zarezali še receptorsko zdravo rastlino. Steblo zdrave rastline so nato na območju reza ovili s parafilmom. Po treh mesecih so rastline porezali, da so spodbudili rast novih poganjkov, ki so jih testirali na prisotnost viroidov. Dokazali so, da se lahko rastlina mehansko okuži že z enim samim zarezom z okuženim rezilom. Prav tako so dokazali, da se mehansko lahko prenese tudi posamezen viroid, kljub temu, da je rastlina okužena z več viroidi hkrati. V poljskem poskusu so vzpostavili nasade različnih vrst agrumov (limone, klementine in pomarančevce), v katerih je bila polovica rastlin neokuženih, drugo polovico so okužili z izolati CEVd, CBLVd, HSVd in CVd-III. Neokužena drevesa so posadili nasproti okuženim drevesom. Drevesa so nato redno obrezovali, med rezjo neokuženih in okuženih dreves pa niso razkuževali orodja. Po 14 letih so z vseh rastlin cepili cepiče na klon 861-SI citrone in po šestih mesecih s hibridizacijsko tehniko preverili okuženost rastlin. Iz preglednice 1 je razvidno, da se viroidi mehansko prenašajo tudi na kmetijskih zemljiščih, kjer poleg starejših okuženih rastlin sadijo mlajše, brezviroidne rastline (Barbosa in sod., 2005).

**Preglednica 1: Poljski poskus prenosa različnih viroidov (Barbosa in sod., 2005)**

Citrus	Število okuženih rastlin/število rastlin v poskusu				Uspešnost prenosa viroidov
	CEVd	CBLVd	HSVd	CVd-III	
Klementina	1/25	0/25	0/25	0/25	4 %
Pomaranča	0/30	1/30	0/30	2/30	10 %
Limona	5/28	0/28	1/28	0/28	21 %

Prenos z okuženimi semeni in pelodom je potrjen pri številnih pospiviroidih (PSTVd, TCDVd, TASVd, TPMVd, PCFVd, CLVd, CSVd (angl. chrysanthemum stunt viroid), CEVd) (Matsushita in sod., 2018a). Pojav bolezenskih znamenj je odvisen od gostiteljske rastline in vrste viroida (Matsushita in Tsuda, 2014). Prenos peloda in semen je lahko vertikalni ali horizontalni (slika 1). Vertikalni prenos ima pomembno vlogo pri širjenju in preživetju viroidov, saj prenos viroidov poteka z okuženimi semeni. Vertikalni prenos je odvisen od vrste viroida in vrste gostitelja; PSTVd ima 0,3 % uspešnost prenosa s semeni pri papriki sorte *Capsicum annuum* var. *grossum* [L.] Sendt., 0,5 % pri sorti *Capsicum annuum* var. *angulosum* Mill. in 1,2 % uspešnost prenosa pri kronski marjetici (*Glebionis coronaria* [L.] Cass. ex Spach). Pri paradizniku je vertikalni prenos viroida PSTVd 90,2 %. Pri okrasni rastlini navadna pisana kopriva (*Coleus blumei* Benth.) je vertikalni prenos 100 %. Pri vertikalnem prenosu okužen pelod iz brazde pestiča potuje do plodnice, jo oplodi in razvije se okuženo seme, iz katerega zraste nova okužena rastlina. Horizontalno se z okuženim pelodom prenašajo viroidi PSTVd, TPMVd in CSVd. Pri petuniji (*Petunia* sp.) so dokazali 80 % prenos viroida TPMVd z okuženim pelodom. Do okužbe na petuniji pride, ko okužen pelod pride v stik s stigmo in se

po vratu pestiča prenese do plodnice. Po kanalu pestiča se transportira na spodnji del vrata in s tem sistemsko okuži celotno rastlino (Matsushita in sod., 2018a). Pri horizontalnem prenosu pelod iz okužene rastline oprashi zdravo rastlino in se po vratu pestiča transportira v rastlino. S tem okuži zdravo materno rastlino (Matsushita in Yanagisawa, 2018).

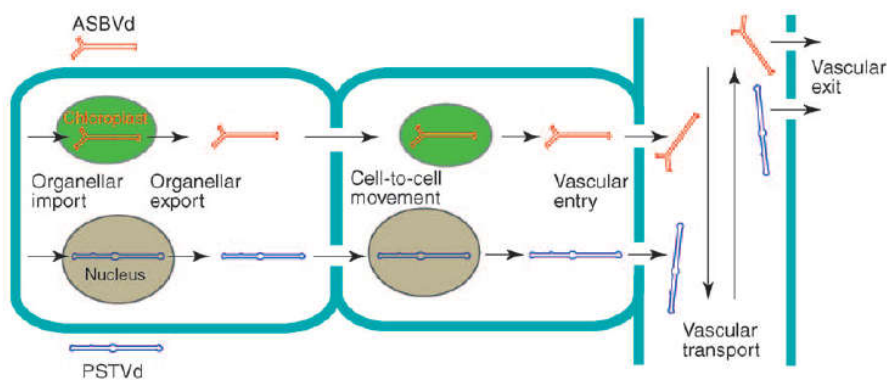


**Slika 1:** Prikaz poti vertikalnega in horizontalnega prenosa viroida TPMVd pri petuniji (Matsushita in sod., 2018b)

Povečana potreba po proizvodnji hrane je hortikulturno dejavnost vodila v vzpostavitev hidroponske vzgoje rastlin in namakalnih sistemov, ki pa potencialno predstavljajo vir patogenov. Običajno je v namakalnih sistemih koncentracija viroidov tako nizka, da je ni mogoče zaznati s standardnimi protokolarnimi diagnostičnimi metodami (Mehle in sod., 2017). Monitoring rastlinskih patogenov v vodi ni pogost, vendar je pomembno poznavanje stabilnosti patogenov v namakalnih sistemih, hidroponiki in drugih oblikah voda, ki se uporabljajo kot vir za rast in razvoj agronomsko pomembnih kultur ter s tem predstavljajo posredni vir okužbe (Gosalves in sod., 2003). Patogeni, prisotni v vodi, lahko vstopijo v rastlino skozi njen koreninski sistem ter povzročijo obolenje rastline (Boben in sod., 2007). Za viroid HSVd in ASSVd (angl. apple scar skin viroid) so proučevali možnost prenosa skozi koreninski sistem, ki je bil neuspešen (Hadidi in sod., 2003). Prenos viroidov lahko poteka direktno od okužene rastline s koreninskim prepletom z neokuženo rastlino skozi koreninske laske, korenine in po prevodnem sistemu v vegetativne dele rastline ali posredno skozi koreninski sistem iz okuženih tal (Vachev in sod., 2010). CSVd je viroid krizantem, ki se prenaša z okuženimi stroji, opremo in rastlinskim sokom, lahko pa se prenaša tudi skozi koreninski sistem

(Dijkstra in de Jager, 1998). Transport patogenov lahko iz okuženega okolja do gostitelja poteka abiotsko ali biotsko. Kjer patogen skozi korenine okuži matično podlago in vodo ter se tako transportira do neokuženih rastlin, poteka abiotski prenos. Biotski prenos patogenov je do sedaj znan pri številnih virusih, kjer so vmesni vektorji nematode ali glive (Dijkstra in de Jager, 1998). V zvezi z ohranjanjem viroidov v tleh pa je pomembna tudi nedavna objava Wei s sod. (2019), kjer poročajo o možnosti ohranjanja viroidov v nekaterih glivah, kar so dokazali z umetnim okuževanjem s pomočjo cDNA klonov. Med glivami omenjajo *Fusarium graminearum* Schwabe, ki je zelo razširjena na žitih in lahko preživi v tleh. To nakazuje na potencialno možnost ohranjanja viroidov v tleh tudi s talnimi glivami.

Prenos viroidov v gostiteljsko celico poteka z njihovim vstopom v razmnoževalni organel (slika 2). Po replikaciji viroidne RNA se le-ta transportira iz ene v drugo celico skozi plazmodezme. Sistemsko se viroidi transportirajo po vaskularnem sistemu do končnih organov. Za razmnoževanje, transport in produkcijo intermedianih komponent izkoriščajo proteine gostitelja (Ding in Itaya, 2007).

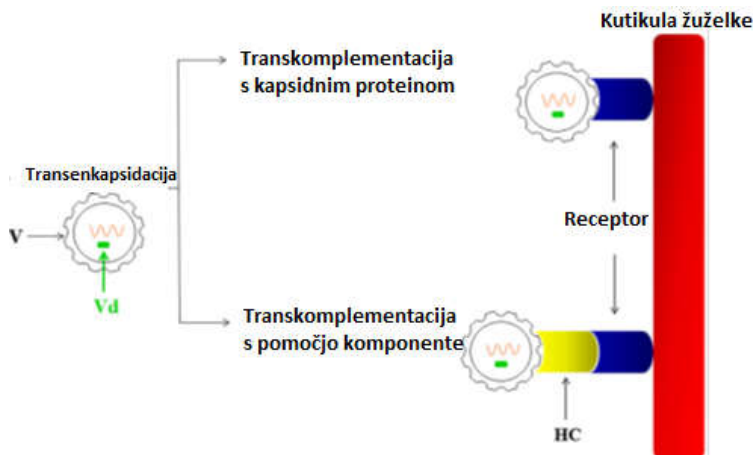


**Slika 2:** Prenos viroidov med celicami (Ding in Itaya, 2007)

### 3 PRENAŠANJE VIROIDOV Z ŽUŽELKAMI

Posredni prenos viroidov lahko nastane zaradi aktivnosti različnih vrst žuželk, poleg tega pa se v prenos viroidov z žuželkami vključujejo tudi virusi. Večinoma se viroidi prenašajo mehansko, s kontaminiranimi telesnimi deli žuželk (Van Bogaert in sod., 2014). Prvi laboratorijski poskus prenosa viroida CSVd in CPFVD (angl. cucumber pale fruits viroid) z listnimi ušmi je bil neuspešen, saj rastline niso razvile značilnih bolezenskih znamenj (Hollings in Stone, 1973). Prav tako so prvi laboratorijski poskusi z ogorčicami nakazovali, da le-te niso prenašalci viroidov, okužene rastline so bile brez bolezenskih znamenj (van Dorst in Peters, 1974). De Bokx in Piron sta 1981 preučevala prenos viroida PSTVd na paradižniku s tremi

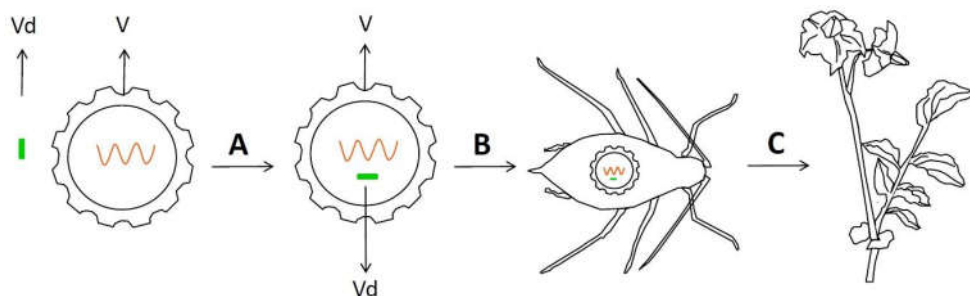
vrstami uši: *Aulacorthum solani* Kaltenbach, *Macrosiphum euphorbiae* Thomas in *Myzus persicae* Sulzer. Po štiritedenski inokulaciji viroida v receptorske zdrave rastline sta ugotovila, da vrsti *A. solani* in *M. persicae* nista prenesli viroida PSTVd iz okuženih rastlin paradižnika na zdrave neokužene rastline. Potrdila pa sta neperzistenten prenos PSTVd s krompirjevo ušjo (*M. euphorbiae*). Galindo in sod. (1986) so dokazali učinkovit prenos viroida TPMVd (angl. tomato planta macho viroid) s sivo breskovo ušjo. V študiji prenosa viroida TASVd (angl. tomato apical stunt viroid) z *Aphis craccivora* Koch niso bili učinkoviti (Walter 1987). V kasnejših poskusih, ki so jih leta 1995 izvedli Salazar in sod., je bilo ugotovljeno, da se je viroid PSTVd s 100 % uspešnostjo prenesel iz okužene rastline krompirja na neokužen krompir, vendar le ob prisotnosti virusa PLRV (angl. potato leaf roll virus). Virus PLRV sodeluje pri prenosu viroida iz okužene rastline v žuželko. To so potrdili s poskusom, kjer so okuževali zdrave rastline z virusom PLRV, z viroidom PSTVd in s kombinacijo obeh. V primerih, kjer so rastlino okužili s kombinacijo virusa PLRV in viroida PSTVd, je bil prenos z ušjo *M. persicae* najbolj učinkovit (14 %). Iz rastline, okužene le z viroidom PSTVd, siva breskova uš ni prenesla okužbe na novo zdravo rastlino. S tem so dokazali sodelovanje virusa in viroida pri prenosu iz okužene rastline na neokuženo rastlino, saj so na novo okužene rastline razvile vsa bolezenska znamenja, ki jih povzroča viroid PSTVd (Syller in sod., 1997). Proces, pri katerem virus sodeluje pri prenosu viroida imenujemo transenkapsidacija, fenomen, pri katerem se viroid vstavi v kapsido virusa. Plaščni proteini virusa omogočijo vezavo transkomplementacijske strukture na kutikulo vektorja, ki lahko viroid skupaj z virusom prenese v novo gostiteljsko rastlino (slika 3) (Froissart in sod., 2002; Querci in sod., 1997; Syller in Marczewski, 2001).



**Slika 3:** Prikaz transenkapsidacije in transkomplementacije viroida v virus (Froissart in sod., 2002)

Pred dokazano transenkapsidacijo viroidov v viruse je bilo takšno »genomsko maskiranje« dobro opisano predvsem pri skupini luteovirusov ter potyvirusov (Falk in sod., 1995; Latham in Wilson, 2008). Transenkapsidacija omogoča nastanek transkomplementacije, ki je opisana kot mehanizem, v katerem določen virusni protein omogoča okužbo drugega virusa. Ta pojav je pogosto razložen na primeru virusov rodu *Umbravirus*, ki se sami ne morejo prenašati z ušmi, v primeru prisotnosti ustreznega luteovirusa, ki tvori pomožne proteine, pa je prenos z listnimi ušmi možen (Taliansky in sod., 1996; Robinson in sod., 1999).

Querci in sod. so leta 1997 dokazali povezavo med virusom PLRV in viroidom PSTVd, ki se enkapsidira v ovojnico virusa zvijanja listov krompirja (PLRV) in se nato prenese z ušmi. Enkapsidacijo so potrdili s tretiranjem RNA vzorcev iz okuženih rastlin z mikrokokno nukleazo, ki razgradi neenkapsidirano RNA. Sledila je RT-PCR analiza, ki je še vedno pokazala prisotnost PSTVd oziroma potrdila, da je enkapsidacija preprečila popolno razgradnjo PSTVd. Transenkapsidacija lahko ima pri prenosu viroidov z žuželkami, kot so listne uši, pomembno epidemiološko vlogo. Latentno prisoten viroid v poljščinah, vrtninah ali okrasnih rastlinah se lahko vnese v kapsido virusa, ki ga nato prenese žuželka (slika 4). Takšna pot prenosa omogoča prenos viroidov s pomočjo vektorjev na nove gostitelje, kar lahko vodi v pojav novih bolezenskih stanj.



**Slika 4:** Enkapsidacija viroida (Vd) v virus (V), prenos virusa z žuželko na novo gostiteljsko rastlino (Van Bogaert, 2016)

Walia in sod. (2015) opisujejo tudi prenos viroida ASSVd (angl. apple scar skin viroid) z rastlinjakovim ščitkarjem (*Trialeurodes vaporariorum* Westwood) iz okuženih kumar (*Cucumis sativus* L.) in fižola na neokužene kumare, fižol, paradižnik in grah (*Pisum sativum* L.). Pri tem so dokazali možnost prenosa gole RNA viroida na rastline ter vpliv *C. sativus* floemskega proteina 2 (CsPP2) na prenos in translokacijo viroida v rastlini.

Matsuura in sod. (2010) kot posredne prenašalce viroidov opisujejo tudi čmrlje, prenos poteka predvsem med okuženimi in neokuženimi rastlinami, ki jih gojijo v

rastlinjakih. V rastlinjakih, kjer so gojili paradižnik, so potrdili prisotnost viroida TASVd in TCDVd. Okužene rastline so izolirali in jih opráševali s čmrlji ter nadaljevali z gojenjem rastlin. V posebnih rastlinjakih so gojili neokužene, brezviroidne rastline. Neokužene rastline in okužene rastline je opráševal isti roj čmrljev. Do sekundarnega prenosa viroida TASVd med čmrljem in paradižnikom pride mehanično preko rilčka s posrkanim rastlinskim sokom ali z izpostavitvijo okuženega peloda na stigmo neokužene rastline. Med opráševanjem čmrlji vibrirajo s krili, grizljajo prašnico z mandibulami in frekvenčno vibrirajo s telesom, zato je koncentracija viroida TCDVd visoka tudi na čmrljevi glavi in okončinah. Prav tako se viroid TASVd prenese z rastlinskim sokom, ki ostane na mandibulah. Po enem mesecu so rastline kazale simptomatične znake viroidne okužbe in z molekularnimi metodami so potrdili viroid TCDVd. Neokužen paradižnik je po opráševanju z okuženim pelodom, ki so ga zanesli čmrlji, razvil značilna bolezenska znamenja okužbe: ovenelost, listne kloroze, vihanje listnih konic. Zaradi čmrljevih migracij je možnost prenosa viroida tudi na daljše razdalje (Matsuura in sod., 2010).

Nielsen in sod. (2012) so zaradi zaskrbljujočih okužb okrasnih rastlin z viroidom PSTVd in možnostjo prenosa na gospodarsko pomembni rastlinski vrsti, paradižnik in krompir, raziskovali različne možne poti prenosa. Viroid PSTVd se mehansko prenaša z okuženim rastlinskim sokom, semeni, pelodom in z okuženimi vegetativnimi deli rastline. Zaradi poročanja o prenosu z enkapsidacijo PSTVd viroida z virusom PLRV s sivo breskovo ušjo pri krompirju in paradižniku (Querci in sod., 1997) ter neraziskanosti prenosa viroida PSTVd z resarji in medonosnimi čebelami (*Apis mellifera* L.), so Nielsen in sod. leta 2012 raziskovali možnost prenosa viroida PSTVd s tobakovim resarjem (*Thrips tabaci* Lindeman), cvetličnim resarjem (*Frankliniella occidentalis* Pergande), medonosno čebelo in čmrlji. Osredotočili so se na možnost prenosa viroida PSTVd z listnim sokom in pelodom, s katerim se hranita in ga prenašata polifagna tobakov resar in cvetlični resar ter prenos med opráševanjem z medonosno čebelo in čmrljem med okuženimi in neokuženimi okrasnimi rastlinami in/ali paradižnikom. Poskus je potekal pod nadzorovanimi pogoji, kjer so sprva žuželke tobakovega resarja in cvetličnega resarja gojili na rastlinah navadnega fižola in pora. Medonosno čebelo in čmrlja so sprva hranili s sladkorno vodo. Po hranjenju so žuželke stradali, nato pa jih prenesli v petrijevke z okuženim ali neokuženim pelodom, nato pa še v petrijevke z okuženimi listi rastlin z viroidom PSTVd. Pri medonosni čebeli in čmrljih so proučevali tudi možnost prenosa okuženega peloda na zdrave rastline petunije. Pri proučevanju medvrstnega prenosa viroida PSTVd niso potrdili. Med praktičnim poskusom prenosa viroida PSTVd z žužerkami, so Nielsen in sod. (2012) izvajali tudi diagnostično metodo RT-PCR, s katero so preverjali prisotnost viroida v žužerkah. Pri vrstah tobakov resar in cvetlični resar so zaznali nizko koncentracijo viroida PSTVd, kar pripisujejo možnosti ostankov rastlinskega soka na obustnih okončinah žužerk.

**Preglednica 2:** Vrste žuželk, pri katerih so potrdili prenos ali transenkapsidacijo viroidov (Van Bogaert in sod., 2014)

Družina žuželk	Vrsta	Slovensko ime	Prenos viroida	Transenkapsidacija viroida
Aphididae	<i>Macrosiphum</i>	Velika	PSTVd	
	<i>euphorbiae</i>	krompirjeva uš		
	<i>Myzus persicae</i>	Siva breskova uš	TPMVd	PSTVd
Apidae	<i>Bombus</i>	Temni zemeljski	TASVd,	
	<i>terrestris</i>	čmrlj	TCDVd	

#### 4 ZAKLJUČKI

V prispevku smo se osredotočili na pregled študij interakcij in mehanizmov prenosa viroidov z žuželkami. Dosedanje študije so pokazale možnosti prenosa različnih viroidov z ušmi, čmrlji in ščitkarji. Študij, v katerih proučujejo prenos viroidov z žuželkami je malo, predvsem zaradi kompleksnosti načrtovanih poskusov in nadaljnjih metod za dokazovanje pristnosti viroidov v žuželkah. Prav tako še ostaja neproučen proces transenkapsidacije, ki pa ima velik potencial pri širjenju patogenov na nova območja in nove gostiteljske rastline. V nadaljnje raziskave bi tako bilo potrebno vključiti širi spekter žuželk, ki predstavljajo grožnjo pri prenosu viroidov, večje število različnih viroidov in občutljivejše diagnostične metode za zaznavo viroidov, kot je npr. PCR v realnem času. Poleg žuželk so možni vektorji prenosa tudi nematode in glive, zato bi bilo v prihodnje smiselno raziskave usmeriti tudi v možnost prenosa viroidov s talnimi organizmi. Poznavanje različnih poti prenosa patogenov in mehanizmov replikacij pomembno pripomore k poznavanju procesov okužbe in možnost njene omejitve. Zaradi neraziskanosti možnosti prenosa viroidov z žuželkami, nematodami, glivami in nepoznavanja procesov transkomplementacije in transenkapsidacije, bi bili poskusi in raziskave prenosa viroidov z žuželkami pomemben prispevek znanosti in reševanju okužb z viroidi.

#### 5 VIRI

- Adkar-Purushothama C. R., Perreault J. P. Current overview on viroid–host interactions. *Wiley, Wires RNA*. 2019.
- Barbosa C. J., Pina J. A., Perez-Panades J., Bernad L., Serra P., Navarro L., Duran-Villa N. Mechanical transmission of Citrus Viroids. *Plant Disease*. 2005.
- Boben J., Kramberger P., Petrovič N., Cankar K. Detection and quantification of Tomato mosaic virus in irrigation waters. *European Journal of Plant Pathology*. 2007; 118(1): 59–71.



- De Bokx J. A., Piron P. G. M. Transmission of potato spindle tuber viroid by aphids. *Netherlands Journal of Plant Pathology*. 1981; 87: 31–34.
- Diener T. O. *Potato spindle tuber virus* 4. Replicating, low molecular weight RNA. *Virology*. 1971; 45(2): 411.
- Diener T. O. Discovering viroids – a personal perspective. *Nature Reviews Microbiology*. 2003; 1(1):75–80.
- Diener T. O., Raymer W. B. Potato spindle tuber virus: a plant virus properties of a free nucleic acid. *Science*. 1967; 158(3799): 378–381.
- Dijkstra J., de Jager C. P. Virus Transmission Through Soil. *Practical Plant Virology*. 1998; 125–127.
- Ding B., Itaya A. Viroid: A Useful Model for Studying the Basic Principles of Infection and RNA Biology. *The American Phytopathological Society*. 2007; 20(1): 7–20.
- Di Serio F., Flores R., Verhoeven J. T. J., Li S.-F., Pallás V., Randles J. W. Owens R. A. Current status of viroid taxonomy. *Archives of Virology*. 2014; 159(12): 3467–3478.
- Falk B. W., Passmore B. K., Watson M. T., Chin L. S. The specificity and significance of heterologous encapsidation of virus and virus-like RNA's. In *Biotechnology and Plant Protection: Viral Pathogenesis and Disease Resistance. Proceedings of the Fifth International Symposium*. 1995; 391–415.
- Flores R., Hernandez C., de Alba A. E. M., Daros J. A., Di Serio F. Viroids and viroid–host interactions. *Annual Review of Phytopathology*. 2005; 43: 117–139.
- Flores R., Minoia S., Carbonell A., Gisel A., Delgado S., López-Carrasco A., Di Serio F. Viroids, the simplest RNA replicons: how they manipulate their hosts for being propagated and how their hosts react for containing the infection. *Virus Res*. 2015; 209: 136–145.
- Froissart R., Michalakakis Y., Blanc S. Helper component-transcomplementation in the vector transmission of plant viruses. *Pythopathology*. 2002; 92(6): 576–579.
- Galindo A. F., Lopez R. M. C., Aguilar T. *Interacciones entre el viroide planta macho del jitomate, sus hospedantes y su transmisor el áfido Myzus persicae, Resúmenes*, In: *Viroids* (eds. Hadidi A., Flores R., Randles J.W., Semancik J.S.), Iedn, Csiro Publishing, Collingwood, U.K. 2003; 30–48.
- Gosalves B., Navarro J. A., Lorca A., Botella F., Sanchez Pina M. A., Pallas V. Detection of Melon necrotic spot virus in water samples and melon plants by molecular methods. *Journal of Virological Methods*. 2003; 113: 87–93.
- Hadidi A., Flores R., Randles J. W., Semancik J. S. *Viroids*. CSIRO, Collingwood, Victoria, Australia. 2003; 370.
- Hollings M., Stone O. M. Some properties of chrysanthemum stunt, a virus with the characteristics of an uncoated ribonucleic acid. *Annals of Applied Biology*. 1973; 74: 333–348.
- Kovalskaya N., Hammond R. W. Molecular biology of viroid–host interactions and disease control strategies. *Plant Science*. 2014; 228: 48–60.
- Latham J. R. Wilson A. K. Transcomplementation and synergism in plants: implications for viral transgenes? *Molecular Plant Pathology*. 2008; 9(1): 85–103.
- Martin W. H. »Spindle tuber,« a new potato trouble. Hints to Potato Growers. *New Jersey State Potato Association*. 1922; 3: 8.
- Matsushita Y., Tsuda S. Distribution of *Potato spindle tuber viroid* in reproductive organs of petunia during its developmental stages. *Phytopathology*. 2014; 104(9): 964–969.

- Matsushita Y., Yanagisawa H. Distribution of *Tomato planta macho viroid* in germinating pollen and transmitting tract. *Virus Genes*. 2018a; 54(1): 124–129.
- Matsushita Y., Yanagisawa H., Sano T. Vertical and Horizontal Transmission of Pospiviroids. *Viruses*. 2018b; 10(12): 706.
- Matsuura S., Matsushita Y., Kozuka R., Shimizu S., Tsuda S. Transmission of Tomato chlorotic dwarf viroid by bumblebees (*Bombus ignitus*) in tomato plants. *European Journal of Plant Pathology*. 2010; 126(1): 111–115.
- Mehle N., Kogovšek P., Rački N., Jakomin T., Gutiérrez Aguirre I., Kramberger P., Ravnikar M. Filling the gaps in diagnostics of *Pepino mosaic virus* and *Potato spindle tuber viroid* in water and tomato seeds and leaves. *Plant Pathology*. 2017; 66: 1191–1201.
- Nielsen S L., Enkegaard A., Nicolaisen M., Kryger P., Viršček Marn M., Mavrič Pleško I., Kahrer A., Gottsberger R. A. No transmission of *Potato spindle tuber viroid* shown in experiments with thrips (*Frankliniella occidentalis*, *Thrips tabaci*), honey bees (*Apis mellifera*) and bumblebees (*Bombus terrestris*). *Eur. J. Plant Pathol.* 2012; 133: 505–509.
- Owens R. A., Hammond R. W. Viroid pathogenicity: One process, many faces. *Viruses*. 2009; 1(2): 298–316.
- Querci M., Owens R. A., Bartolini I., Lazarte V., Salazar L. F. Evidence for heterologous encapsidation of potato spindle tuber viroid in particles of potato leafroll virus. *Journal of General Virology*. 1997; 78: 1207–1211.
- Robinson D. J., Ryabov E. V., Raj S. K., Roberts I. M., Taliansky M. E. Satellite RNA is essential for encapsidation of groundnut rosette umbravirus RNA by groundnut rosette assistor luteovirus coat protein. *Virology*. 1999; 254(1), 105–114.
- Salazar L. F., Querci M., Bartolini I., Lazarte V. Aphid transmission of potato spindle tuber viroid assisted by potato leafroll virus. *Fitopatologia*. 1995; 30: 56–58.
- Singh R.P., Ready K.F.M., Nie X. Chapter 3: Biology. In: *Viroids* (eds. Hadidi A., Flores R., Randles J.W., Semancik J.S.), 1edn, Csiro Publishing, Collingwood, U.K. 2003; 30–48.
- Syller J., Marczewski W. Potato leafroll virus-assisted aphid transmission of potato spindle tuber viroid to potato leafroll virus-resistant potato. *Phytopathology*. 2001; 149: 195–201.
- Syller J., Marczewski W., Pawłowicz J. Transmission by aphids of potato spindle tuber viroid encapsidated by potato leafroll luteovirus particles. *European Journal of Plant Pathology*. 1997; 103(3): 285–289.
- Taliansky M. E., Robinson D. J., Murant A. F. Complete Nucleotide Sequence and Organization of the RNA Genome of Groundnut Rosette Umbravirus. *Journal of general virology*. 1996.
- Tsagris E. M., Martínez de Alba A. E., Gozmanova M., Kalantidis K. Viroids. *Cellular Microbiology*. 2008; 10(11): 2168–2179.
- Vachev T., Ivanova D., Minkov I., Tsagris M., Gozmanova M. *Trafficking of the potato spindle tuber viroid between tomato and Orobanche ramosa*. V: Hadidi a., Flores R., Randles J. W., Palukaitis P. *Virology*. 2010; 399: 187–193.
- Van Bogaert N. *Viroid-insect-plant interactions in view of transmission routes*. PhD Thesis. Ghent University, Belgium. 2016; 1–171.
- Van Bogaert N., Smaghe G., De Jonghe K. Viroid-insects-plant interactions. *Elsevier Inc*. 2014; 15: 277–290.

- van Dorst H. J. M., Peters D. Some biological observations on pale fruit, a viroid-incited disease of cucumber. *Netherlands Journal of Plant Pathology*. 1974; 80: 85–96.
- Verhoeven J. T. J. *Identification and epidemiology of pospiviroids*. Thesis. Wageningen UR. 2010.
- Walia Y., Dhir S., Zaidi A. A., Hallan V. *Apple scar skin viroid* naked RNA is actively transmitted by the whitefly *Trialeurodes vaporariorum*. *RNA Biol*. 2015; 12(10): 1131–1138.
- Walter B. *Tomato apical stunt*. V: Diener. *The Viroids*. Plenum Press. 1987.
- Wei S., Bian R., Bagus Andika I., Niu E., Liu Q., Kondo H., Yang L., Zhou H., Pang T., Lian Z., Liu X., Wu Y., Sun L. Symptomatic plant viroid infections in phytopathogenic fungi. *PNAS*. 2019; 116: 13042–13050.