

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ТЕХНОЛОШКО-МЕТАЛУРШКИ ФАКУЛТЕТ

Тијана М. Ђорђевић

**УТИЦАЈ ФЕРМЕНТАЦИЈЕ НА
ДЕГРАДАЦИЈУ ОСТАКА
ПЕСТИЦИДА У ФЕРМЕНТИСаним
ПРОИЗВОДИМА ОД ЖИТА**

докторска дисертација

Београд, 2013.

UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Tijana M. Đorđević

**UTICAJ FERMENTACIJE NA
DEGRADACIJU OSTATAKA
PESTICIDA U FERMENTISANIM
PROIZVODIMA OD ŽITA**

doktorska disertacija

Beograd, 2013.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Tijana M. Đorđević

**EFFECT OF WHEAT FERMENTATIONS
ON PESTICIDE RESIDUES
DEGRADATIONS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013.

MENTORI:

Dr Slavica Šiler-Marinković, redovni profesor
Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd

Dr Rada Đurović-Pejčev, naučni saradnik
Institut za pesticide i zaštitu životne sredine, Beograd-Zemun

ČLAN KOMISIJE:

Dr Suzana Dimitrijević-Branković, vanredni profesor
Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd

Kandidat :

Mr Tijana M. Đorđević, dipl. biolog

Zahvaljujem...

Mentoru, dr Slavici Šiler-Marinković, red.prof., na podršci i pruženom znanju i iskustvu, ne samo pri izradi ove disertacije, nego i uopšte u naučnom radu.

Mentoru, dr Radi Đurović-Pejčev, na pomoći oko realizacije istraživanja, svim brojnim korisnim savetima i sugestijama.

dr Suzani Dimitrijević-Branković, vanr. prof., na korektnoj saradnji i pomoći tokom izrade i pisanja ovog rada.

Svim saradnicima Laboratorije za hemiju, kao i Laboratorije za herbologiju i Laboratorije za fitopatologiju i kolegama iz Instituta za pesticide i zaštitu životne sredine, na nesebičnoj podršci.

Svojoj porodici i prijateljima, na razumevanju, strpljenu i podršci.

UTICAJ FERMENTACIJE NA DEGRADACIJU OSTATAKA PESTICIDA U FERMENTISANIM PROIZVODIMA OD ŽITA

REZIME

Zbog intenziviranja primene pesticida u poljoprivredi ostaci ovih jedinjenja se danas često detektuju u svim segmentima životne sredine, što za posledicu ima i povećanje zagađenosti uzgajanih konzumnih biljaka. Porast kontaminacije prehrambenih proizvoda pesticidima sa ozbiljnim posledicama na ljudsko zdravlje doveo je do povećane zainteresovanosti za razvijanje strategije u cilju poboljšanja bezbednosti hrane sa aspekta zagađenosti ovim jedinjenjima. Ispitivanje uticaja tehnika procesuiranja hrane na smanjenje nivoa zagađenosti pesticidima poslednjih godina privlači sve veću pažnju. S obzirom da je fermentacija jedan od najstarijih, a danas veoma zastupljenih vidova prerade hrane, cilj ovog rada je ispitivanje mogućnosti korišćenja fermentacionih procesa u cilju smanjenja količine ostataka pesticida, odnosno uticaj fermentativnih mikroorganizama na degradaciju ostataka pesticida u prehrambenim proizvodima.

U radu je ispitivan uticaj fermentacije bakterijama mlečno kiselnog vrenja (*Lactobacillus plantarum*) i kvascima (*Saccharomyces cerevisiae*) na degradaciju tj. smanjenje nivoa ostataka pesticida (pirimifos-metila, hlorspirifos-metila i bifentrina) u fermentisanim supstratima žita (*Triticum spelta*). Takođe je utvrđeno kako i u kom stepenu ostaci pomenutih pesticida utiču na rast korišćenih fermentativnih mikroorganizama i proces fermentacije. Istraživanja u okviru rada obuhvatala su: utvrđivanje faza rasta korišćenih mikroorganizama u datim laboratorijskim uslovima, optimizaciju uslova mikrobioloških fermentacija, ispitivanje uticaja pomenutih pesticida na rast fermentativnih mikroorganizama i na proces fermentacije pšenice, izbor optimalne analitičke metode pripreme uzoraka za određivanje ostataka ispitivanih pesticida, optimizaciju parametara fermentacije pšeničnog supstrata (temperatura, trajanje fermentacije i veličina inokuluma) u cilju postizanja maksimalnog stepena degradacije pesticida i utvrđivanje doprinosa procesa fermentacije u degradaciji pesticida tj. definisanje uticaja aktivnosti izabranih fermentativnih mikroorganizama na degradaciju.

Utvrđeno je da su i *L. plantarum* i *S. cerevisiae* slabo osetljivi na prisustvo bifentrina u podlogama za rast, dok prisustvo organofosfata u velikoj meri negativno utiče na njihov rast u podlozi, pri čemu značajnije na kvasac. Dalje, prisustvo pirimifos-metila i hlorspirifos-metila, iako negativno utiče na porast brojnosti *L. plantarum* u pšeničnom supstratu, ne odražava se negativno na mlečnokiselinsku fermentaciju pšenice izraženu kroz snižavanje pH vrednosti i produkciju mlečne kiseline, dok prisustvo bifentrina u manjoj meri utiče na oba pokazatelja efikasnosti fermentacije. Sa druge strane, prisustvo sva tri ispitivana pesticida negativno utiče kako na porast brojnosti *S. cerevisiae* u pšeničnom supstratu, tako i na ukupnu kvasnu fermentaciju pšenice izraženu kroz snižavanje pH vrednosti i produkciju CO₂. Fermentacija pšenice sa *L. plantarum* dovodi do redukcije rezidua sva tri ispitivana pesticida, pri čemu kada se posmatra ukupna degradacija u toku fermentativnog procesa, najviše degradira hlorspirifos-metil (88-93 %), nešto manje pirimifos-metil (71-82 %), a najmanja bifentrin (35-65 %). Kada se posmatra uticaj isključivo aktivnosti *L. plantarum*, on u najvećoj meri degradira bifentrin (15-44 %), nešto manje pirimifos-metil (10-27 %), a najmanje hlorspirifos-metil (9-14 %). Fermentacija pšenice sa *S. cerevisiae* dovodi do redukcije rezidua sva tri ispitivana pesticida, pri čemu je, kada se posmatra ukupna degradacija u toku fermentativnog procesa, hlorspirifos-metil najpodložniji redukciji (93-98 %), nešto manja redukcija zabeležena je kod pirimifos-metila (63-77 %), a najmanja kod bifentrina (36-49 %). Kada se posmatra uticaj isključivo aktivnosti *S. cerevisiae*, on u najvećoj meri degradira bifentrin (16-28 %), nešto manje pirimifos-metil (3-30 %), a najmanje hlorspirifos-metil (14-19 %). Uopšteno, procesi fermentacije pšenice sa *L. plantarum* i sa *S. cerevisiae* mogu se efikasno koristiti kao sredstvo za redukciju potencijalne kontaminacije pšenice pirimifos-metilom, hlorspirifos-metilom i bifentrinom iznad njihovih MDK vrednosti, pri čemu je degradacija pirimifos-metila i bifentrina veća u toku mlečnokiselinske fermentacije, dok je degradacija hlorspirifos-metila veća u toku kvasne fermentacije pšenice.

Ključne reči: pesticidi, fermentacija, degradacija, pšenica, pirimifos-metil, hlorspirifos-metil, bifentrin, *Lactobacillus plantarum*, *Saccharomyces cerevisiae*

Naučna oblast: Hemija i hemijska tehnologija

Uža naučna oblast: Biotehnologija

UDK broj:

EFFECT OF WHEAT FERMENTATIONS ON PESTICIDE RESIDUES DEGRADATIONS

ABSTRACT

Pesticide residues have become an unavoidable part of the environment. Most of the applied pesticides find their way as 'residue' in the environment, and, once the environment is contaminated with pesticides, they may easily enter into human food chain through the plants creating serious acute health problems. Hence it is significant to evaluate simple, cost effective strategies to enhance food safety from harmful pesticides. Food processing at domestic and industrial level would offer a suitable means to tackle the current scenario of unsafe food. In that context, it is interesting to study the potential loss of pesticide during fermentation as one of the oldest simple biotechnological process.

In presented work the dissipation of pirimiphos-methyl, chlorpyriphos-methyl and bifenthrin during wheat (*Triticum spelta*) fermentation by *Lactobacillus plantarum* and *Saccharomyces cerevisiae* was investigated. Additionally, the effect of used pesticides on the lactobacilli and yeast growth and on fermentation efficiency was as well studied. Experiment conducted for dissertation consisted of: determination of used microorganisms growth curves in laboratory conditions, optimization of fermentation condition for uncontaminated wheat, study of effect of pesticide contamination in the growth substrates on microorganisms growth, study of effect of pesticides on fermentations efficiency, establishment of optimal analytical method for determination of pesticide residues in fermented wheat samples, optimization of fermentation condition (temperature, fermentation time and inoculum size) in order to obtain the highest pesticide degradation level, and determination of the individual effects of used fermentative microorganisms strains on pesticide residues dissipation in wheat.

Obtained results showed that growth of *L. plantarum* and *S. cerevisiae* in growth substrates was not inhibited by bifenthrin contamination, while was by organophosphates, while lactic acid bacteria was, generally, more resistant on contamination. Further, although pirimiphos-methyl and chlorpyriphos-methyl inhibited *L. plantarum* growth rate in wheat substrates, fermentation efficiency (pH

decrease and lactic acid production) was not diminished, while bifenthrin did negatively affect fermentation. On the other hand, all three pesticides negatively affected *S. cerevisiae* fermentation efficiency i.e. inhibited growth rate, pH decrease and CO₂ production. Degradation of all three tested pesticides in wheat was impacted by the *L. plantarum*. Overall, lactic acid fermentation procedure resulted with high degradation of chlorpyrifos-methyl (88-93 %), somewhat lower degradation of pirimiphos-methyl (71-82 %), and the lowest degradation of bifenthrin (35-65 %). When considering individual effects of lactobacilli cells, the highest reduction was for bifenthrin (15-44 %), lower for pirimiphos-methyl (10-27 %) and the lowest for chlorpyrifos-methyl (9-14 %). Degradation of all three tested pesticides in wheat was also impacted by the *S. cerevisiae*. Overall, yeast fermentation procedure resulted with high degradation of chlorpyrifos-methyl (93-98 %), somewhat lower degradation of pirimiphos-methyl (63-77 %), and the lowest degradation of bifenthrin (36-49 %). When considering individual effects of yeast cells, the highest reduction was for bifenthrin (16-28 %), lower for pirimiphos-methyl (3-30 %) and the lowest for chlorpyrifos-methyl (14-19 %). Generally, lactic acid and yeast fermentations could be effective tool for minimizing the residual contamination in wheat, in amount over MRL, whereby the pirimiphos-methyl and bifenthrin degradation was higher after fermentation with *L. plantarum*, and chlorpyrifos-methyl degradation was higher after fermentation with *S. cerevisiae*.

Key words: pesticides, fermentation, degradation, wheat, pirimiphos-methyl, chlorpyrifos-methyl, bifenthrin, *Lactobacillus plantarum*, *Saccharomyces cerevisiae*

Scientific domain: Chemistry and Chemical Technology

Narrow scientific domain: Biotechnology

UDK broj:

SADRŽAJ

UVOD.....	1
TEORIJSKI DEO	
1. PŠENICA KAO OSNOVNA NAMIRNICA U LJUDSKOJ ISHRANI.....	4
1.1. SPELTA (<i>Triticum spelta</i> L.).....	4
2. POLJOPRIVREDA KAO JEDAN OD MOGUĆIH IZVORA ZAGAĐENJA PŠENIČNIH PREHRAMBENIH PROIZVODA.....	6
2.1. PESTICIDI.....	7
2.1.1. INSEKTICIDI.....	10
2.1.1.1. Insekticidi za suzbijanje insekata u uskladištenom žitu.....	12
3. ULAZAK PESTICIDA U LANAC ISHRANE.....	18
4. PRERADA HRANE KAO MEHANIZAM ZA REDUKCIJU OSTATAKA PESTICIDA.....	20
4.1. FERMENTACIJA KAO MEHANIZAM ZA REDUKCIJU OSTATAKA PESTICIDA.....	24
5. FERMENTATIVNI MIKROORGANIZMI.....	26
5.1. BAKTERIJE MLEČNO-KISELINSKOG VRENJA.....	26
5.1.1. KARAKTERISTIKE RODA <i>LACTOBACILLUS</i>.....	27
5.1.1.1. <i>Lactobacillus plantarum</i>.....	28
5.2. KVASCI.....	29
5.2.1. KARAKTERISTIKE RODA <i>SACCHAROMYCES</i>.....	30
5.2.1.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....	30
5.3. PRIMENA FERMENTATIVNIH MIKROORGANIZAMA U PROIZVODNJI KISELOG TESTA.....	32
6. ANALITIČKE METODE PRIPREME UZORAKA ZA ODREĐIVANJE OSTATAKA PIRIMIFOS-METILA, HLORPIRIFOS-METILA I BIFENTRINA U FERMENTISANOM ŽITNOM SUPSTRATU.....	32
7. EKSPERIMENTALNI DIZAJN.....	35

MATERIJAL I METODE

8. UTVRĐIVANJE FAZA RASTA I GENERACIJSKOG VREMENA LACTOBACILLUS PLANTARUM I SACCHAROMYCES CEREVISIAE.....	39
9. OPTIMIZACIJA USLOVA MIKROBIOLOŠKIH FERMENTACIJA.....	40
9.1. PRIPREMA INOKULUMA ZA FERMENTACIJU SUPSTRATA.....	40
9.2. PRIPREMA SUPSTRATA ZA FERMENTACIJU.....	41
9.3. OPTIMIZACIJA USLOVA MLEČNOKISELINSKE I KVASNE FERMENTACIJE PŠENICE.....	41
10. ISPITIVANJE UTICAJA PIRIMIFOS-METILA, HLORPIRIFOS- METILA I BIFENTRINA NA RAST I AKTIVNOST FERMENTATIVNIH MIKROORGANIZAMA.....	43
11. ISPITIVANJE UTICAJA PIRIMIFOS-METILA, HLORPIRIFOS- METILA I BIFENTRINA NA EFIKASNOST PROCESA MIKROBIOLOŠKIH FERMENTACIJA ŽITNOG SUPSTRATA.....	44
12. ISPITIVANJE EFIKASNOSTI RAZLIČITIH METODA PRIPREME UZORAKA ZA ODREĐIVANJE OSTATAKA PIRIMIFOS-METILA, HLORPIRIFOS-METILA I BIFENTRINA U FERMENTISANIM UZORCIMA PŠENICE.....	45
12.1. PRIPREMA UZORAKA ZA ISPITIVANJE METODA.....	45
12.2. METODE PRIPREME UZORAKA ZA ODREĐIVANJE OSTATAKA ISPITIVANIH PESTICIDA.....	46
12.2.1. DETEKCIJA I KVANTIFIKACIJA ISPITIVANIH PESTICIDA.....	48
13. ISPITIVANJE UTICAJA MLEČNOKISELINSKE I KVASNE FERMENTACIJE NA DEGRADACIJU PIRIMIFOS-METILA, HLORPIRIFOS-METILA I BIFENTRINA.....	48
13.1. PRIPREMA FERMENTACIONOG PŠENIČNOG SUPSTRATA.....	48
13.2. ISPITIVANJE SPONTANE DEGRADACIJE PESTICIDA I DEGRADACIJE POD DEJSTVOM STERILIZACIJE U CILJU UTVRĐIVANJA DOPRINOSA PROCESA FERMENTACIJE U DEGRADACIJI PESTICIDA.....	49

13.3 ISPITIVANJE UTICAJA FERMENTACIJE PŠENIČNOG SUPSTRATA NA DEGRADACIJU PESTICIDA UZ OPTIMIZACIJU USLOVA FERMENTACIJE U CILJU POSTIZANJA MAKSIMALNOG STEPENA DEGRADACIJE.....	50
REZULTATI I DISKUSIJA	
14. UTVRĐIVANJE FAZA RASTA I GENERACIJSKOG VREMENA MIKROORGANIZAMA.....	52
14.1. FAZE RASTA I GENERACIJSKO VREME <i>LACTOBACILLUS PLANTARUM</i>	52
14.2. FAZE RASTA I GENERACIJSKO VREME <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	53
15. OPTIMIZACIJA USLOVA MIKROBIOLOŠKIH FERMENTACIJA.....	55
15.1. OPTIMIZACIJA USLOVA MLEČNO-KISELINSKE FERMENTACIJE PŠENICE.....	55
15.2. OPTIMIZACIJA USLOVA KVASNE FERMENTACIJE PŠENICE.....	64
16. ISPITIVANJE UTICAJA PIRIMIFOS-METILA, HLORPIRIFOS METILA I BIFENTRINA NA RAST I AKTIVNOST FERMENTATIVNIH MIKROORGANIZAMA.....	72
16.1. ISPITIVANJE UTICAJA PIRIMIFOS-METILA, HLORPIRIFOS-METILA I BIFENTRINA NA RAST I AKTIVNOST <i>LACTOBACILLUS PLANTARUM</i>	72
16.2. ISPITIVANJE UTICAJA PIRIMIFOS-METILA, HLORPIRIFOS-METILA I BIFENTRINA NA RAST I AKTIVNOST <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	78
17. ISPITIVANJE UTICAJA PIRIMIFOS-METILA, HLORPIRIFOS-METILA I BIFENTRINA NA EFIKASNOST PROCESA MIKROBIOLOŠKIH FERMENTACIJA ŽITNOG SUPSTRATA.....	84
17.1. ISPITIVANJE UTICAJA PESTICIDA NA EFIKASNOST PROCESA MLEČNOKISELINSKE FERMENTACIJE ŽITNOG SUPSTRATA.....	84
17.2. ISPITIVANJE UTICAJA PESTICIDA NA EFIKASNOST PROCESA KVASNE FERMENTACIJE ŽITNOG SUPSTRATA.....	89
18. ISPITIVANJE EFIKASNOSTI RAZLIČITIH METODA PRIPREME UZORAKA ZA ODREĐIVANJE OSTATAKA PIRIMIFOS-METILA, HLORPIRIFOS-METILA I BIFENTRINA U FERMENTISANIM UZORCIMA PŠENICE.....	95

19. ISPITIVANJE UTICAJA MLEČNOKISELINSKE I KVASNE FERMENTACIJE NA DEGRADACIJU PIRIMIFOS-METILA, HLOPIRIFOS-METILA I BIFENTRINA.....	101
19.1. ISPITIVANJE SPONTANE DEGRADACIJE PESTICIDA I DEGRADACIJE POD DEJSTVOM STERILIZACIJE.....	101
19.2. ISPITIVANJE UTICAJA FERMENTACIJE PŠENIČNOG SUPSTRATA NA DEGRADACIJU PESTICIDA UZ OPTIMIZACIJU USLOVA FERMENTACIJE U CILJU POSTIZANJA MAKSIMALNOG STEPENA DEGRADACIJE.....	109
19.2.1. ISPITIVANJE UTICAJA FERMENTACIJE PŠENIČNOG SUPSTRATA SA <i>LACTOBACILLUS PLANTARUM</i> NA DEGRADACIJU PESTICIDA.....	109
19.2.2. ISPITIVANJE UTICAJA FERMENTACIJE PŠENIČNOG SUPSTRATA SA <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> NA DEGRADACIJU PESTICIDA.....	133
20. ZAKLJUČCI.....	157
LITERATURA.....	160
PRILOZI	
Prilog 1.....	182
Prilog 2.....	183

UVOD

UVOD

S obzirom na intenziviranje primene pesticida u poljoprivredi, naročito u razvijenijim zemljama, ostaci ovih jedinjenja se često detektuju u svim segmentima životne sredine. Naime, uprkos napredku u oblasti proizvodnje pesticida, nakon njihove primene određeni deo aktivne materije dospeva u životnu sredinu, što za posledicu ima i povećanje zagađenosti uzgajanih konzumnih biljaka. Porast kontaminacije prehrambenih proizvoda pesticidima sa ozbiljnim posledicama na ljudsko zdravlje doveo je do potrebe za kontinuiranim monitoringom nivoa zagađenosti ovim agrohemijskim sredstvima kako u biljnim kulturama tako i u konzumnim proizvodima. Takođe, sve je veća zainteresovanost za razvijanje strategije u cilju poboljšanja bezbednosti hrane sa aspekta zagađenosti pesticidima. Shodno tome, u porastu je broj publikacija koje se odnose na ispitivanje uticaja tehnika procesuiranja hrane u toku prerade biljnog materijala na smanjenje nivoa zagađenosti pesticidima. S obzirom da je jedan od najstarijih, a danas veoma zastupljenih vidova prerade hrane fermentacija, ono što poslednjih godina privlači sve veću pažnju je mogućnost korišćenja fermentacionih procesa u cilju smanjenja količine ostataka pesticida, tj. uticaj fermentativnih mikroorganizama na degradaciju ostataka pesticida u prehrambenim proizvodima.

Prva istraživanja u oblasti uticaja procesa fermentacije na degradaciju ostataka pesticida počela su krajem 60-tih i početkom 70-tih godina prošlog veka i ubrzo je usledio značajan broj radova u kojima je mogućnost degradacije različitih grupa pesticida ispitivana u različitim fermentacionim sistemima. Iako se u to vreme najveći broj rezultata odnosio na mikrobnu degradaciju pesticida u zemljištu ubrzo su usledila istraživanja koja su ukazala na pozitivan efekat fermentacije na redukciju nivoa ostataka pesticida u prehrambenim proizvodima pri čemu je zapažen pozitivan uticaj fermentativne aktivnosti brojnih mikroorganizama korišćenih u ove svrhe na smanjenje nivoa zagađenosti pesticidima kod finalnog proizvoda. Na osnovu literaturnog pregleda se može zaključiti da su istraživanja uticaja mikrobiološke fermentacije u toku tehnološke prerade zrnastih plodova žitarica, kao jednih od najrasprostranjenijih uzgojnih biljaka, na redukciju ostataka pesticida nedovoljno zastupljena. Kako su prerađevine od žita u izrazito velikoj meri zastupljene u

ljudskoj ishrani, naročito imajući u vidu da se čak trećina ukupno proizvedene pšenice na svetskom nivou iskoristi samo za proizvodnju hleba kao jednog od osnovnih fermentisanih prehrambenih proizvoda, evidentna je potreba da se detaljnije ispita uticaj aktivnosti mikroorganizama u toku fermentacije ovih biljnih vrsta na degradaciju, tj. redukciju nivoa ostataka pesticida.

U skladu sa predhodno navedenim, cilj ove disertacije je bio ispitivanje uticaja fermentacije bakterijama mlečno kiselinskog vrenja i kvascima na degradaciju tj. smanjenje nivoa ostataka pesticida u fermentisanim proizvodima žita. U istraživanja je uključena pšenica (*Triticum spelta*) kao vrsta žitarice koja se najčešće koristi kao sirovina za proizvodnju kiselog testa, a za fermentativne mikroorganizme odabrani su mikroorganizmi koji se učestalo upotrebljavaju u fermentacionim tehnologijama prerade žita i to *Lactobacillus plantarum* kao predstavnik bakterija mlečnokiselinskog vrenja i *Saccharomyces cerevisiae* kao predstavnik kvasaca. Od aktivnih materija pesticida u istraživanja su uključeni pirimifos-metil, hlorspirifos-metil i bifentrin koji se primenjuju za tretman pšenice, te se saglasno svojoj primeni mogu detektovati u zrnastim plodovima ove žitarice.

Cilj istraživanja je bio da se utvrdi da li i u kom stepenu fermentacija pšeničnog zrna ispitivanim mikroorganizmima utiče na smanjenje koncentracije rezidua pesticida, kao i kako, odnosno u kom stepenu, rezidue pesticida utiču na proces fermentacije. Cilj rada je bio usmeren ka ispitivanju mogućnosti korišćenja fermentacionog procesa, kao jednog od osnovnog postupka prerade hrane, u svrhu smanjenja nivoa zagađenosti finalnog proizvoda pesticidima.

TEORIJSKI DEO

1. PŠENICA KAO OSNOVNA NAMIRNICA U LJUDSKOJ ISHRANI

Hrana predstavlja prirodnu mešavinu gradivnih i energetskih organskih materija i ključni je faktor za normalno fiziološko i psihološko funkcionisanje svakog čoveka. Među esencijalne konstituente u ljudskoj ishrani svrstava se svakako pšenica (*Triticum sp.*) kao jedna od najvažnijih vrsta žitarica, kako po rasprostranjenosti i proizvodnji, tako i po svojoj hranljivoj vrednosti. Pšenica je najznačajniji ratarski usev u svetu, naročito imajući u vidu da se jedna trećina od prinosa pšenice koristi u prehrambenoj industriji za proizvodnju hleba, testenine, griza, ulja iz klica, skroba, alkohola itd. Prema podacima Organizacije za Hranu i Poljoprivredu Ujedinjenih Nacija (Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO) [1], svetska produkcija pšenice u poslednjih nekoliko godina prelazi 650 miliona tona godišnje sa tendencijom stalnog porasta. Područje proizvodnje pšenice u svetu je preko 217 000 000 ha, s prosečnim prinosom od 3 t/ha. Po proizvodnji, u Srbiji pšenica, nakon kukuruza, zauzima drugo mesto, sa područjem proizvodnje od preko 480 000 hektara i prosečnim prinosom od 3,5 t/ha.

1.1. SPELTA

(*Triticum spelta L.*)

Među najstarijim vrstama pšenice nalazi se spelta ili krupnik (*Triticum spelta L.*). Spelta, poreklom iz južne Azije, doneta je na Bliski Istok pre oko 9000 godina i od tada se proširila na celoj teritoriji Evrope. Ovu pleličastu i jestivu vrstu pšenice poznavali su i koristili za ishranu i stari Rimljani i gajili su je maltene u celoj Imperiji, u Nemačkoj, u alpskim predelima i delovima Panonske nizije. Mađarska plemena, naseljavanjem u Panonsku niziju, nastavila su sa gajenjem i korišćenjem u ishrani ove pšenice, sve do polovine 20. veka. Stvaranjem visokorodnih sorti ova vrlo značajna žitarica skoro je iščezla i održavana je samo u bankama gena širom sveta. Ponovo je otkrivena sedamdesetih godina prošloga veka, buđenjem ekološke svesti stanovništva i neophodnosti potrošnje zdravstveno bezbedne hrane. Poslednjih godina interesovanje za uzgoj ove žitarice je u sve većem porastu, naročito imajući u

vidu izuzetan nutritivni kvalitet biljke i njenu pojačanu otpornost na stresne uslove [2,3].



Slika 1.1.1. Klas i zrno spelte

Nutritivne vrednosti spelte (*Slika 1.1.1.*) su izuzetno visoke u poređenju sa drugim žitaricama. Ovo je žitarica koja čoveku, osim vode, može da obezbedi sve potrebne hranljive sastojke za život, jer sadrži ugljene hidrate, proteine, lipide, vitamine i minerale [4,5]. Zrno spelte sadrži 60,9-65,8 g ugljenih hidrata /100g suve materije, uglavnom u obliku skroba [6]. Osim toga, sadržaj vlakana (12,9-13,8 g/100g suve materije) je veći nego u zrnu pšenice [7]. Isto je i za proteine kojih ima oko 17 %, masti (oko 3 %), a bogata je i mineralnim materijama (cink, selen, litijum, fosfor, magnezijum), vitaminima i celulozom u idealnom odnosu.

Spelta se primenjuje u brojnim sferama prehrambene industrije. Ova žitarica namenjena je kako za ishranu ljudi tako i životinja [8]. Žito spelte se koristi u proizvodnji hleba, testenina, i obroka na bazi žitarica [9], ali znatno manje u proizvodnji alkoholnih pića. Tehnologija pečenja hleba od spelte je identična običnom hlebu, sa proizvodnjom kiselog testa (sourdough) kao jednim od osnovnih biotehnoških procesa.

U proizvodnji spelta je manje zahtevna prema klimatskim, zemljišnim uslovima i prema zahtevima vezanim za agrotehniku. Ona ima debelu opnu, koja je bolje štiti od insekata, ali i od pesticida i drugih otrovnih materija, otporna je prema štetocinama i bolestima i zato je pogodna za bio ili organsku proizvodnju. Njeno gajenje se, pak, ne razlikuje od gajenja obične pšenice, izuzev što zahteva primenu

manjih količina mineralnih đubriva i sredstava za zaštitu bilja, te je zbog toga njeno gajenje rentabilnije od obične pšenice.

2. POLJOPRIVREDA KAO JEDAN OD MOGUĆIH IZVORA ZAGAĐENJA PŠENIČNIH PREHRAMBENIH PROIZVODA

Poznato je da je u svetu i kod nas u prošlosti dolazilo do masovnih i ekstenzivnih šteta u poljoprivredi koje su nanosile biljne i životinjske bolesti s jedne strane, i korovi s druge strane. Između 1842. i 1847. godine zbog štete u poljoprivredi u svetu je vladala glad koja je prouzrokovala smrt četvrtine stanovništva i emigraciju još četvrtine u zemlje Afrike i Australije. Uprkos izuzetnom unapređenju u savremenoj proizvodnji hrane i uvođenju koncepta održivog razvoja sa ciljem veće ekološke delotvornosti poljoprivrede, čak i danas, prema saopštenju Organizacije Ujedinjenih Nacija, svake godine insekti unište trećinu svetskog prinosa žitarica. Prema zvaničnim podacima FAO, ukoliko se u poljoprivredi ne bi koristili pesticidi kao agensi za zaštitu bilja, samo u toku jedne godine štetni insekti zajedno sa biljnim bolestima i korovima smanjili bi svetsku proizvodnju hrane za 25-30 %, a gubici uskladištenih namirnica povećali bi se za još 10-15 %.

Neminovno je da je danas, zahvaljujući upotrebi pesticida, ukupan prinos svih kultura povećan u proseku 2 do 3 puta [10] i nesumnjivo je da pesticidi pružaju čoveku neprocenjivu korist u zaštiti gajenih kultura. Međutim, ono što je takođe evidentno je da se, upravo zbog intenzivirane primene pesticida u poljoprivredi, naročito u razvijenijim zemljama, ostaci ovih jedinjenja danas često detektuju u svim segmentima životne sredine. Naime, uprkos izuzetnom napredku u oblasti proizvodnje pesticida, nakon njihove primene samo 0,1-0,3 % upotrebljene količine pesticida dolazi do ciljnih organizama, dok se preostali deo „izgubi“ u životnoj sredini, što za posledicu ima i povećanje zagađenosti uzgajanih konzumnih biljaka [11,12]. Porast kontaminacije prehrambenih proizvoda pesticidima sa ozbiljnim posledicama na ljudsko zdravlje doveo je do potrebe za kontinuiranim monitoringom nivoa zagađenosti ovim agrohemijskim sredstvima kako u biljnim kulturama tako i u konzumnim proizvodima, a sve je veća zainteresovanost i za razvijanje strategija u cilju poboljšanja bezbednosti hrane sa aspekta zagađenosti pesticidima.

2.1. PESTICIDI

Pod pesticidima se podrazumevaju hemijska jedinjenja organskog, neorganskog i prirodnog porekla, koja se primenjuju u poljoprivredi, šumarstvu, veterinarstvu, prehrambenoj industriji i komunalnoj higijeni radi suzbijanja fitopatogenih organizama, štetnih insekata, nematoda, glodara, ptica, kao i za suzbijanje korova i regulisanje rasta biljaka.

Istorija korišćenja pesticidnih sredstava veoma je duga [13]. Sumpor je korišćen u Kini još hiljadite godine pre nove ere kao fungicidno sredstvo, a u Evropi je primenjen kao fungicid tek 1800. godine. Ekstrakt lista duvana je korišćen 1690. godine kao insekticid. Godine 1867. mešavina bakra i arsenika masovno je korišćena za kontrolu krompirove zlatice, bakar-sulfat je 1882. godine uveden u zaštitu vinove loze, a 10 %-ni rastvor sumporne kiseline je na početku XX veka služio za uništavanje nekih vrsta korova. Godine 1922. obavljeno je prvo zaprašivanje pesticidima iz vazduha, a 1930. godina se smatra početkom ere korišćenja modernih pesticida.

Pesticidi danas predstavljaju veoma značajnu komponentu moderne poljoprivredne industrije. Pokušaji da se gubici svedu na što manju meru doveli su do razvoja širokog spektra jedinjenja koja se danas upotrebljavaju kao pesticidi. Na svetskom tržištu trenutno je registrovano više od 1180 pesticida [14] od čega 435 herbicida, 335 insekticida i 410 fungicida, a svi oni se na tržištu mogu naći u obliku 32 800 formulacija [15]. Prema podacima iz Evropske Unije, na tržištu je u ovom trenutku registrovano više od 1140 pesticida [16], dok je prema izveštaju Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije (2010) u našoj zemlji u prometu 327 aktivnih materija pesticida, formulisanih u vidu 878 pesticidnih preparata [17].

Kod pesticida se mogu razlikovati tri grupe osobina koje karakterišu njihova svojstva, a to su fizičke, hemijske i toksikološke osobine.

Fizičke osobine pesticida određuju njihovo ponašanje i postojanost u različitim uslovima u kojima se ova jedinjenja mogu naći. Poznavanje fizičkih osobina pesticida preduslov je za njihovu uspešnu primenu, za razumevanje njihovog ponašanja u zemljištu, vodi i atmosferi, za njihovo čuvanje, kao i za primenu adekvatnog načina uklanjanja rezidua pesticida iz životne sredine. Veliki praktični

značaj, naročito u pogledu uklanjanja pesticida iz životne sredine imaju sledeće fizičke osobine:

- tačka ključanja
- isparljivost
- napon pare
- dipolni momenat
- rastvorljivost

Tačka ključanja pesticida zavisi od njegove prirode i predstavlja temperaturu na kojoj pesticid iz tečnog agregatnog stanja prelazi u paru, odnosno gas. Tačka ključanja predstavlja važnu karakteristiku pesticida, jer se na osnovu nje može prosuditi o postojanosti tog jedinjenja u određenim uslovima. Pesticidi sa nižom tačkom ključanja kraće se zadržavaju na zemlji i delovima biljaka, tj. brže isparavaju, dok pesticidi sa visokom tačkom ključanja teže isparavaju i samim tim duže se zadržavaju na delovima biljaka.

Pod *isparljivošću* se podrazumeva količina pesticida koja može da ispari u vazduh (pređe iz čvrstog u gasovito agregatno stanje na određenoj temperaturi) do maksimalne koncentracije (koncentracije zasićenja) i izražava se u g/cm^3 .

Napon pare pesticida je pritisak pri kome se na datoj temperaturi uspostavlja ravnoteža između gasovite i čvrste ili tečne faze. Povećava se sa povećanjem temperature i obrnuto, a kada se izjednači sa postojećim atmosferskim pritiskom dovodi do ključanja pesticida u tečnom agregatnom stanju. Napon pare je u vezi sa tačkom ključanja pesticida i ukoliko je on viši, tačka ključanja je niža i obrnuto. Pesticidi sa malim naponom pare isparavaju sporo i obrnuto, i stoga poznavanje napona pare pesticida ima praktičan značaj.

Dipolni momenat je proizvod rastojanja između pozitivnog i negativnog naelektrisanja u molekulu i jačine jednog od naelektrisanja. On određuje hemijske osobine pesticida, odnosno njegovo učešće u reakcijama koje se odigravaju u rastvoru. Od polarnosti pesticida zavise specifična moć rastvaranja, isparljivost, stepen asocijacije. Polarni pesticidi bolje se rastvaraju u polarnim jedinjenjima i manje su isparljivi od nepolarnih. Oni su po pravilu aktivni rastvarači, koji utiču na osobine drugih polarnih jedinjenja u rastvoru, učestvuju u intermedijarnim reakcijama i utiču na smer i brzinu konačne reakcije.

Rastvorljivost pesticida u vodi ili drugim rastvaračima predstavlja količinu pesticida koja se pri određenoj temperaturi rastvara u jedinici zapremine rastvarača i raste sa porastom temperature. Rastvorljivost pesticida je važna fizička osobina jer od nje zavisi apsorpcija pesticida, pokretljivost u živim organizmima i zemljištu. Pesticidi koji su slabo rastvorni u vodi teže se spiraju sa tretiranih biljnih delova i zemljišta. U dekontaminaciji i detekciji pesticida veoma je važno poznavati rastvorljivost pesticida, jer od toga zavisi na koji će se način i pomoću kojih supstanci izvršiti njegova dekontaminacija, odnosno ekstrakcija iz različitih materijala.

Hemijske osobine pesticida zavise pre svega od strukture molekula i one određuju reaktivnost pesticida, pogotovo imajući u vidu da kod pesticida postoji direktna veza između hemijske strukture i bioaktivnog odnosno toksičnog dejstva [18]. Izvesni atomi i hemijski radikali koji ulaze u sastav aktivnih materija direktno unose svoje toksične osobine, kao što je slučaj sa halogenim elementima ili teškim metalima, pa tako npr. jedinjenja sa jednim atomom hlora u molekulu imaju samo fumigantno dejstvo, a sa dva i više ispoljavaju insekticidno i baktericidno dejstvo [19]. Osim ovoga, poznato je da i stabilnost pesticida zavisi od njihovih hemijskih osobina, pa zbog toga različiti pesticidi različito reaguju na unutrašnje i spoljašnje uticaje. Pojedini pesticidi se pri dužem stajanju menjaju i, usled razlaganja ili polimerizacije, gube bitne hemijske karakteristike. Osim toga promenom temperature, pritiska vode ili kiseonika, pH ili svetlosti, stabilnost nekih pesticida se drastično smanjuje skoro do nivoa da postaju neaktivni i neupotrebljivi. Tako je poznavanje hemijskih karakteristika pesticida, koje upućuju na njegovu stabilnost pod različitim varijacijama spoljašnjih uticaja, od velikog značaja za utvrđivanje adekvatnog načina uklanjanja njihovih rezidua iz životne sredine.

Toksikološke osobine pesticida karakterišu otrovnost i način delovanja na živi organizam. Toksičnost uglavnom zavisi od sposobnosti delovanja pesticida na različite konstituente ćelije koji igraju važnu ulogu u biohemijskim i fiziološkim procesima. Uzimajući u obzir dokazanu toksičnost pesticida, i činjenicu da pesticidi i njihovi metaboliti ulaze u ljudski organizam preko lanca ishrane i vode, rastuća zabrinutost javnosti za zdravlje ljudi u vezi sa ostacima pesticida u hrani je dovela do pooštavanja regulative koja se odnosi na maksimalno dozvoljene količine ostataka

pesticida (MDK) u namirnicama. Određivanje MDK vrednosti se temelji na poznavanju preporučene doze primene datog pesticida i propisane karence tj. vremenskog perioda koji je potrebno da prođe od primene pesticida do berbe ili setve. Do danas je Svetska Zdravstvena Organizacija propisala više od 17000 MDK vrednosti za razne namirnice i brojne pesticide [20-23], a naša zemlja je 2010. godine, donela „Pravilnik o maksimalno dozvoljenim količinama ostataka sredstava za zaštitu bilja u hrani i hrani za životinje i o hrani i hrani za životinje za koju se utvrđuju maksimalno dozvoljene količine ostataka sredstava za zaštitu bilja“, čime su MDK vrednosti usklađene sa vrednostima u Evropskoj uniji [24]. Osim toga, procena bezbednosti korišćenja pesticida vrši se od strane nadležnih stručnjaka za ova pitanja. Na međunarodnom nivou pri WHO/FAO postoji posebna komisija za rezidue pesticida (Joint Meeting on Pesticide Residues, JMPR) koja redovno evaluira sve dostupne podatke o korišćenju pesticida i njihovoj toksičnosti i uticaju na životnu sredinu i na osnovu toga donosi pozitivne liste pesticida koji se mogu koristiti, preporuke za MDK, procene dijetarnog unosa, klasifikacije toksičnosti i dr. [25].

Pesticidi se mogu podeliti na razne načine. U literaturi se susreću podele prema nameni, tj. prema grupi živih organizama koje suzbijaju, prema načinu i karakteru delovanja, prema toksičnosti, kancerogenosti, mutagenosti, perzistentnosti, pripadnosti hemijskoj grupi jedinjenja i mehanizmu delovanja [26]. Osnovna podela pesticida izvršena je prema njihovom dejstvu na:

- herbicide – pesticidi za uništavanje korovskih biljaka
- insekticide – pesticidi za suzbijanje insekata
- fungicide – pesticidi za suzbijanje i prevenciju pojave fitopatogena
- rodenticide – pesticidi za uništavanje glodara

2.1.1. INSEKTICIDI

Insekticidi su grupa pesticida koja služi za suzbijanje štetnih insekata u polju i u skladištima. Razvoj insekticida počeo je u XIX veku, a polovinom XIX veka već su bili poznati prirodni insekticidi, kao što su nikotin, piretin, rotenoid, kao i preparati na bazi arsena. Prvi nemetalni organski insekticid upotrebljen je u Nemačkoj 1892. godine (4,6-dinitro-2-metil-fenol antinonin), ali se nije održao zbog visoke toksičnosti. Do pojave prvog univerzalnog insekticida sa kontaktnim dejstvom došlo

je zahvaljujući Müller-u, čiji je DDT od 1939. godine našao primenu u celom svetu, međutim, zbog izrazite toksičnosti i pojave hroničnih trovanja, već 1972. godine zabranjen je za upotrebu u Americi, a ubrzo i u ostalim zemljama širom sveta. Od tog perioda otkriven je čitav niz jedinjenja koja ispoljavaju specifično delovanje na insekte. Danas, insekticidi obuhvataju nekoliko klasa jedinjenja: organohlorne insekticide, organofosfate, karbamate, piretroide i neonikotinoide.

Organohlorni insekticidi (heptahlor, endosulfan, dieldrin, pentahlorfenol itd.) se kao grupa danas više ne preporučuju za upotrebu zbog velike toksičnosti za ljude i životinje i zbog velike perzistentnosti u životnoj sredini, a mnogi od njih su i zabranjeni u zemljama širom sveta (DDT, aldrin, lindan).

Organofosfati su grupa insekticida koja deluje na nervni sistem insekata preko enzima acetilholinesteraze i takođe se u manjoj meri preporučuje za upotrebu naročito zbog čestih pojava akutnih trovanja ljudi i životinja. Međutim, njihova perzistentnost u prirodi je izrazito mala, pa su zbog toga često upotrebljavani DDT, dieldrin i aldrin, zamenjeni hlorspirifosom, hlorspirifos-metilom, diazinonom, pirimifos-metilom, parationom, malationom, i drugim insekticidima iz ove grupe. U današnje vreme se organofosfati veoma učestalo koriste zbog njihove efikasnosti, uprkos upozorenjima o toksičnosti od strane EPA-e. Upravo zbog potencijalne opasnosti koju predstavljaju za ljude, naučnici širom sveta pridaju veliki značaj pronalaženju efikasnog načina za uklanjanje rezidua organofosfata iz životne sredine, a naročito iz prehrambenih proizvoda.

Karbamati imaju sličan mehanizam dejstva na nervni sistem kao i organofosfati, međutim inaktivacija enzima acetilholinesteraze pod dejstvom karbamata je reverzibilna, pa iz tog razloga ovi insekticidi imaju donekle manje toksični efekat na životinje i ljude. Zbog toga se aldikarb, karbofuran, oksamil, metomil i drugi insekticidi iz ove grupe u velikoj meri koriste za efektivno suzbijanje štetnih insekata.

Piretroidi su sintetisani na osnovu piretruma, prirodne komponente sa insekticidnim dejstvom izolovane iz ekstrakta cvetova biljke *Chrysanthemum sp.* Ova jedinjenja ispoljavaju mnogo manju akutnu toksičnost u odnosu na organofosfate i karbamate, i zbog toga se često koriste za suzbijanje insekata u domaćinstvima, kao i za zaštitu domaćih životinja od parazitnih insekata i za dezinfekciju u pogonima za

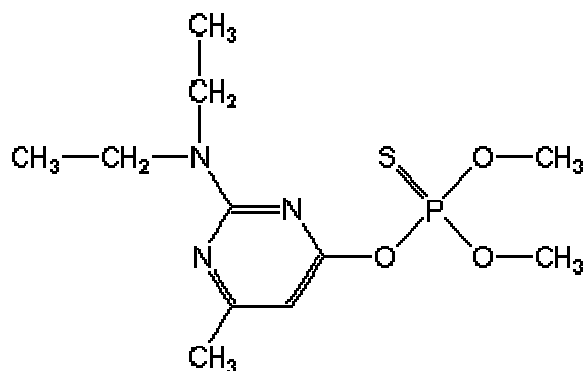
proizvodnju hrane. Njihov osnovni nedostatak u pogledu efikasnosti je brza razgradivost pod dejstvom svetlosti. Danas se u svim sferama zaštite od štetnih insekata uspešno koriste brojni piretroidi kao što su bifentrin, ciflutrin, cipermentrin, deltametrin, lambda-cihalotrin, permetrin i drugi.

Neonikotinoidi su sintetički analozi prirodnog insekticida nikotina, sa mnogo manjom akutnom toksičnošću za sisare i mnogo većom perzistentnošću. To su insekticidi najnovije generacije, sintetisani 90-tih godina prošlog veka, a imidakloprid iz ove grupe pesticida je trenutno najviše korišćen insekticid širom sveta. Osim njega, ostali neonikotinoidi, kao što su acetamiprid, tiametoksam i tiakloprid, u velikoj meri se koriste za suzbijanje zemljišnih i skladištnih insekata, folijarni tretman zasada žitarica, leguminoza, voća, povrća i pamuka, kao i za suzbijanje parazitnih insekata domaćih životinja.

2.1.1.1. Insekticidi za suzbijanje insekata u uskladištenom žitu

Od brojnih aktivnih materija sa insekticidnim efektom koje pripadaju različitim opisanim grupama insekticida, za suzbijanje insekata u uskladištenom žitu, kao najrasprostranjenijoj uzgojnoj biljci na našem podneblju, izrazito je zastupljena upotreba kontaktnih insekticida. Kontaktnim insekticidima, koji pripadaju organofosfatima i piretroidima, tretira se skladišni prostor ili direktno uskladišteno žito, a primena ovih pesticida naročito je zastupljena u onim skladištima gde je potrebno obezbediti dugotrajno čuvanje žita [27-30]. Među aktivne materije registrovane za ovu primenu spadaju organofosfati pirimifos-metil i hlorspirifos-metil kao i piretroid bifentrin.

Pirimifos-metil (O-2-dietilamino-6-metilpirimidin-4-il-O,O-dimetil-tiofosfat) (*Slika 2.1.1.1.1.*) je nekumulativni organofosfatni insekticid i akaricid širokog spektra dejstva koji deluje kontaktno, digestivno i respiratorno, penetrira u biljna tkiva, a ispoljava i translaminarnu aktivnost. Ovaj pesticid je jedan od najčešće korišćenih za tretman skladišnog prostora, ambalaže ili direktno biljnih proizvoda, a njegova efikasnost se ogleda u produženoj insekticidnoj aktivnošću u skladištima [31].



Slika 2.1.1.1.1. Strukturna formula pirimifos-metila

Osnovna svojstva ovog jedinjenja kao insekticida prvobitno su opisani 1960-tih godina u Velikoj Britaniji, dok ga je u primenu uvela firma ICI Plant Protection Division (danas Zeneca Agrochemicals), patent GB 1019227.

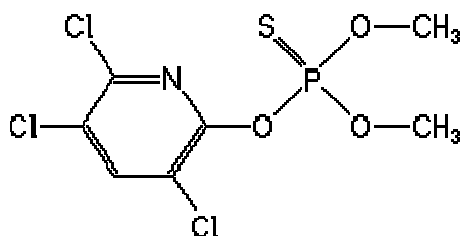
Pirimifos-metil je bleđožuta tečnost na temperaturi preko 18 °C, umereno isparljiva sa malim naponom pare (2 mPa na 20 °C, 6,9 mPa na 30 °C i 22 mPa na 40 °C), slabo rastvorljiva u vodi (10 mg/mL, pri pH 7 na 20 °C), a rastvorna u većini organskih rastvarača. Na temperaturama preko 120 °C dolazi do degradacije ovog insekticida, dok je na sobnoj temperaturi stabilan do šest meseci. Brzo se razlaže do hidroksi derivata u jakim kiselinama, pri čemu npr. pri pH=4 vreme za koje se raspadne polovina prvobitne količine pesticida (DT_{50}) u vodi iznosi 2 dana. Umereno je stabilan u bazama, pri čemu na pH=9, DT_{50} iznosi 75 dana. Stabilan je u neutralnom vodenom rastvoru, a pri pH=7 DT_{50} u vodi iznosi 117 dana [32]. Glavni produkt hidrolize pirimifos-metila je pirimidinol. Osim hidrolitičke hemijske degradacije, ovaj insekticid podložan je i izuzetno brzom fotolizi ($DT_{50} < 1$ sat), a produkt fotolitičke razgradnje je 2–dietilamino–6–metil–pirimidin–4–ol.

Osnovni produkti metabolizma pirimifos-metila u biljnom tkivu su pirimidinil, 2 – dietilamino – 6 – metilpirimidin – 4 – ol, 2 – etilamino – 6 – metilpirimidin – 4 – ol i 2 – amino – 6 – metilpirimidin – 4 – ol, pri čemu približno 90 % metabolita ovog insekticida čini 2–dietilamino–6–metilpirimidin–4–ol. Pirimifos-metil veoma brzo isparava nakon aplikacije na biljke, tako da se nakon 2-3 dana na biljnom materijalu zadržava svega 10 % insekticida, uključujući i njegove metabolite. Sa uskladištenim žitaricama je drugačije, pa je nakon tretiranja u skladištima DT_{50} pirimifos-metila veće od 2 meseca.

Maksimalno dozvoljene količine (MDK) pirimifos-metila u namirnicama propisane su od strane više međunarodnih organizacija i država. Evropska unija propisala je MDK vrednosti za pirimifos-metil prisutan u namirnicama za ljudsku upotrebu, a naša zemlja je 2010. godine donela pravilnik kojim su vrednosti MDK usklađene sa vrednostima u Evropskoj uniji [24] i po kojem se MDK za ovaj insekticid kreće od 0,05 do 5 mg/kg. Za pšenicu, tj. sve žitarice, ova vrednost je 5 mg/kg.

Uopšteno gledano, može se zaključiti da pirimifos-metil nema veliki negativni uticaj na životnu sredinu jer mu je DT_{50} u zemljištu od 3,5 do 25 dana, a stepen fotolize veoma visok. Osim toga nije utvrđen kao kancerogen, teratogen, genotoksičan ni neurotoksičan za miševe, pacove i zečeve. Po najnovijem pravilniku o kriterijumina za razvrstavanje otrova Republike Srbije [33] ova aktivna materija svrstana je u III grupu otrova kao srednje toksična materija (Xn), međutim, po najnovijoj klasifikaciji Svetske Zdravstvene Organizacije ovaj pesticid se svrstava u II grupu otrova kao visoko toksična materija (T) i kao materija opasna po životnu sredinu (N) [34]. Ovaj insekticid se pokazao kao izuzetno toksičan za vodene organizme, što je u skladu sa izrazito sporom hidrolizom u neutralnom vodenom rastvoru, i stoga je kategorizovan kao R50/53 (veoma otrovan za vodene organizme, može prouzrokovati dugotrajna neželjena dejstva na vodenu sredinu). Osim toga izrazito je toksičan i za pčele (R57), i kategorizovan je i kao R22 (štetan ako se proguta).

Hlorpirifos-metil (0,0-dimetil-0-3,5,6-trihlor-2-piridil-fosfortioat) (*Slika 2.1.1.1.2.*) je nesistemska insekticid iz grupe organofosfata, širokog spektra dejstva. Deluje kontaktno, digestivno i respiratorno, a male je toksičnosti za sisare [35].



Slika 2.1.1.1.2. Strukturna formula hlorpirifos-metila

Osnovna svojstva ovog jedinjenja kao insekticida prvi su opisali Rigterink i Kenaga 1966. godine [36], dok ga je u primenu uvela firma Dow Chemical Co.

(danas Dow AgroSciences), patent US 3244586. Registrovan je 1985. godine za tretman skladišnog prostora i žita u skladištima, i danas se u velikoj meri upotrebljava u poljoprivredi.

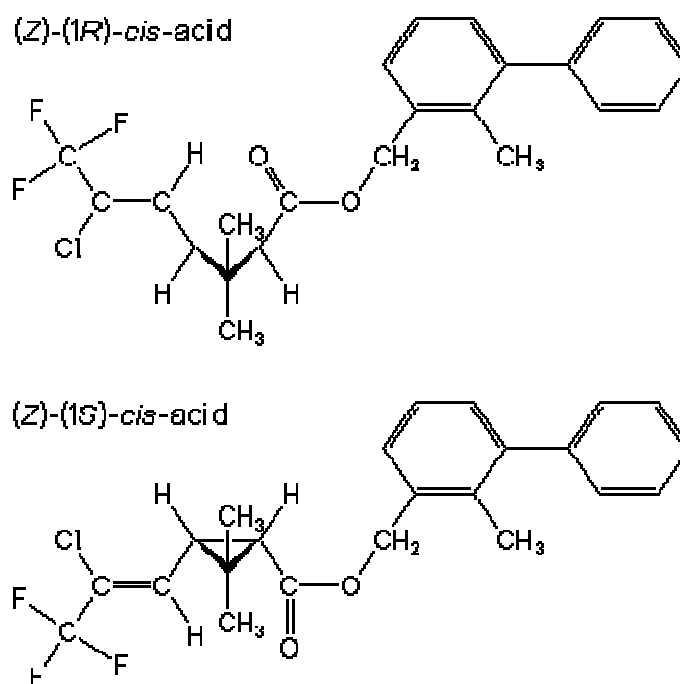
Hlorpirifos-metil je bela kristalna supstanca karakterističnog mirisa, sa tačkom topljenja od 45,5-46,5 °C. Umereno je isparljiv, sa malim naponom pare (3 mPa na 25 °C), izuzetno male rastvorljivosti u vodi (2,6 mg/L na 20 °C), a izrazito rastvoran u acetonu, metanolu i heksanu. Na sobnoj temperaturi je stabilan, međutim u vodenom rastvoru pri višim pH vrednostima (pH=8) brzo hidrolizuje (manje od 9 dana). Hidroliza molekula je dakle brža pri višim pH vrednostima. Takođe pod uticajem UV zračenja dolazi do ubrzane fotodegradacije ovog jedinjenja. Umereno je postojan u vodi bez značajnih razlika pri promenama pH vrednosti (vreme poluraspada je 27, 21 i 13 dana pri pH=4, 7 i 9). Glavni produkt hidrolize hlorpirifos-metila je 3,5,6-trihloro-2-piridinol i des-metil-hlorpirifos-metil. Osim hidrolitičke hemijske degradacije, ovaj insekticid podložan je i umereno brzom fotolizi koja varira od temperature (DT₅₀ mereno u junu iznosi 1,8 dana a u decembru 3,8 dana), a produkt fotolitičke razgradnje je 3,5,6-trihloro-2-piridinol.

Osnovni produkti metabolizma hlorpirifos-metila su hlorpirifosmetil-okson, des-metil-hlorpirifos-metil, 3,5,6-trihloro-2-piridinol, S-metil izomer hlorpirifos-metil i 2-metoksi-3,5,6-trihloropiridin. Od ovih metabolita u biljnom tkivu najviše se stvara 3,5,6-trihloro-2-piridinol, dok se ostali metaboliti eventualno nalaze u veoma malim količinama. Hlorpirifos-metil kao i pirimifos-metil veoma brzo isparava nakon aplikacije na biljke naročito u toku prve nedelje nakon aplikacije. Međutim, kao i kod predhodno opisanog organofosfata, zadržavanje hlorpirifos-metila na uskladištenim žitaricama je produženo, što je, kao što je ranije pomenuto, osnovni uzrok njegove efikasnosti.

Iako je nakon tretmana u skladištima hlorpirifos-metil izrazito stabilan, ovo jedinjenje ne penetrira u zrna uskladištenih žitarica, tako da se skoro 90 % ostatka ovog insekticida uklanja nakon ljuštenja žita, dok samo 10 % ostaje u brašnu. Međutim ovo nije slučaj sa integralnim brašnom gde se nakon mlevenja zadržava većina aplikovanog pesticida. Maksimalno dozvoljene količine (MDK) hlorpirifos-metila ustanovljene od strane brojnih svetskih i evropskih organizacija kreću se od 0,05 do 3 mg/kg, pri čemu je za pšenicu, tj. sve žitarice, ova vrednost je 3 mg/kg.

Uopšteno gledano, hlörpirifos-metil nema veliki negativni uticaj na životnu sredinu jer mu je DT_{50} u zemljištu od 1,5 do 33 dana, a stepen mikrobne degradacije visok. Osim toga nije utvrđen kao kancerogen, teratogen, genotoksičan ni neurotoksičan. Klasifikacija najnovijeg pravilnika o kriterijumima za razvrstavanje otrova Republike Srbije [33] kao i Svetske Zdravstvene Organizacije svrstala je ovaj pesticid u III grupu otrova kao srednje toksičnu materiju (Xn) sa nadražujućim dejstvom (Xi) i kao materiju opasnu po životnu sredinu (N) [34]. Pokazao se kao izuzetno toksičan za vodene organizme i stoga je kategorizovan kao R50/53 (veoma otrovan za vodene organizme, može izazvati dugotrajne negativne efekte u vodenoj sredini). Osim toga izrazito je toksičan i za pčele (R57), štetan je u dodiru sa kožom i ako se proguta (R21/22) i nadražuje oči i kožu (R36/38).

Bifentrin (2 – metilbifenil – 3 – il – metil – (Z) – (1R) – cis – 3 – (2 – hlor – 3,3,3 – trifluorprop – 1 - enil) – 2,2 – dimetil – ciklopropan – karboksilat) (*Slika 2.1.1.1.3.*) je insekticid iz grupe piretroida koji se od sintetisanja ranih 90-tih godina prošloga veka veoma efikasno koristi za zaštitu uskladištenog žita od štetnih insekata [37,38].



Slika 2.1.1.1.3. Strukturna formula bifentrina

Osnovna svojstva ovog jedinjenja kao insekticida prvi su opisali Doel i sar. i Crossman i sar. 1984. godine [39,40], dok ga je u primenu uvela firma FMC Corp.

Ovaj insekticid deluje kontaktno i digestivno, a utiče na centralni i periferni nervni sistem insekata izazivajući paralizu [41]. Iako izaziva oštećenje nervnog sistema beskičmenjaka i to na nekoliko različitih načina, male je toksičnosti za sisare. Međutim, izražene je toksičnosti za vodene organizme, zbog toga što ima sposobnost inhibicije produkcije enzima ATPaze [42], koji je neophodan za osmoregulaciju i jonski balans kod vodenih organizama.

Bifentrin spada u treću generaciju sintetičkih piretroida i karakteriše ga mnogo veća fotostabilnost i insekticidna aktivnost u odnosu na predhodno sintetisane piretroide [43]. To je nepolarni molekul koji se sastoji od ≥ 97 % cis- izomera i ≤ 3 % trans- izomera. Može da bude u čvstom agregatnom stanju u formi kristala ili voska, ili može da bude viskozna tečnost, sa tačkom topljenja od 68-70 °C. Ima nizak napon pare (0,024 mPa na 25 °C) tako da mu je isparljivost veoma mala, i shodno tome ima veliku tendenciju vezivanja za zemljište. Osim ovoga bifentrin kao izrazito nepolarno jedinjenje veoma je slabe rastvorljivosti u vodi (0,1 mg/mL na 25 °C), a dobro rastvoran u acetonu, hloroformu, dihlormetanu, dietil etru i toluenu, a nešto manje rastvoran u metanolu. Veoma je stabilan u poljskim uslovima, do 2 godine na tempetaruri od 25 °C, i sa vremenom poluraspada od 122 do 345 dana na prirodnoj svetlosti. U vodenom rastvoru na sobnoj temperaturi stabilan je do preko 30 dana, a do njegove abiotičke hidrolize ne dolazi ni u kiseloj, ni u neutralnoj, ni baznoj sredini. Osim toga vreme fotokatalitičkog poluraspada mu je od 276 do 416 dana. Osnovni produkt metabolizma bifentrina je 4'-hidroksi bifentrin.

Bifentrin se ne apsorbuje od strane biljaka niti je utvrđena njegova translokacija kroz biljke, a poznato je da ne metaboliše u biljkama i da je veoma stabilan. Količina ostataka bifentrina na kraju skladištenja žitarica na 20 i 25 °C je u principu ista kao i na početku, tj. neposredno nakon primene. Manji procenat rezidua bifentrina se gubi u toku procesa mlevenja celog zrna žita, a nešto veći u procesu proizvodnje belog brašna. Maksimalno dozvoljene količine (MDK) bifentrina ustanovljene od strane brojnih svetskih i evropskih organizacija kreću se od 0,05 do 10 mg/kg, pri čemu je za pšenicu, tj. sve žitarice, ova vrednost 0,5 mg/kg.

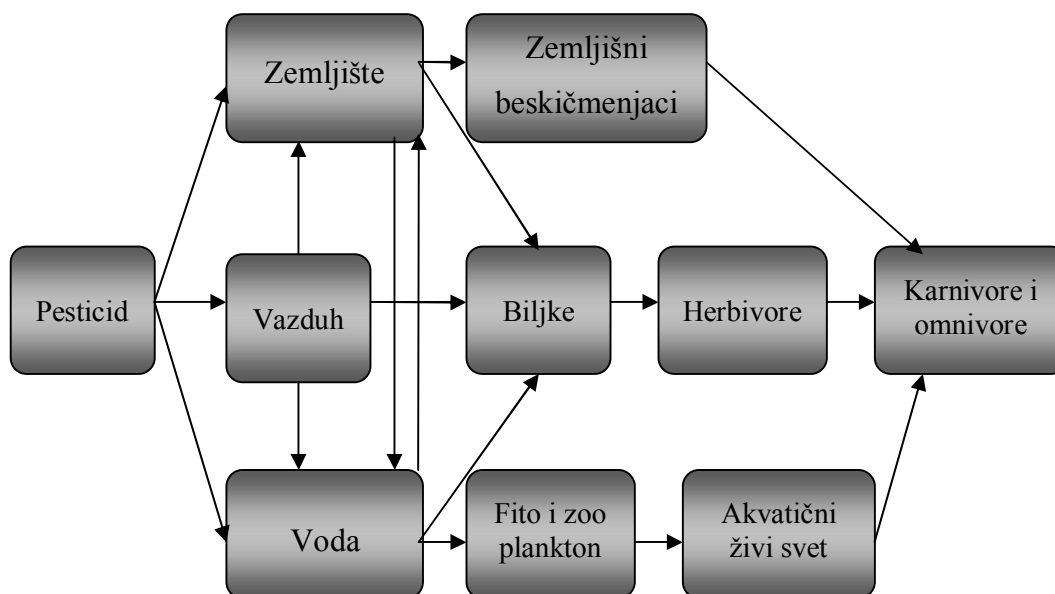
Zbog izražene stabilnosti bifentrin može da ima veliki negativan uticaj na životnu sredinu. Osim toga, iako nije klasifikovan kao kancerogen ni teratogen za ljude, eksperimentima je dokazana njegova kancerogenost za pacove, a neka

istraživanja su pokazala i da ima cito- i genotoksična dejstva na epitelne ćelije amniona čoveka [44]. Po najnovijem pravilniku o kriterijumima za razvrstavanje otrova Republike Srbije [33] i klasifikaciji Svetske Zdravstvene Organizacije [34] ovaj pesticid se svrstava u II grupu otrova kao visoko toksična materija (T) i kao materija opasna po životnu sredinu (N). Otrovan je ako se udiše i proguta (R23/25), a zbog izražene toksičnosti za vodene organizme kategorizovan je kao R50/53 (veoma toksičan za vodene organizme, može izazvati dugotrajne negativne efekte u vodenoj sredini), a izrazito je toksičan i za pčele (R57).

3. ULAZAK PESTICIDA U LANAC ISHRANE

Za razliku od većine zagađujućih supstanci koje se u životnu sredinu unose bez određenog cilja, pesticidi se unose sa namerom da pomognu čoveku povećanjem prinosa u poljoprivredi, voćarstvu, vinogradarstvu i šumarstvu suzbijanjem štetnih organizama. Svetska Zdravstvena Organizacija kao i Evropska Unija danas propisuju veliki broj zakona, direktiva i regulativa kojima se strogo reguliše postupak kako registracije i načina stavljanja u promet pesticida, tako i njihove primene i službene kontrole ostataka pesticida u hrani i hrani za životinje, a sve u okviru ostvarenja koncepta Dobre Poljoprivredne Prakse (Good Agricultural Practice – GAP), a naša zemlja je u poslednjih nekoliko godina donela brojne nove zakone uklađene sa standardima Evropske Unije. Ako bi se primenjivali svi postojeći zakoni vezani za pesticide, problemi sa zagađenjem i štetnim efektima ovih agrohemikalija ne bi postojali. Nažalost, u praksi neretko ovo nije slučaj, pa dolazi do ispoljavanja štetnih efekata pesticida kao posledica neracionalne i nestručne upotrebe, rukovanja i čuvanja, kao i zloupotrebe i udesa tj. havarija.

Neadekvatnom hemizacijom poljoprivrede uspostavljeno je već danas stabilno kruženje pesticida i njihovih degradacionih proizvoda u životnoj sredini. Kao posledicu nalazimo pesticide i njihove rezidue u hrani (*Slika 3.1.*).



Slika 3.1. Mogući putevi zagađenja namirnica pesticidima

Unošenje rezidua pesticida vodom za piće i hranom je najznačajniji put kojim je opšta populacija izložena pesticidima. Namirnice životinjskog porekla mogu da sadrže rezidue pesticida ukoliko se životinje hrane zagađenom biljnom hranom ili ako je na životinjama vršeno suzbijanje parazita i insekata. Namirnice biljnog porekla mogu da sadrže rezidue pesticida kao posledicu tretiranja biljnih kultura u toku rasta i razvoja kao i za vreme njihovog skladištenja, a mogu da resorbuju pesticide iz zemljišta tretiranog pesticidima.

Zagađivanje životnih namirnica pesticidima predstavlja značajan problem. U literaturi je opisano blizu 3.000 slučajeva neprofesionalnog trovanja nastalih posle upotrebe biljaka tretiranih organohlornim i organofosfornim preparatima kao i onim na bazi arsena i žive. Polovina ovih slučajeva vezana je za upotrebu žitarica tretiranih pesticidima, a ostali za upotrebu biljnih proizvoda koji su bili prskani tiofosom, aldrinom, dieldrinom, polihlorkamfenom, arsenom i dr. [45]. U periodu od 1956.-1967. godine zabeležena su brojna trovanja organohlornim i organofosfornim pesticidima iz brašna (Engleska 1956. godine, endrin, broj otrovanih 59; Indija 1958. godine, paration, broj otrovanih 828, broj umrlih 106; Singapur 1960. godine, paration, broj otrovanih 38, broj umrlih 9; Meksiko 1967. godine, paration, broj otrovanih 579, broj umrlih 16; Kolumbija 1967. godine, paration, broj otrovanih 165, broj umrlih 63; Saudijska Arabija 1967. godine, endrin, broj otrovanih 847, broj

umrlih 26). Neki od najtragičnijih slučajeva trovanja hranom zbog neadekvatne upotrebe i neadekvatnog rukovanja sa pesticidima su: • Trovanje semenskim obeleženim žitom u Iraku 1955-1959 i 1971 godine kada je korišćen pesticid na bazi žive ("Granosan"). Predhodno pranje žita nije uklonilo pesticid i trovanje je rezultiralo sa 200 umrlih i velikim brojem preživelih ali sa trajnim posledicama (slepilo, gluvoća, tremor itd.). • Trovanje nemačkim herbicidom "nemacur" u Španiji 1981. godine koje je rezultiralo sa preko 600 umrlih. • Trovanje metil-izocijanatom u indijskom gradu Bopalu 1984. godine usled ispuštanja ove toksične hemikalije (sirovine za dobijanje pesticida) iz fabrike Union Carbide. Ova havarija rezultirala je sa 1500 umrlih i 200 000 sa trajnim oštećenjima. • Blaže trovanje aldikarbom kojim su prskane lubenice u SAD 1958. godine. Stotine ljudi je osetilo simptome trovanja, a preko 10 miliona lubenica je uništeno.

Navedeni, kao i mnogi drugi slučajevi trovanja, kao i porast kontaminacije prehrambenih proizvoda pesticidima sa ozbiljnim posledicama na ljudsko zdravlje, doveli su do potrebe za kontinuiranim monitoringom nivoa zagađenosti ovim agrohemikalijama kako u biljnim kulturama tako i u konzumnim proizvodima. Takođe, sve je veća zainteresovanost za razvijanje strategije u cilju poboljšanja bezbednosti hrane sa aspekta zagađenosti pesticidima. Shodno tome, u porastu je broj publikacija koje se odnose na ispitivanje uticaja tehnika procesuiranja hrane u toku prerade biljnog materijala na smanjenje nivoa zagađenosti pesticidima.

4. PRERADA HRANE KAO MEHANIZAM ZA REDUKCIJU OSTATAKA PESTICIDA

Prerada hrane generalno podrazumeva postupak transformisanja sirovog lako kvarljivog materijala u proizvod poboljšanog kvaliteta i povećane dugotrajnosti [46]. Tehnike prerade hrane obuhvataju sve postupke koji na neki način dovode do transformacije sirovina u hranu bilo da je reč o procesuiranjima u prehrambenim industrijama (mlekarska industrija, pekarska industrija, mlinarstvo, proizvodnja ulja, proizvodnja slada i sl.), procesuiranjima u domaćinstvima (guljenje, pranje, pečenje, kuvanje) ili postupcima skladištenja, konzerviranja i sl.

Mehanizmi koji mogu da dovedu do promene ostataka pesticida u toku skladištenja ili prerade su:

- *Razgradnja pod dejstvom toplote* (degradacija, polimerizacija...). Reakcije ovog tipa brže se odvijaju u tečnoj fazi, a toplota može takođe uticati na gotovo sve mehanizme eliminacije pesticida u toku obrade sirove hrane (rastvaranje, hidroliza, isparavanje, mikrobna razgradnja, metabolizam, enzimaska transformacija)

- *Rastvaranje* koje direktno zavisi od rastvorljivosti pesticida u vodi. Na rastvaranje pesticida pri određenom procesu prerade hrane dodatno utiču temperatura, početna koncentracija pesticida, podeoni koeficijent tj. lipofilnost pesticida, njegov dipolni momenat, kao i pH vodenog medija. Do rastvaranja pesticida može da dođe prilikom pranja namirnica, u proizvodnji vina, pripremi čaja i sl.

- *Hidroliza* je jedan od osnovnih procesa eliminacije većine pesticida u toku različitih načina procesuiranja hrane. U zavisnosti od hemijske strukture pesticida, neka jedinjenja mogu brže da hidrolizuju u kiseloj ili baznoj sredini.

- *Oksidacija* tj. degradacija pesticida putem hemijske oksidacije koju može ubrzati izloženost sirovine kiseoniku, visokoj temperaturi skladištenja, UV zračenju, kao i prisustvo potencijalno oksidativnih komponenti.

- *Fotodegradacija* kojoj su podložni svi pesticidi u većoj ili manjoj meri. Do nje može da dođe u toku sušenja voća na suncu, UV zračenja u cilju produžavanja trajnosti pri skladištenju proizvoda i sl.

- *Promena koncentracije ostatka pesticida zbog moguće promene težine namirnice* pri čemu rast biljke npr. u toku skladištenja nezrelog svežeg voća dovodi do smanjena koncentracija rezidua pesticida, dok gubitak vode u toku skladištenja i/ili sušenja dovodi do povećavanja koncentracija ostataka.

- *Razdvajanje ostataka pesticida između faza* u toku prerade koje zavisi od raspodele pesticida u jestivom delu namirnice kao i lipofilnosti pesticida usled koje može doći do koncentrovanja pesticida rastvornih u mastima i eliminacije pesticida rastvornih u vodi u toku proizvodnje nerafinisanog ulja.

- *Isparavanje* iz uskladištenih namirnica ili hrane nakon sušenja ili kuvanja. Eliminaciji ostataka pesticida putem isparavanja pogoduju visok napon pare kao i nizak podeoni koeficijent jedinjenja. Takođe, isparavanje zavisi od temperature

i vlažnosti u toku skladištenja. Ukoliko je temperatura veća, a vlažnost vazduha manja, dolazi do bržeg isparavanja i obrnuto.

- *Enzimaska transformacija* koja je uglavnom rezultat mikrobne degradacije tj. biotičkog procesa posredovanog mikroorganizmima koji zajedno sa hranjivim materijama troše i pesticide iz supstrata. Do mikrobne degradacije dolazi prilikom fermentacionih procesa (proizvodnja hleba, mlečnih proizvoda, sirćeta, alkoholnih pića i sl.), ali često i u toku skladištenje žitarica.

Brojne publikacije ukazuju na mogućnost promene u količini ostataka pesticida u finalnom prizvodu u toku procesa prerade namirnica. Još davne 1964. godine Langlois i sar. utvrdili su da se DDT i lindan mogu naći u mnogo većoj koncentraciji u puteru proizvedenom od mleka (19,2 tj. 20 ppm) nego u sirovom mleku koje ulazi u proces proizvodnje (0,9 tj. 0,98 ppm) [47], a ova pojava je upravo objašnjena lipofilnošću rezidua ovih pesticida i njihovim razdvajanjem između faza [48]. Sa druge strane, u toku procesa prerade mleka i proizvodnje sireva, evidentirano je i znatno smanjenje rezidua leptofosa kao posledica grejanja i soljenja koji su doveli do izuzetno velike degradacije ovog jedinjenja [49].

Već od 60-tih godina prošlog veka potvrđeno je da kuvanje sirove hrane u mnogome doprinosi smanjenju koncentracije rezidua pesticida u povrću. Tako su već 1968. godine Askew i sar. utvrdili da 30 minutno kuvanje krompira i kupusa dovodi do degradacije dimetoata i to od 37 do 86 % [50]. Slične rezultate dobili su i Elkins i sar. (1972) koji su utvrdili gubitak diazinona (58 %), azinfos-metila (100 %), malationa (96 %), metil-parationa (100 %) i karbofentiona (17 %) u toku kuvanja spanaća 66 minuta na 120 °C [51]. Dalja istraživanja dokazala su da kuvanjem raznih vrsta povrća i voća u toku različitih vremenskih intervala dolazi do značajne degradacije mnogih aktivnih materija pesticida: daminozida u jabukama, ditiokarbamata u grašku, endosulfana u gorkoj dinji, parationa u paradajzu i malationa u kukuruzu i pasulju [52-55]. Kasnije, pojavom mikrotalasne pećnice i uvođenjem njenog korišćenja u domaćinstva, istraživači su počeli da ispituju efekat procesuiranja hrane mikrotalasima na degradaciju pesticida. Istraživanja su pokazala da i kuvanje u mikrotalasnoj pećnici takođe redukuje ostatke trifluralina, hlorspirifosa, dekametrina, cipermetrina i dihlorvosa u pirinču i pasulju i to do 99 %. [56]. Očigledno je da je za degradaciju pesticida u toku kuvanja zaslužna razgradnja pod

dejavom toplote [57], naročito uzimajući u obzir i rezultate koje su publikovali Habiba i sar. (1992) i Radwan i sar. (2005) vezane za eliminaciju profenofosa iz patlidžana i krompira u toku prženja, pečenja i blanširanja [58,59]. S obzirom na dodatne brojne primere degradacije pesticida u toku pasterizacije, autoklaviranja, konzerviranja sa termičkom obradom i kuvanja na pari [60,66], može se zaključiti da generalno procesi koji uključuju toplotu dovode do isparavanja, kodestilacije, termičke degradacije, hidrolize ili drugih hemijskih degradacija pesticida i time smanjuju nivo ostataka u finalnim proizvodima [67, 68].

Ne samo da tehnološko zahtevniji procesi prerade hrane dovode do redukcije ostataka pesticida, nego se nivo zagađenosti hrane ovim jedinjenjima može smanjiti i najjednostavnijim pranjem, guljenjem, zamrzavanjem ili sušenjem [64, 69-75]. Osim toga u zavisnosti od stabilnosti pesticida, i samim skladištenjem namirnica u određenom vremenskom intervalu može doći do smanjenja nivoa rezidua [76-78]. Ovo naročito može da ima značaja u slučaju skladištenju žitarica koje se uobičajeno skladište od 3 do 36 meseci, i obavezno tretiraju insekticidima u toku samog procesa skladištenja [67], pa je iz tog razloga velika verovatnoća da se značajna količina rezidua insekticida na ovaj način uključi u lanac ishrane.

Generalno, većina insekticida kojima se tretiraju uskladištene žitarice imaju dugo vreme poluraspada, tj. izrazito su stabilni [67,79], tako da je smanjenje nivoa rezidua relativno malo u toku 32 nedelje skladištenja na 20 °C i vlažnosti od 50-70 %. Dok na 30 °C malation degradira na nivou od 30-40 %, pirimifos-metil, hlorpirifos-metil i fenvalerat znatno su perzistentniji i ostaju na relativno konstantnom koncentracionom nivou u toku skladištenja [80]. Osim toga organohlorni insekticidi i piretroidi su takođe veoma stabilni u silosnim uslovima [67,81]. Nešto veća degradacija insekticida nakon 12 meseci uočena je u slučaju skladištenja na otvorenom, gde do smanjenja nivoa ostataka dolazi usled isparavanja i/ili taloženja formulacije pesticida na dno otvorenog silosa [55]. Sa druge strane, različiti insekticidi aplicirani na zrno žitarica različito se transportuju kroz njega i/ili zadržavaju na površini, pa je iz tog razloga razumljivo da se rezidue nekih od njih mogu uspešno smanjiti i ukloniti u toku procesa mlevenja i dobijanja belog brašna [82,83,84]. Međutim, obzirom da do sada nisu zabeležene značajnije redukcije rezidua insekticida u toku skladištenja, a evidentan je porast u konzumiranju

integralnih preradevina od žitarica kojima se u toku mlevenja ne odstranjuje spoljašnji sloj zrna u kojem se zadržava veliki broj ostataka pesticida, opravdano je ispitivati druge načine prerade tj. metode kojim bi se mogao umanjiti stepen zagađenja ovim agrohemijskim sredstvima. Jedna od tih metoda jeste fermentacija kao jedan od najstarijih, a danas veoma zastupljenih vidova prerade hrane.

4.1. FERMENTACIJA KAO MEHANIZAM ZA REDUKCIJU OSTATAKA PESTICIDA

Fermentacija je jednostavan proces u toku kojega se većina proteina enzimski hidrolizuje do amino kiselina i peptida niže molekulske mase, a skrob razlaže na proste ugljene hidrate koji se dalje razlažu do mlečne kiseline, alkohola i ugljen dioksida [85]. Fermentacioni procesi su bitni iz više razloga. Pre svega, fermentacijom se poboljšava kvalitet biljnog proizvoda razlaganjem proteina i skroba čime se olakšava njihovo usvajanje od strane ljudskog organizma, a razgradnjom teško svarljive celuloze i hemiceluloze poboljšava se i digestibilnost proizvoda. Dalje u toku fermentacije povećava se sadržaj vitamina B kompleksa kao i polifenolnih jedinjenja koja su u direktnoj vezi sa antioksidativnom aktivnošću [86], a, osim toga, alkohol i kiseline stvorene u toku fermentacije inhibiraju rast patogenih mikroba tako da se snižavaju pH vrednosti obezbeđuje veća dugotrajnost proizvoda [87]. Međutim, ono što poslednjih godina privlači sve veću pažnju je mogućnost korišćenja fermentacionih procesa u cilju smanjenja količine ostataka pesticida, tj. uticaj fermentativnih mikroorganizama na degradaciju ostataka pesticida u prehrambenim proizvodima.

Prva istraživanja u oblasti uticaja procesa fermentacije na degradaciju ostataka pesticida počela su krajem 60-tih i početkom 70-tih godina prošlog veka, ispitivanjem mehanizama dehlorizacije DDT-a pomoću mikroorganizama [88-93]. Rezultati su tada ukazali na sposobnost mikroorganizama da vrše reduktivnu dehlorizaciju DDT-a do DDD oblika. Ubrzo je usledio i značajan broj istraživanja u kojima je mogućnost degradacije različitih grupa pesticida ispitivana u različitim fermentacionim sistemima. Iako se u to vreme najveći broj rezultata odnosio na mikrobnu degradaciju pesticida u zemljištu [94-97], nije prošlo mnogo do publikovanja prvih rezultata koji su ukazali na pozitivan efekat fermentacije na

redukciju nivoa ostataka pesticida u prehrambenim proizvodima. Različite grupe autora su potvrdile značajno smanjenje ostataka pesticida tokom fermentativnih procesa u tehnologiji prerade mleka i mlečnih proizvoda [64, 98-103]. Paralelno, usledilo je i veliko interesovanje za ispitivanje fermentativne biodegradacije ostataka fungicida u procesima prerade grožđa u proizvodnji vina i sirćeta [104-113]. Istraživanja u ovoj oblasti proširila su se i na tehnologiju prerade mesa i mesnih prerađevina [114] i povrtnih i začinskih biljaka [65, 115-119], pri čemu je zapažen pozitivan uticaj fermentativne aktivnosti brojnih mikroorganizama korišćenih u ove svrhe na smanjenje nivoa zagađenosti pesticidima kod finalnog proizvoda.

Istraživanja uticaja mikrobiološke fermentacije u toku tehnološke prerade zrnastih plodova žitarica, kao jednih od najrasprostranjenijih uzgojnih biljaka, na redukciju ostataka pesticida do danas nisu u dovoljnoj meri zastupljena. Sa aspekta proizvodnje alkoholnih pića, tačnije piva, objavljeno je tek nekoliko radova baziranih na ispitivanju efekta kvasne fermentacije ječmenog slada i hmelja u toku tehnološkog procesa proizvodnje piva na degradaciju ostataka pesticida [120,121], dok su Sharma i sar. (2005) publikovali rezultate koji jasno ukazuju na pozitivan efekat kvasne fermentacije pšeničnog brašna u toku proizvodnje hleba na degradaciju ostataka pesticida kojima je predhodno ova žitarica bila tretirana [68]. Kako su prerađevine od žita, sa akcentom na integralne prerađevine poslednjih godina, u izrazito velikoj meri zastupljene u ljudskoj ishrani, a, kao što je već pomenuto, stabilnost insekticida kojima se žito tretira u toku skladištenja je izražena, velika je verovatnoća da se značajna količina rezidua insekticida preko žitarica uključi u lanac ishrane. Stoga je evidentna potreba da se detaljnije ispita uticaj aktivnosti mikroorganizama u toku fermentacije ovih biljnih vrsta na degradaciju, tj. redukciju nivoa ostataka pesticida. Osim što se trećina ukupno proizvedene pšenice na svetskom nivou iskoristi za proizvodnju hleba kao jednog od osnovnih fermentisanih prehrambenih proizvoda, postoji i veliki broj tradicionalnih fermentisanih proizvoda od žita (boza, tarhana, ogi i sl.) koji se kao hrana naročito koriste u siromašnijim zemljama i zemljama trećeg sveta [122]. Krajem 90-tih godina prošlog veka na tržištu se pojavio i proizvod od fermentisanih pšeničnih klica koji je kroz brojna istraživanja dokazan kao izrazito efikasan dijetetski suplement za ljude obolele od kancera [123].

5. FERMENTATIVNI MIKROORGANIZMI

5.1. BAKTERIJE MLEČNO-KISELINSKOG VRENJA

Bakterije mlečno kiselinskog vrenja (BMK) su Gram-pozitivne, fakultativno anaerobne, katalaza negativne, nepokretne ili pokretne, asporogene bakterije koje imaju zajedničku osobinu da iz ugljenih hidrata produkuju mlečnu kiselinu kao glavni produkt metabolizma, dok su ostali produkti CO₂, sirćetna kiselina, propionska kiselina itd. [124]. Mlečna kiselina oslobođena tokom fermentacije snižava pH sredine i time sprečava razviće nepoželjnih, patogenih mikroorganizama [125]. Zbog toga, kao i zbog činjenice da BMK doprinose poboljšanju organoleptičkih i nutritivnih karakteristika fermentisanog proizvoda [124], mnoge vrste BMK se danas učestalo koriste u procesima prerade sirovina i proizvodnje fermentisanih prehrambenih proizvoda od mesa, mleka, povrća i žitarica. Američka agencija za hranu i lekove (FDA) označila je bakterije mlečne kiseline kao bezbedne za humanu upotrebu (GRAS – eng. *Generally recognized as safe*) [126,127].

BMK su generalno mezofilne bakterije (optimalna T kreće se od 28 °C do 35 °C), ali one mogu da rastu i na temperaturama nižim od 5 °C ili višim od 45 °C. Imaju velike zahteve za nutrijentima, kao što su: fermentabilni ugljeni hidrati, aminokiseline, vitamini (posebno B kompleks), nukleinske kiseline, minerali, i zato se prirodno nalaze u kompleksnim organskim supstratima, kao što su biljni materijal, mleko i mlečni proizvodi, vino i pivo. Osim toga normalna su mikroflora u ustima i intestinalnom traktu ljudi i životinja [128,129].

Prvu kulturu BMK izolovao je J. Lister 1873. godine i nazvao je „*Bacterium lactis*“ (po današnjoj taksonomiji najverovatnije je to *Lactococcus lactis*). Najpre su ove bakterije prepoznate kao bakterije koje ukišeljavaju mleko, da bi se kasnije uočila njihova sličnost sa bakterijama izolovanim iz drugih izvora [130]. Danas najzastupljeniji rodovi BMK sa tehnološkog stanovišta obuhvataju štapićaste bakterije *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* i koki bakterije: *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, kao i manje zastupljene rodove: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* i *Weisella* [128,130-132]. Klasifikacija BMK je zasnovana na njihovoj morfologiji, tipovima fermentacije glukoze, rastu na različitim temperaturama, odnosu dobijenih

produkata, sposobnošću rasta pri visokoj koncentraciji soli i toleranciji na kiseline i baze.

5.1.1. KARAKTERISTIKE RODA *LACTOBACILLUS*

Najveća grupa BMK pripada rodu *Lactobacillus* koji obuhvata više od 145 različitih vrsta i 30 podvrsta [133,134], pri čemu se kontuirano vrši re-evaluacija vrsta i podvrsta uz pomoć savremenih metoda molekularne biologije [135-136].

Lactobacillus vrste koriste se kao starter kulture u industrijskoj proizvodnji i domaćinstvu za fermentaciju prehrambenih proizvoda jer doprinose konzervisanju, ukusu i teksturi fermentisanih proizvoda. Jedan od klasičnih načina klasifikacije *Lactobacillus* vrsta je na osnovu tipova fermentacije ugljenih hidrata. Tako se rod *Lactobacillus* deli na homofermentativne, fakultativno heterofermentativne i obligatno heterofermentativne laktobacile [128,131]. Homofermentativni laktobacili razgrađuju glukozu po Embden-Meyerhof-Parnas putu (glikoliza) preko brojnih međuprodukata do pirogroždane kiseline, da bi dalje redukcijom pirogroždane kiseline (piruvata), delovanjem enzima laktat-dehidrogenaze, nastala mlečna kiselina (laktat) kao glavni proizvod njihovog metabolizma (najmanje 90 %). Ovi laktobacili proizvode vrlo malu količinu ostalih međuprodukata: diacetila, acetoina, acetona, acetaldehida, etanola, kao i sirćetnu, buternu, propionsku, mravlju kiselinu i druge, koje utiču na svojstvenu aromu fermentisanih proizvoda. Ovakav homofermentativni tip mlečno kisele fermentacije, pri kojoj iz jednog molekula glukoze nastaju dva molekula mlečne kiseline i dva molekula ATP-a, karakterističan je za *L. acidophilus*, *L. helveticus*, *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Ove vrste ne fermentišu pentoze ni glukonat [128,137]. Heterofermentativni laktobacili razgrađuju glukozu fosfoketaloznim (pentoza-fosfatnim) putem. Za ovaj rod BMK karakteristična je heterofermentacija inicirana oksidacijom glukoza-6-fosfata koja se nastavlja dekarboksilacijom i cepanjem nastalog pentoza-5-fosfata (pomoću enzima fosfoketolaze). Na taj način se iz heksoza stvaraju jednake količine mlečne kiseline, acetata ili etanola i CO₂. Obligatna heterofermentacija karakteristična za laktobacile *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. fermentum*, *L. kefir*, *L. reuteri* [128,137], dok su

karakteristični fakultativni heterofermentativni laktobacili *L. plantarum*, *L. pentosus* i *L. casei*.

5.1.1.1. *Lactobacillus plantarum*

Dok je osnovna funkcija BMK fermentaciona konverzija šećera iz različitih sirovina u mlečnu kiselinu, njihove druge, ne manje važne osobine su proizvodnja antimikrobnih peptida, egzopolisaharida i raznih drugih metabolita. Pored toga, *Lactobacillus* vrste se nalaze u crevima ljudi i životinja, a njihov broj može da varira u zavisnosti od životinjske vrste, starosti domaćina ili lokacije unutar creva. Međutim, samo nekoliko *Lactobacillus* vrsta koje su stanovnici digestivnog trakta koriste se i za industrijsku proizvodnju fermentisanih prehrambenih proizvoda, a to su: *L. crispatus*, *L. gasseri* i *L. plantarum* [130,137,138].



Slika 5.1.1.1.1. *Lactobacillus plantarum*

Lactobacillus plantarum (Slika 5.1.1.1.1.) je predstavnik BMK koji učestvuje u proizvodnji fermentisanih biljnih proizvoda, fermentisanih proizvoda od mesa kao i pekarskih fermentisanih proizvoda. To je lako adaptibilna vrsta BMK koja se zbog izražene sposobnosti razgradnje lignoceluloznog matriksa veoma učestalo koristi u proizvodnji silaža, ali je takođe i osnovna kultura za kišeljjenje krastavaca, kupusa i maslina, proizvodnju fermentisanih napitaka od žitarica kao i kiselog testa. Utvrđeno je da *L. plantarum* produkuje antimikrobne supstance zahvaljujući kojima se produžava rok trajanja fermentisane hrane [139]. Osim toga, zbog izražene tolerancije na visok sadržaj hlorovodonične kiseline (pH oko 2) u želucu, i na visoke koncentracije žučnih soli [138], kao i dokazane neškodljivosti za ljudsku upotrebu i blagotvornog dejstva na zdravlje domaćina, Svetska zdravstvena organizacija svrstala je ovu vrstu BMK u probiotski mikroorganizam.

5.2. KVASCI

Kvasci su eukariotski, jednoćelijski, nefilamentozni, heterotrofni, mikroorganizmi klasifikovani u carstvo gljiva (Fungi). Postoji oko 1500 vrsta kvasaca što čini svega 1 % od ukupnog broja vrsta iz carstva gljiva. Kvasci su široko rasprostranjeni u prirodi (ubikvitarni mikroorganizmi), sa optimalnom temperaturom za rast od 15-30 °C (mada se ona razlikuje od vrste do vrste) [140]. Iako su same ćelije kvasaca indiferentne na vrednosti pH sredine u opsegu od 3,5-8, njihovom razvoju pogoduje blago kisela sredina (pH između 4 i 6) jer im je rast u sredini sa pH iznad i ispod ovih vrednosti ograničen zbog osetljivosti enzimskih sistema [141].

Kvasci su fakultativno anaerobni mikroorganizmi. Pod anaerobnim uslovima javlja se fermentativni tip metabolizma, pri čemu je rast ćelija minimalan, a reprodukcija ograničena na nekoliko generacija, dok prisustvo kiseonika u znatnoj meri stimuliše umnožavanje ćelija [141]. Ova pojava da se fermentacija ugljenih hidrata odvija pod anaerobnim uslovima i da se aerisanjem kulture najpre usporava, a zatim i potpuno zaustavlja definiše se kao „Pasteur-ov efekat“. Međutim, fermentacija je kod određenih vrsta kvasaca i u zavisnosti od supstrata koga fermentišu, moguća i pod aerobnim uslovima, a taj fenomen u različitim oblicima poznat je pod nazivom „negativan Pasteur-ov efekat“ [142]. U aerobnim uslovima, kada je krajnji akceptor elektrona kiseonik, razlaganje ugljenih hidrata se odvija kao respiracija, a nastala pirogroždana kiselina preko acetyl-CoA, kao intermedijera, ulazi u ciklus trikarbonskih kiselina (Krebs-ov ciklus). S druge strane, tokom fermentativnog tipa metabolizma, pirogroždana kiselina se transformiše u etanol i CO₂ [143,144].

Kvasci u prirodi rastu kao saprofiti na šećernim supstratima i kao patogeni na proteinskom materijalu. Tokom svog metabolizma ovi mikroorganizmi kao sporedne produkte sintetišu veliki broj biološki vrednih jedinjenja kao što su vitamini B grupe: tiamin (B1), riboflavin (B2), niacin (B3), pantotenska kiselina (B5), piridoksin (B6), p-aminobenzoeva kiselina, vitamin B12, zatim folna kiselina, nikotinska kiselina, biotin, inozitol i drugi [145,146]. Zbog ove osobine, kao i zbog fermentativne sposobnosti i produkcije etanola i ugljendioksida, kvasci imaju izuzetan industrijski značaj. Ovi mikroorganizmi imaju široku primenu u industriji. Koriste se od davnina u tradicionalnoj proizvodnji vina, piva i pekarskih proizvoda. Osim u biotehnologiji,

koriste se i u prehrambenoj industriji kao dodatak prehrambenim proizvodima, najčešće kao pekarski kvasac ili osušena biomasa. Danas se različiti kvasci, najčešće selektovani metodama genetičkog inženjerstva, često koriste i u farmaceutskoj proizvodnji novih lekova.

Još od kako je Julius Meyen 1838. godine predložio latinski naziv *Saccharomyces* za rod u koji je grupisao vrste kvasaca izolovanih iz piva i vina, a 1870. godine Rees svrstao ovaj rod u grupu askomiceta odnosno askosporogenih kvasaca, klasifikacija ovih mikroorganizama se kontinuirano menjala tokom niza godina [147]. Po Loderovoj (Jacomina Lodder) kvasci se mogu klasifikovati u dve grupe: askosporogeni ili tzv. „pravi” kvasci u koje spadaju sa tehnološkog aspekta najznačajniji kvasci *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Pichia*, *Debaromyces* i *Schizosaccharomyces*, i anasporogeni u koji spada krmni kvasac *Candida utilis* ali i patogeni *Candida albicans* i *Cryptococcus neoformans*.

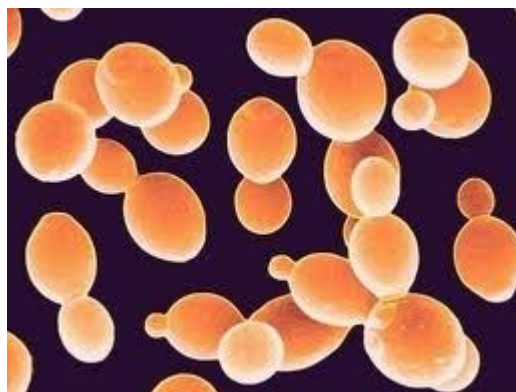
5.2.1. KARAKTERISTIKE RODA *SACCHAROMYCES*

Najznačajniji rod kvasaca sa tehnološkog aspekta je svakako rod *Saccharomyces*. Ovaj rod kvasaca intenzivno fermentiše šećere tj. heksoze, dok pentoze može samo asimilovati ali ih ne fermentiše. Neke vrste su osmofilne i mogu rasti i pri veoma velikim koncentracijama soli i šećera, a rastu na temperaturama od 5-35 °C pri minimalnoj pH vrednosti od 2-2,5. Vrste *Saccharomyces* mogu biti kontaminanti voćnih sokova, koncentrata i sirupa, soka od paradajza, majoneza, meda i džemova (*S. rouxii* i *S. melis*), međutim najznačajnije vrste ovog roda su svakako *S. uvarum* koji se koristi u proizvodnji piva i najpoznatiji *S. cerevisiae* koji se koristi kao radni mikroorganizam u fermentativnoj industriji.

5.2.1.1. *Saccharomyces cerevisiae*

Zbog svoje klasične industrijske primene u proizvodnji kiselog testa i fermentaciji piva i vina, *Saccharomyces cerevisiae* (**Slika 5.2.1.1.1.**) je najpoznatiji kvasac iz roda *Saccharomyces* tako da se često pojam kvasac i *Saccharomyces cerevisiae* upotrebljavaju kao sinonimi. Ovaj pivski kvasac gornjeg vrenja, alkoholni i pekarski kvasac je manje rasprostranjen u prirodi gde se najčešće nalazi u voću, voćnim sokovima i plodovima koji sadrže šećere. To je jednoćelijski, heterotrofni, fakultativno anaerobni mikroorganizam koji se razmnožava bespolno pupljenjem, ali

kada uslovi sredine postanu nepovoljni (visoke temperature i nedostatak vlage), sporuliše askospore koje mu omogućavaju preživljavanje.



Slika 5.2.1.1.1. *Saccharomyces cerevisiae*

Prvi korak u metabolizmu disaharida kod *Saccharomyces cerevisiae* se odvija ekstracelularno. Naime, u slučaju usvajanja saharoze dolazi do ekstracelularne hidrolize pomoću enzima invertaze do glukoze i fruktoze. Invertaza se kod kvasca nalazi sa spoljašnje strane osnovne ćelijske membrane [148]. Dalje se u ćelijama kvasca odvija Emben-Meyerhof-Parnasov put razgradnje glukoze i fruktoze, pri čemu se u aerobnim uslovima razlaganje odvija kao respiracija uz rapidno povećanje biomase, dok se u nedostatku kiseonika kao krajnji produkti oslobađaju etanol i ugljendioksid [143,144]. Tako se proces proizvodnje pekarskog kvasca odvija u aerobnim uslovima jer se zahteva maksimalan broj ćelija, dok je proces proizvodnje alkoholnih pića usmeren ka povećanju akumulacije metabolita, naročito etanola, i odvija se u anaerobnim uslovima. Međutim, *Saccharomyces cerevisiae* pokazuje izraženi „Crabtree efekat“ kada je njegov oksidativni metabolizam pod pritiskom uzrokovanim porastom koncentracije glukoze u hranjivoj podlozi. Drugim rečima, povećanje koncentracije glukoze iznad kritične vrednosti prouzrokuje smanjenje sposobnosti kvasca da vrši oksidaciju glukoze. Kao rezultat, ćelija ulazi u stanje neravnoteže i NADH se počinje akumulirati brže nego što je ćelija u stanju da ga reoksiduje u procesu oksidativne fosforilacije. Jedini način da ćelija reoksiduje akumulirani NADH je redukovanjem piruvata oksidovanog u procesu ciklusa limunske kiseline. Tako kvasac redukuje piruvat u etanol istovremeno oksidujući NADH u NAD^+ . Iz tog razloga, čak i u prisustvu odgovarajuće koncentracije

kiseonika, kod ovog Crabtree-pozitivnog kvasca povećanje koncentracije glukoze neizbežno uzrokuje produkciju i akumulaciju etanola.

5.3. PRIMENA FERMENTATIVNIH MIKROORGANIZAMA U PROIZVODNJI KISELOG TESTA

Osnova biotehnološkog procesa proizvodnje kiselog testa je fermentacija brašna žitarica sa kvascima i bakterijama mlečne kiseline (BMK). Ova dva mikroorganizma imaju suštinsku ulogu u formiranju osobina proizvoda, a između njih postoje složeni nekompetitivni odnosi u ishrani [149]. Kvasci, fermentišući šećere iz brašna, stvaraju, pored ostalih metabolita, i CO₂ odnosno anaerobne uslove koji pogoduju razvoju BMK, dok je glavni produkt fermentacije BMK mlečna kiselina koja povećava kiselost testa, što dalje sprečava razmnožavanje neželjenih mikroorganizama i povećava trajnost hleba. Pored toga, upotreba kiselih testa poboljšava tehnološke karakteristike testa, kao i strukturu, hranjivu vrednost i aromu hleba [150]. U poređenju sa hlebom dobijenim na klasičan način (kvasnom fermentacijom), dokazano je da se fermentacijom kiselog testa dobija hleb sa povećanom zapreminom, poboljšanim izgledom i aromom [151]. Jedini nedostatak proizvodnje hleba od kiselih testa je veći uloženi rad u poređenju sa klasičnim procesom gde je fermentacija sa kvascima znatno kraća. Osim ovoga, ukoliko se proizvodi hleb od spontano fermentisanog kiselog testa, teško je održati stalnost osobina proizvoda usled nedovoljne kontrole mikrobnog sastava. Taj problem se prevazilazi upotrebom definisanih starter kultura.

6. ANALITIČKE METODE PRIPREME UZORAKA ZA ODREĐIVANJE OSTATAKA PIRIMIFOS-METILA, HLORPIRIFOS-METILA I BIFENTRINA U FERMENTISANOM ŽITNOM SUPSTRATU

U današnje vreme osnovna strategija i cilj u okviru analitike ostataka pesticida je razvijanje višerezidualnog metoda za određivanje što većeg broja aktivnih materija koje pripadaju različitim klasama po svojim fizičko-hemijskim karakteristikama. Upravo ova različitost aktivnih materija pesticida predstavlja

osnovnu poteškoću za razvijanje metoda kojima bi se analizirale sve željene aktivne materije iz jedne matrice. Ponekad je neophodno imati više različitih metoda za pripremu uzoraka, pri čemu se pri izboru metode za pripremu uzimaju u obzir svojstva kako aktivne materije tako i proizvoda koji se analizira.

Iako proces separacione hemijske analize uključuje nekoliko stupnjeva (priprema uzorka, separacija tj. kvantifikacija analita i analiza podataka), za „najkritičniji“ se može uzeti korak pripreme uzorka, koji se obično sastoji od tri podstupnja: ekstrakcija (ciljani analiti se izvlače iz matriksa uzorka i prevode u medijum pogodan za dalju analizu), koncentrovanje (povećavanje koncentracije ekstrahovanih analita u cilju povećanja osetljivosti analize) i prečišćavanje dobijenog ekstrakta (ciljani analiti se izoluju od ostalih frakcija matriksa uzorka koji su koekstrahovani i mogu da interferiraju sa analitima).

Do danas je razvijen i validovan veliki broj GC ili GC/MS analitičkih metoda za određivanje ostataka pirimifos-metila, hlorspirifos-metila i bifentrina u pšenici koje se zasnivaju na različitim ekstrakcionim procedurama i prečišćavanjima. Još 1979. godine Mestres i sar. su razvili višerezidualnu metodu za određivanje organohlorinih pesticida, organofosfata i sintetičkih piretroida u uzorcima pšenice [152], koja je, međutim, bila veoma složena i zahtevna. Osnovna težnja istraživača od tada je bila uprošćavanje ovakvih višerezidualnih metoda uz smanjenje utroška hemikalija i skraćivanje pripreme uzorka. Tako su Bottomley i Baker ekstrakcijom metanolom i acetonom i particioniranjem sa dihlormetanom uz prečišćavanje preko aluminijum oksida dobili prinose od 84-99 % za pirimifos-metil i 80-90 % za hlorspirifos-metil [153]. Tokom poslednje dve decenije brojni autori su publikovali rezultate koji su se odnosili na razvoj metoda za određivanje ostataka pesticida u pšenici i to kako piretroida tako i organofosfata [31,154-163]. Sve ove metode bazirale su se na tradicionalnim metodama pripreme uzoraka tj. ekstrakciji sa različitim rastvaračima (metanol, aceton, dihlormetan, etil-acetat) i njihovim mešavinama, koncentrovanju vakuum uparavanjem i prečišćavanju preko kolona sa različitim punjenjem (florisil, aktivni ugalj, aluminijum oksid), a prinosi svih ispitivanih metoda bili su zadovoljavajući nakon detekcije i kvantifikacije bilo gasnom hromatografijom ili gasnom hromatografijom sa masenom detekcijom. Međutim, imajući u vidu da su sve opisane metode pripreme uzoraka koristile uglavnom toksične organske

rastvarače uz procedure koje su se sastojale iz više koraka, pa samim tim često rezultirare i određenim gubitkom analita, poslednjih godina došlo je do razvijanja novih ekstrakcionih tehnika. Neke od njih, kao što su tečna ekstrakcija pod pritiskom (PLE) i ekstrakcija u čvrstoj fazi (SPE) [164,165], kao i najnovija QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe) metoda koja je za kratko vreme, kao metoda novije generacije za analizu ostataka pesticida u hrani, postala brza i prigodna zamena za tečno-tečnu ekstrakciju (LLE), obezbeđujući zadovoljavajuće rezultate kroz minimalan broj ekstrakcionih koraka i sa veoma malim utroškom rastvarača [166-169], uspešno su primenjene za određivanje organofosfata i piretroida iz žita.

Uprkos evidentnoj efikasnosti predhodno pomenutih metoda u određivanju ostataka pirimifos-metila, hlorspirifos-metila i bifentrina u pšenici, njihova efikasnost u određivanju ostataka datih pesticida u fermentisanim pšeničnim proizvodima nije dovoljno istražena. Sharma i Satya su 2005. godine objavili rezultate ispitivanja degradacije pesticida u toku proizvodnje hleba, gde su pesticide ekstrahovali iz gotovog testa heksanom i/ili dihlormetanom, koncentrovali uparavanjem i prečišćavali preko florisila, i tim postupkom dobili zadovoljavajuće prinose za endosulfan, heksakonazol, propikonazol, hlorspirifos, malation i deltametrin [68]. Sa druge strane Kolberg i sar. su iz hleba pomoću QuEChERS metode uspešno ekstrahovali 15 pesticida među kojima i pirimifos-metil i hlorspirifos-metil, međutim prinosi metode su bili nešto niži (63-67 %) za uzorke kontaminirane sa najmanjim koncentracijama pesticida (10 µg/kg) [170]. Takođe Koesukwiat i sar. dobili su dobre prinose QuEChERS metode pri analizi pirimifos-metila (101-118 %) i hlorspirifos-metila (99-104 %) kao i još 30 pesticida u testu [171]. S obzirom da, kao što je ranije pomenuto, u toku fermentacije dolazi do značajnog smanjenja pH vrednosti pšenice, ova, kao i brojne druge promene pšeničnog supstrata, mogu da imaju negativan uticaj na efikasnost metode za određivanje ostataka izabranih aktivnih materija pesticida. Iz tog razloga pri izboru postupka pripreme uzorka potrebno je uzeti u obzir mnoštvo faktora, koji se odnose na fizičke osobine ispitivanih pesticida (isparljivost, rastvorljivost u vodi i organskim rastvaračima, stabilnost, kiselo-bazna svojstva, itd.) i fizičku prirodu matriksa uzorka (sadržaj vode, masnoća, pigmenata, itd.). Osim toga za rad treba izabrati takvu analitičku

proceduru koja će probleme vezane za trajanje analize, količine rastvarača i ostalih neophodnih reagenasa svesti na minimum, koja će se sastojati iz što manjeg broja koraka, čime će se potencijalni izvori grešaka svesti na minimum, i koja će omogućiti istovremeno određivanje svih ciljanih aktivnih materija.

7. EKSPERIMENTALNI DIZAJN

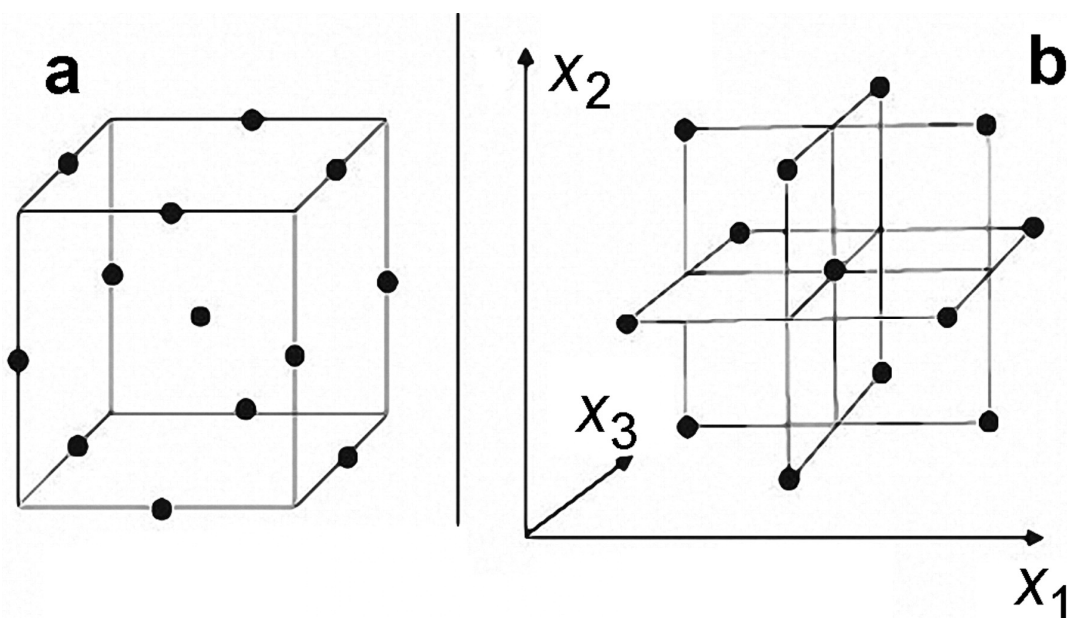
Klasičan pristup eksperimentalnom radu istraživanja uticaja pojedinačnih faktora na neku pojavu ili proces (*one at a time design*) uključuje dosta napora i vremena, a u slučajevima kada su interakcije faktora važne nije ni u potpunost tačan [172,173]. Tako je npr. za ispitivanja uticaja pet faktora sa pet nivoa njihovih vrednosti na neku odabranu veličinu po klasičnom eksperimentalnom radu potrebno izvesti 3125 eksperimenata, koje je teško analizirati i izvesti, pa se u praksi broj eksperimenata redukuje bilo smanjenjem broja ispitivanih faktora ili brojem njihovih nivoa, što za posledicu ima smanjenje pouzdanosti zaključaka izvedenih iz eksperimentalnih istraživanja [174]. Najefikasniji put povećanju vrednosti istraživanja i skraćivanju vremena njegovog trajanja je statističko planiranje eksperimenata (DOE, Design of Experiments), kojim se npr. navedeni problem sa pet faktora i pet nivoa njihovih vrednosti može rešiti smanjivanjem broja eksperimenata na 32 u skladu sa rotabilnim planom drugog reda [175].

Postupak odzivne površine (RSM-response surface methodology) spada u najčešće korištene postupke statistički planiranih eksperimenata [176]. Ovaj postupak su uveli Box i Wilson (1951), a kasnije ga je popularizovao Montgomery, a može se definisati kao empirijska statistička tehnika primenjena za regresionu analizu podataka dobijenih iz adekvatno planiranih eksperimenata simultanim rešavanjem sistema jednačina [176,177]. Svaka od jednačina naziva se funkcija odziva, a njen geometrijski prikaz se naziva odzivna površina. One se mogu prikazati u tri dimenzije ili, kao konturne površine, u dve dimenzije [178]. Ovakvi modeli su posebno pogodni za rešavanje optimizacionih problema s obzirom da je njima moguće opisati interakcije velikog broja faktora [174]. Definisane značajnosti pojedinih faktora moguće je uraditi pomoću Studentovog t-testa kojim se ukazuje koji faktori su značajni odnosno koje od interakcija su bitne za posmatrani odziv. Ako se kao krajnji cilj postupka uzme pronalaženje optimalnog rešenja onda je

neophodno koristiti polinome drugog reda za opisivanje odabranih odziva. Tada svaki od posmatranih faktora mora da ima tri ili pet nivoa vrednosti u zavisnosti od primenjenog eksperimentalnog plana.

Izbor odgovarajućeg eksperimentalnog plana ključan je korak u primeni postupka odzivne površine. Na raspolaganju su nam brojni eksperimentalni planovi koji se razlikuju pre svega po broju eksperimenata. Najčešće se u istraživanjima koriste sledeći planovi: Box-Behnken dizajn (BBD), centralni kompozitni plan (CCD), potpuni eksperimentalni plan i dr.

Box-Behnken-ov plan ima prednost nad ostalim u pogledu efikasnosti, odnosno odnosa između broja koeficijenata koji se javljaju u odabranom modelu i broja eksperimenata koje je potrebno izvesti (*Slika 7.1.*). Na primer, eksperimentalni dizajn sa tri faktora na tri nivoa i tri ponavljanja u centralnoj tački ima 15 eksperimenata (*Slika 7.1.*). Efikasnost ovog eksperimentalnog plana veća je u poređenju sa efikasnošću centralnog kompozitnog plana. Ova prednost Box-Behnkenovog eksperimentalnog plana gubi se kada se posmatra sistem sa četiri i više promenljivih, odnosno faktora.



Slika 7.1. Raspored tačaka Box-Behnken-ovog eksperimentalnog plana

Box-Behnken-ov dizajn se pokazao kao koristan metod za ispitivanje uticaja različitih faktora na analitički signal. S obzirom na to da se na ovaj način dobijaju optimalni eksperimentalni uslovi pri kojima je efekat faktora na analitički odgovor

najveći, ne moraju se testirati različite varijabile za dobijanje najboljeg odgovora, što značajno skraćuje vreme ukupne analize. Na kraju, najznačajnija prednost primene ovog metoda je pojednostavljivanje primenjene tehnike i postavke eksperimenta.

Ponašanje sistema dizajniranog po Box-Behnken planu eksperimenta se opisuje multilinearim regresionim modelom:

$$Y = b_0 + \sum b_i x_i \quad (1)$$

gde je Y predskazana vrednost odgovora sistema, b_0 srednja vrednost odgovora u centralnoj tački dizajna, b_i izračunati koeficijenti regresije, a x_i varijabile koje mogu biti glavni faktori ($x_i=A, B, C$) ili neka od njihovih interakcija ($x_i=AB, BC, AC, AA, BB$ i CC). Korišćenjem jednačine multilinearog regresionog modela izračunavaju se predviđeni odgovori sistema, a njihovim poređenjem sa dobijenim eksperimentalnim vrednostima preko linearne regresijske analize (izračunavanjem nedostatka podešenosti – “*lack of fit*”) i koeficijenta determinacije (R^2) utvrđuje se da li je predložen model odgovarajući za eksperiment.

MATERIJAL I

METODE

8. UTVRĐIVANJE FAZA RASTA I GENERACIJSKOG VREMENA *LACTOBACILLUS PLANTARUM* I *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Generacijsko vreme i koeficijenti rasta korišćenih mikroorganizama određivani su u cilju definisanja trajanja njihove aktivacije i preciziranja početne brojnosti ćelija u inokulumu za fermentacije.

Određivanje faza krive rasta mikroorganizama uključivalo je dve metode:

- direktnu metodu razređenja tj. zasejavanja ćelija na određene podloge u cilju izračunavanja CFU (Colony Forming Units) parametra
- indirektnu metodu merenja optičke gustine na spektrofotometru pri talasnoj dužini od 620 nm (O.D._{620nm}).

Kultura *Lactobacillus plantarum* korišćena u radu potiče iz kolekcije kultura mikrobiološke laboratorije Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Kultura je čuvana u MRS (de Man, Rogosa i Sharpe) bujonu (Torlak, Beograd) na 4-6 °C, a za potrebe eksperimenta je aktivirana u MRS bujonu inkubacijom od 24 h na 30 °C (Inkubator VELP Scientifica FOC 225L, Italija).

Kultura *Saccharomyces cerevisiae* korišćena u radu potiče iz kolekcije kultura mikrobiološke laboratorije Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Kultura je čuvana na YPD (Yeast extract Peptone Dextrose) agaru (Torlak, Beograd) na 4-6 °C, a za potrebe eksperimenta je aktivirana u YPD bujonu (Torlak, Beograd) inkubacijom od 24 h na 30 °C.

Kako bi se pratila dinamika rasta ćelija, 10 mL aktiviranog inokuluma *L. plantarum* inokulisano je u 1L MRS bujona i stavljeno na inkubaciju u trajanju od 54h na 30 °C, a 10 mL aktiviranog inokuluma *S. cerevisiae* inokulisano je u 1L YPD bujona i stavljeno na inkubaciju u trajanju od 48 h na 30 °C. Na svakih 30 minuta od početka inkubacije uzimano je po 5 mL uzorka svake kulture. Od 1 mL uzorka klasičnom mikrobiološkom metodom pravljena su razblaženja 10^{-5} – 10^{-7} , zasejavana na MRS (*L. plantarum*) tj. YPD agar (*S. cerevisiae*) i nakon inkubacije od 48 h na 30 °C, određivana je brojnost kolonija tj. ćelija preko CFU parametra ($CFU = (\text{broj izraslih kolonija} / \text{zapremina uzorka}) \times \text{recipročna vrednost razređenja}$).

Za određivanje optičke gustine (O.D.), zasnovane na opštim principima merenja mutnoće spektrofotometrom, merena je absorbanca uzetog uzorka inokuluma na 620nm (UV/visible spektrofotometar LKB Biochrom Novacpec II, Austrija) uz MRS tj. YPD bujon kao blank.

Nakon dobijanja serije rezultata pravljen je grafikon sa \log_{10} CFU i O.D._{620nm}, definisane su faze rasta i određeni: početak eksponencijalne faze rasta (t_0), brojnost ćelija u trenutku početka eksponencijalne faze rasta (N_0), kraj eksponencijalne faze rasta tj. početak stacionarne faze (t), brojnost ćelija na kraju eksponencijalne faze rasta (N_t), konstanta stope rasta ($\mu = ((\log_{10}N_t - \log_{10}N_0) \times 2.303) / (t - t_0)$) kao i generacijsko vreme ($g = (\log_{10}N_t - \log_{10}N_0) / \log_{10}2$) korišćenih mikrobioloških kultura u datim laboratorijskim uslovima.

Nakon utvrđivanja faza rasta za *L. plantarum* i *S. cerevisiae* u datim laboratorijskim uslovima, svaka sledeća aktivacija kultura korišćenih za fermentaciju trajala je do postizanja njihove stacionarne faze rasta.

9. OPTIMIZACIJA USLOVA MIKROBIOLOŠKIH FERMENTACIJA

Kako bi se utvrdila mogućnost izvođenja efikasne kontrolisane fermentacije u laboratorijskim uslovima rađena je optimizacija uslova mikrobiološke fermentacije žitnog supstrata u datim uslovima.

9.1. PRIPREMA INOKULUMA ZA FERMENTACIJU SUPSTRATA

Kultura *L. plantarum* je čuvana u MRS bujonu na 4-6 °C, a za potrebe eksperimenta je aktivirana u MRS bujonu inkubacijom do postizanja stacionarne faze rasta na 30 °C. Kultura *S. cerevisiae* je čuvana na YPD agaru na 4-6 °C, a za potrebe eksperimenta je aktivirana u YPD bujonu inkubacijom do postizanja stacionarne faze rasta na 30 °C.

Nakon aktivacije kultura, ćelije mikroorganizama izdvajane su centrifugiranjem na 10 000 obrtaja/min, u trajanju od 10 minuta, pri temperaturi od 4 °C (centrifuga Velocity 14R, Dynamica, Austrija), i nakon ispiranja sa 50mM fosfatnim puferom (pH=7), (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka)

resuspendovane su do početne zapremine u sterilisanoj destilovanoj vodi. Ovako dobijene sveže kulture su se koristile za inokulacije supstrata (samlevene pšenice).

Svi mikrobiološki ogledi izvedeni su pod sterilnim uslovima u mikrobiološkoj komori za rad (Laminarna komora Flow Fast H, Italija).

9.2. PRIPREMA SUPSTRATA ZA FERMENTACIJU

Zrno očišćene organski uzgajane pšenice (*Triticum spelta*) netretirane pesticidima (Jevtić poljoprivredno gazdinstvo, Bačko Gradište) samleveno je u blenderu (Philips HR2161, Holandija) i sterilisano u autoklavu (Sanyo MLS-3780, Japan) 15 minuta na 121 °C (103 kPa) u balonima za fermentaciju. Nakon hlađenja fermentacioni supstrat pravljen je dodavanjem sterilisane destilovane vode u odnosu 1:1 i inokulisan inokulumom pripremljenim po predhodno opisanoj proceduri.

9.3. OPTIMIZACIJA USLOVA MLEČNO-KISELINSKE I KVASNE FERMENTACIJE PŠENICE

U okviru optimizacije fermentacija u laboratorijskim uslovima eksperiment je dizajniran po statističkoj metodi odzivne površine, tj. Box-Behnken planu eksperimenta sa tri faktora na tri nivoa i tri ponavljanja u centralnoj tački, i sa tri posmatrana odziva. Statistička obrada eksperimentalnih podataka dobijenih kroz Box-Behnken dizajn eksperimenta urađena je u softverskom programu ReliaSoft DOE++.

Eksperimentalni dizajn sa tri faktora na tri nivoa i tri ponavljanja u centralnoj tački ima 15 eksperimenata (**Tabela 9.3.1.**).

Faktori i njihovi nivoi pri fermentacijama bili su:

- (X_1) veličina inokuluma; 6, 8 i 10 % (v/w)
- (X_2) dužina fermentacije; 24, 48 i 72 h
- (X_3) temperatura inkubacije; 23, 30 i 37 °C (**Tabela 9.3.1.**)

Tabela 9.3.1. Box-Behnken dizajn sa tri faktora na tri nivoa: kodirani i nekodirani nivoi nezavisnih promenljivih korišćenih u Box-Behnken dizajnu eksperimenta

Ogled	Nivoi faktora					
	Kodirane vrednosti			Nekodirane vrednosti		
	X_1	X_2	X_3	x_1	x_2	x_3
1	+1	+1	0	10	72	30
2	+1	-1	0	10	24	30
3	-1	+1	0	6	72	30
4	-1	-1	0	6	24	30
5	+1	0	+1	10	48	37
6	+1	0	-1	10	48	23
7	-1	0	+1	6	48	37
8	-1	0	-1	6	48	23
9	0	+1	+1	8	72	37
10	0	+1	-1	8	72	23
11	0	-1	+1	8	24	37
12	0	-1	-1	8	24	23
13	0	0	0	8	48	30
14	0	0	0	8	48	30
15	0	0	0	8	48	30

Odzivi kojima je utvrđivana efikasnost fermentacije supstrata sa *L. plantarum* bili su:

- pH – praćenje promene pH vrednosti
- TTA test – praćenje promene titrabilne kiselosti
- CFU parametar – određivanje broja mikroorganizama metodom razređenja

Odzivi kojima je utvrđivana efikasnost fermentacije supstrata sa *S. cerevisiae* bili su:

- pH – praćenje promene pH vrednosti
- CO₂ produkcija – određivanje produkcije ugljen dioksida
- CFU parametar – određivanje broja mikroorganizama metodom razređenja

Promena **pH** vrednosti supstrata pre i nakon završenih fermentacija praćena je direktnim merenjem na pH-metru InoLab pH 730 (WTW, Nemačka).

Za određivanje promene titrabilne kiselosti nakon fermentacije sa *L. plantarum* - **TTA test** – korišćena je metoda AOAC 942.15. Po tom postupku 10 g fermentisanog uzorka prebaćeno je u erlenmajer od 250 mL koji je dopunjen

destilovanom vodom. Nakon dodavanja 10 kapi fenolftaleina kao indikatora, uzorak je titrisan sa 0.1M NaOH do nastanka postojane roze boje. Količina titrabilne kiseline u uzorku izražena je kao % mlečne kiseline, a izračunata je po formuli:

$$\text{kiselost (\% mlečne kiseline)} = [(0.0901 \times \text{mL}_{(0.1N \text{ NaOH})} \times N_{(\text{NaOH})}) / \text{g}_{(\text{uzorka})}] \times 100$$
gde je 0.0901 faktor za mlečnu kiselinu koju produkuje *L. plantarum*.

Za utvrđivanje efikasnosti fermentacije sa *S. cerevisiae* određivana je **produkcija CO₂** i to indirektno merenjem težine supstrata u aparaturi za fermentaciju pre i nakon završene fermentacije. Razlika u težinama supstrata u direktnoj je korelaciji sa količinom oslobođenog ugljen dioksida.

Za određivanje brojnosti mikroorganizama – **CFU parametar** – korišćena je već opisana klasična mikrobiološka metoda. Po 10 g uzorka homogenizovano je u 90 mL sterilisane destilovane vode 30 minuta na tresilici (IKA Werke HS 501 Digital, Nemačka), pravljeni su razblaženja do 10⁻⁷, zasejavana na MRS (*L. plantarum*) tj. YPD agar (*S. cerevisiae*) i nakon inkubacije od 48 h na 30 °C, određivana je brojnost kolonija.

10. ISPITIVANJE UTICAJA PIRIMIFOS-METILA, HLORPIRIFOS-METILA I BIFENTRINA NA RAST I AKTIVNOST FERMENTATIVNIH MIKROORGANIZAMA

Kako bi se definisala efikasnost fermentacije koja može da se očekuje u uzorcima kontaminiranim pesticidima u datim laboratorijskim uslovima, prvo je ispitivan uticaj proučavanih aktivnih materija na rast i aktivnost korišćenih fermentativnih mikroorganizama.

U ogleđima su korišćeni analitički standardi pirimifos-metila (čistoće 99,2 %) (Syngenta, Švajcarska), hlörpirifos-metila (čistoće 99,9 %) (Dow Agro, SAD) i bifentrina (čistoće 98,4 %) (FMC Agricultural, Australija). Osnovni rastvori aktivnih materija pravljeni su u acetonu (J.T. Baker, Nemačka) i razblaživani u serije radnih koncentracija u sterilisanoj destilovanoj vodi. Obogaćivanje podloga pesticidima vršilo se pod sterilnim uslovima u laminarnoj mikrobiološkoj komori. Ispitivano je dejstvo pesticida aplikovanih na nivou 1/2x, 1x, 2x, 5x, 10x, 15x i 20x, pri čemu x odgovara maksimalnoj dozvoljenoj koncentraciji (MDK) date aktivne materije u zrnu

pšenice. Tako su koncentracije pirimifos-metila kojima su obogaćivane podloge za rast bile 2,5; 5; 10; 25; 50; 75 i 100 µg pirimifos metila/mL podloge, koncentracije hlorspirifos-metila 1,5; 3; 6; 15; 30; 45 i 60 µg hlorspirifos-metila/mL podloge, dok su koncentracije bifentrina bile 0,25; 0,5; 1; 2,5; 5; 7,5 i 10 µg bifentrina/mL podloge.

U ovoj fazi eksperimenata supstrati za rast *L. plantarum* i *S. cerevisiae* (MRS i YPD bujon) su nakon sterilizacije obogaćivani različitim koncentracijama ispitivanih aktivnih materija i inokulisani mikroorganizmima predhodno aktiviranim na ranije opisan način. Nakon inkubacije na 30 °C, koja je trajala do postizanja stacionarne faze rasta za svaki mikroorganizam, opisanim metodama – direktnom metodom razređenja i zasejavanja inokuluma na MRS tj. YPD agar (CFU) i indirektnom metodom merenja optičke gustine pri talasnoj dužini od 620 nm (O.D._{620nm}) – određen je stepen rasta mikroorganizama. Istovremeno su pripremani i kontrolni uzorci inokulisanih podloga bez pesticida.

11. ISPITIVANJE UTICAJA PIRIMIFOS-METILA, HLORPIRIFOS-METILA I BIFENTRINA NA EFIKASNOST PROCESA MIKROBIOLOŠKIH FERMENTACIJA ŽITNOG SUPSTRATA

Nakon ispitivanja uticaja proučavanih aktivnih materija na rast i aktivnost *L. plantarum* i *S. cerevisiae* u supstratima za rast, testirana je i efikasnost fermentacija pšeničnog supstrata koji je obogaćen pesticidima. Za ovo ispitivanje uticaja pirimifos-metila, hlorspirifos-metila i bifentrina na efikasnost mlečnokiselinske i kvasne fermentacije pšenice u laboratorijskim uslovima praćeni su parametri za utvrđivanje efikasnosti fermentacije za date mikroorganizme (pH, CFU, TTA, CO₂). Poređenjem parametara fermentacije pšenice nekontaminirane pesticidima sa parametrima fermentacije kontaminiranih uzoraka, definisan je uticaj ispitivanih pesticida na proces mlečnokiselinske i kvasne fermentacije pšenice. Ovim testiranjem je praktično utvrđena efikasnost pšenične fermentacije koja može da se očekuje u uzorcima obogaćenim pesticidima u datim laboratorijskim uslovima.

U ovoj fazi eksperimenta su korišćene tri različite koncentracije za svaku aktivnu materiju, i to: koncentracije primene jednake MDK vrednostima ispitivanih pesticida

u pšenici (5 mg/kg za pirimifos metil, 3 mg/kg za hlörpirifos metil i 0,5 mg/kg za bifentrin), odnosno koncentracije 5 puta i 15 puta veće od MDK vrednosti (25 i 75 mg/kg za pirimifos metil, 15 i 45 mg/kg za hlörpirifos metil i 2,5 i 7,5 mg/kg za bifentrin).

12. ISPITIVANJE EFIKASNOSTI RAZLIČITIH METODA PRIPREME UZORAKA ZA ODREĐIVANJE OSTATAKA PIRIMIFOS-METILA, HLÖRPIRIFOS-METILA I BIFENTRINA U FERMENTISANIM UZORCIMA PŠENICE

Kako bi rezultati o eventualnom pozitivnom efektu mlečnokiselinske i kvasne fermentacije na smanjenje nivoa rezidua pesticida u uzorcima pšenice bili validni, prvenstveno je bilo neophodno izabrati adekvatnu metodu pripreme fermentisanih uzoraka kojom će se rezidue pesticida efikasno ekstrahovati iz njih. Obzirom na specifičnost supstrata koji se ispituje, u radu su testirane tri metode pripreme uzoraka za određivanje ostataka pirimifos-metila, hlörpirifos-metila i bifentrina, kako bi se poređenjem njihovih najvažnijih analitičkih parametara (prvenstveno prinosa metode – recovery) i uzimajući u obzir njihove praktične prednosti i nedostatke, izabrala najadekvatnija metoda za dalje praćenje degradacije ovih pesticida u toku fermentacije.

12.1. PRIPREMA UZORAKA ZA ISPITIVANJE METODA

Prilikom testiranja efikasnosti metoda pripreme uzoraka za određivanje ostataka pesticida, uzorci su pripremani na isti način kao i za testiranje efikasnosti fermentacije (*odjeljak 9*). Dakle, nakon aktiviranja mikroorganizama i izdvajanja njihovih ćelija (*odjeljak 9.1.*), uzorci sterilisane samlevene organski uzgajane pšenice kojima je dodata sterilisana destilovana voda u odnosu 1:1 (*odjeljak 9.2.*), inokulisani su pripremljenim mikrobiološkim kulturama (10 % v/w) i stavljeni na inkubaciju 48 h na 30 °C.

Nakon završene fermentacije, po 10 g fermentisanih uzoraka stavljeno je u polipropilenske centrifugalne kivete (Sarstedt, Nemačka), obogaćeno sa određenim količinama ispitivanih aktivnih materija pesticida i homogenizovano 3 h na mehaničkoj mešalici kako bi se pesticidi homogeno rasporedili po uzorku. I u ovom

delu eksperimenta su takođe korišćeni analitički standardi pirimifos-metila, hlörpirifos-metila i bifentrina, pri čemu su osnovni rastvori aktivnih materija pravljani u acetonu, a serije radnih koncentracija u destilovanoj vodi. U ovom delu eksperimenta su korišćene tri različite koncentracije za svaku aktivnu materiju, i to: koncentracije jednake MDK vrednostima ispitivanih pesticida u pšenici (5 mg/kg za pirimifos-metil, 3 mg/kg za hlörpirifos-metil i 0,5 mg/kg za bifentrin), odnosno koncentracije 2 puta i 4 puta veće od MDK vrednosti (10 odnosno 20 mg/kg za pirimifos-metil, 6 odnosno 12 mg/kg za hlörpirifos-metil i 1 odnosno 2 mg/kg za bifentrin). Ovi uzorci, zajedno sa kontrolnim uzorcima bez pesticida, su dalje podvrgavani preparativnim metodama.

12.2. METODE PRIPREME UZORAKA ZA ODREĐIVANJE OSTATAKA ISPITIVANIH PESTICIDA

Sve tri ispitivane metode bazirane su na ekstrakciji fermentisanog uzorka pšenice (10 g) homogenizacijom u polipropilenskim centrifugalnim kivetama u dva ekstrakciona ciklusa sa po 25 mL smeše metanol:aceton=1:1 (J.T. Baker) u toku 30 minuta na mehaničkoj rotacionoj mešalici, uz dodatak 5 g anhidrovanog Na₂SO₄ (J.T. Baker), pri čemu je Na₂SO₄ predhodno pripremljen sušenjem 24 h na 130 °C. Nakon centrifugiranja 5 minuta na 4000 obrtaja/min (UZ 4, Iskra, Slovenija) i filtriranja dobijenog ekstrakta preko 1 g anhidrovanog Na₂SO₄, filtrat je uparavan na rotacionom vakuum uparivaču na 35 °C do suvog ostatka (Devarot, Elektromedicina, Slovenija), i u zavisnosti od korišćene metode, dalje specifično procesuiran.

Metoda 1: Prva testirana metoda prečišćavanja uzorka se već pokazala kao izuzetno efikasna metoda pripreme uzoraka za određivanje ostataka različitih pesticida u pšeničnom brašnu [161]. Po toj metodi, suvi ostatak dobijen nakon ekstrakcije i uparavanja rastvoren je u 2,5 mL dihlormetana (Lachner, Češka), od čega je 2 mL propušteno kroz staklenu kolonu predhodno napunjenu sa 1 g anhidrovanog Na₂SO₄ i 4 g mešavine aluminijum oksida i aktivnog uglja (12:1) (J.T. Baker, Nemačka), pri čemu je sorbent prenet u kolonu pomoću 25 mL dihlormetana. Za ove svrhe korišćen je kiseli aluminijum oksid (pH 4,5; I stepen po Brockmann-u), predhodno aktiviran žarenjem 3 h na 450 °C (peć za žarenje VIMS Elektrik, Loznica). Pesticidi su eluirani sa punjenja kolone sa 25 mL dihlormetana. Nakon

uparavanja dobijenog eluata do suvog ostatka (na vakuum uparivaču, 35 °C) i njegovog rastvaranja u 2 mL acetona, 1 µL dobijenog rastvora injektiran je u gasno-maseni spektrometar (GC-MS).

Metoda 2: Druga testirana metoda prečišćavanja uzorka se pokazala kao veoma efikasna za određivanje pesticida u izuzetno kompleksnom zemljišnom matriksu [179]. Po toj metodi, suvi ostatak dobijen nakon ekstrakcije i uparavanja rastvoren je u 2,5 mL smeše etil-acetat:aceton=4:1 (J.T. Baker, Nemačka), od čega je 2 mL dobijenog rastvora propušteno kroz staklenu kolonu predhodno napunjenu sa 1 g anhidrovanog Na₂SO₄ i 5 g florisila (Serva, Nemačka), pri čemu je sorbent prenet u kolonu sa 25 mL smeše etil-acetat:aceton=4:1. Za ove svrhe korišćen je florisil granulacije od 60-100 meša, predhodno aktiviran žarenjem 4 h na 600 °C, i dodatnim sušenjem 8 h na 130 °C. Pesticidi se eluirani sa punjenja kolone sa 25 mL smeše etil-acetat:aceton=4:1. Nakon uparavanja dobijenog eluata do suvog ostatka (na vakuum uparivaču, 35 °C) i njegovog rastvaranja u 2 mL acetona, 1 µL dobijenog rastvora injektiran je u gasno-maseni spektrometar (GC-MS).

Metoda 3: Treća testirana metoda prečišćavanja predstavlja kombinaciju prve dve. Po toj metodi, suvi ostatak dobijen nakon ekstrakcije i uparavanja rastvoren je u 2,5 mL smeše etil-acetat:aceton=4:1, od čega je 2 mL dobijenog rastvora propušteno kroz staklenu kolonu predhodno napunjenu sa 1 g anhidrovanog Na₂SO₄ i 4 g mešavine aluminijum oksida i aktivnog uglja (12:1) (kiseli aluminijum oksid, pH 4,5; I stepen po Brockmann-u; predhodno aktiviran žarenjem 3 h na 450 °C). Pesticidi su eluirani sa punjenja kolone sa 25 mL smeše etil-acetat:aceton=4:1. Nakon uparavanja dobijenog eluata do suvog ostatka (na vakuum uparivaču, 35 °C) i njegovog rastvaranja u 2 mL acetona, 1 µL dobijenog rastvora injektiran je u gasno-maseni spektrometar (GC-MS).

Kontrolni uzorci fermentisanog pšeničnog supstrata bez pesticida ekstrahovani i prečišćeni istim opisanim metodama korišćeni su za pripremu kalibracionih standarda za kvantitativno određivanje ispitivanih aktivnih materija pesticida. Efikasnost tri opisane metode utvrđena je izračunavanjem dobijenog prinosa metode (recovery).

Dodatno, nakon utvrđivanja najefikasnije metode pripreme uzoraka za određivanje ostataka pesticida, izvršena je njena optimizacija određivanjem

optimalne zapremina eluenta korišćenog za ispiranje pesticida sa kolone prilikom prečišćavanja uzorka, pri čemu je ispitivana efikasnost ispiranja sa 15, 20, 25, 30 i 35 mL eluenta korišćenog u izabranoj metodi.

12.2.1. DETEKCIJA I KVANTIFIKACIJA ISPITIVANIH PESTICIDA

Za detekciju i kvantifikaciju ispitivanih aktivnih materija korišćen je gasno-maseni spektrometar (GC/MS) (CP-3800/Saturn 2200, Varian Australija) sa VF-5ms kapilarnom kolonom (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m, Varian).

Temperaturni program za GC je bio sledeći: početna temperatura 170 °C, zagrevanje do 260 °C brzinom od 9 °C/min (izotermalno 3,5 minuta). Kao noseći gas korišćen je helijum (protok od 1,1 mL/min).

Maseni spektrometar radio je u EI/SIM modu (Electron Impact/Selected Ion Monitoring). Temperature ion trap-a i transferline-a bile su 210 °C tj. 250 °C. Po jedan specifični jon je korišćen za kvantifikaciju analita, dok je drugi (predstavljen u zagradi) upotrebljen za potvrdu. Korišćeni su sledeći karakteristični fragmenti (m/z) za detekciju i kvantifikaciju svake aktivne materije: 290 (233) za pirimifos-metil, 286 (125) za hlorporifos-metil i 181 (166) za bifentrin.

13. ISPITIVANJE UTICAJA MLEČNOKISELINSKE I KVASNE FERMENTACIJE NA DEGRADACIJU PIRIMIFOS-METILA, HLORPIRIFOS-METILA I BIFENTRINA

U okviru ispitivanja uticaja fermentacije pšeničnog supstrata na degradaciju ispitivanih pesticida, cilj eksperimenata je bio usmeren kako ka ispitivanju mogućnosti korišćenja fermentacionog procesa, kao jednog od osnovnih postupaka prerade hrane, u svrhu smanjenja nivoa zagađenosti finalnog proizvoda pesticidima, tako i ka optimizaciji fermentacionih parametara u cilju postizanja maksimalnog stepena degradacije pesticida.

13.1. PRIPREMA FERMENTACIONOG PŠENIČNOG SUPSTRATA

Zrno očišćene organski uzgajane pšenice (*Triticum spelta*) netretirane pesticidima samleveno je u blenderu i nakon mlevenja odmeravano u balone za fermentaciju i obogaćeno sa određenim koncentracijama ispitivanih pesticida. Za

kontaminaciju pšenice korišćeni su analitički standardi pirimifos-metila, hlörpirifos-metila i bifentrina pri čemu su osnovni rastvori aktivnih materija pravljani u acetonu, a serije radnih koncentracija u destilovanoj vodi. Nakon obogaćivanja pesticidima uzorci pšenice su homogenizovani 24 h na tresilici kako bi se pesticidi homogeno rasporedili po uzorku. Po isteku 24 h obogaćeni uzorci samlevene pšenice sterilisani su u autoklavu 15 minuta na 121 °C (103 kPa). Nakon hlađenja fermentacioni supstrat pravljani je dodavanjem sterilisane destilovane vode u odnosu 1:1 i inokulisan inokulumom pripremljenim po predhodno opisanoj proceduri (*odeljak 9.1.*).

13.2. ISPITIVANJE SPONTANE DEGRADACIJE PESTICIDA I DEGRADACIJE POD DEJSTVOM STERILIZACIJE U CILJU UTVRĐIVANJA DOPRINOSA PROCESA FERMENTACIJE U DEGRADACIJI PESTICIDA

S obzirom da će u istraživanjima uticaja različitih fermentacionih parametara na stepen degradacije pirimifos-metila, hlörpirifos-metila i bifentrina pri mlečnokiselinskoj i kvasnoj fermentaciji pšenice u laboratorijskim uslovima, opisanim u sledećem odeljku, dobijena ukupna degradacija pesticida predstavljati sumu spontane degradacije i degradacije izazvane aktivnošću fermentativnih mikroorganizama, dodatnim ispitivanjima određen je i doprinos samog procesa fermentacije u degradaciji pesticida, kako bi se realnije sagledao i jasnije definisao uticaj aktivnosti izabranih fermentativnih mikroorganizama na degradaciju pesticida uključenih u istraživanje.

Doprinos samog procesa fermentacije degradaciji pesticida, odnosno određivanje stepena degradacije izazvane samo aktivnošću fermentativnih mikroorganizama, određen je pomoću dve kontrolne grupe uzoraka pšenice.

Prva kontrola obuhvatala je određivanje ostataka ispitivanih pesticida u uzorcima kontaminirane pšenice odmah nakon sterilizacije u autoklavu, odnosno pre inokulacije mikroorganizmima. Na ovaj način utvrđeno je eventualno postojanje degradacije ispitivanih pesticida pod dejstvom toplote tokom sterilizacije i definisana je količina rezidua u pšeničnim uzorcima koji se dalje uključuju u fermentacione procese.

Druga kontrolna grupa obuhvatala je uzorke pšenice obogaćene istim količinama ispitivanih pesticida i podvrgnute istim preparativnim procedurama kao i kod fermentacije, samo bez inokulacije mikroorganizmima. Tako je, određivanjem ostataka ispitivanih pesticida u uzorcima pšeničnog supstrata bez mikroorganizama inkubiranog u datim vremenskim intervalima na određenim temperaturama, utvrđeno eventualno postojanje spontane degradacije ispitivanih pesticida na 23, 30 i 37 °C tj. nakon 24, 48 i 72 h.

13.3. ISPITIVANJE UTICAJA FERMENTACIJE PŠENIČNOG SUPSTRATA NA DEGRADACIJU PESTICIDA UZ OPTIMIZACIJU USLOVA FERMENTACIJE U CILJU POSTIZANJA MAKSIMALNOG STEPENA DEGRADACIJE

U okviru ispitivanja uticaja različitih fermentacionih parametara na stepen degradacije pirimifos-metila, hlörpirifos-metila i bifentrina pri mlečnokiselinskoj i kvasnoj fermentaciji pšenice u laboratorijskim uslovima, eksperiment je dizajniran po već pomenutoj statističkoj metodi odzivne površine, tj. Box-Behnken planu eksperimenta sa tri faktora na tri nivoa i tri ponavljanja u centralnoj tački. Faktori i njihovi nivoi pri fermentacijama bili su isti kao pri optimizaciji uslova fermentacije (veličina inokuluma: 6, 8 i 10 %; dužina fermentacije: 24, 48 i 72 h; temperatura inkubacije: 23, 30 i 37 °C) (**Tabela 9.3.2.**). Međutim, osnovni odziv u ovom delu eksperimenta bio je određivanje ostataka ispitivanih pesticida u uzorcima, odnosno praćenje promena koncentracija ostataka aktivnih materija u uzorcima, kao parametar za utvrđivanje uticaja fermentacije na smanjenje nivoa ostataka pesticida u supstratu.

Predhodno opisana ispitivanja uticaja najvažnijih parametara fermentacije na stepen degradacije pesticida u supstratu rađena su u po tri ponavljanja, uz variranje koncentracija aplikovanih aktivnih materija pesticida. U eksperimentu su korišćene tri različite koncentracije za svaku aktivnu materiju, i to: koncentracije primene jednake MDK vrednostima ispitivanih pesticida u pšenici (5 mg/kg za pirimifos metil, 3 mg/kg za hlörpirifos metil i 0,5 mg/kg za bifentrin), odnosno koncentracije 5 puta i 15 puta veće od MDK vrednosti (25 i 75 mg/kg za pirimifos metil, 15 i 45 mg/kg za hlörpirifos metil i 2,5 i 7,5 mg/kg za bifentrin).

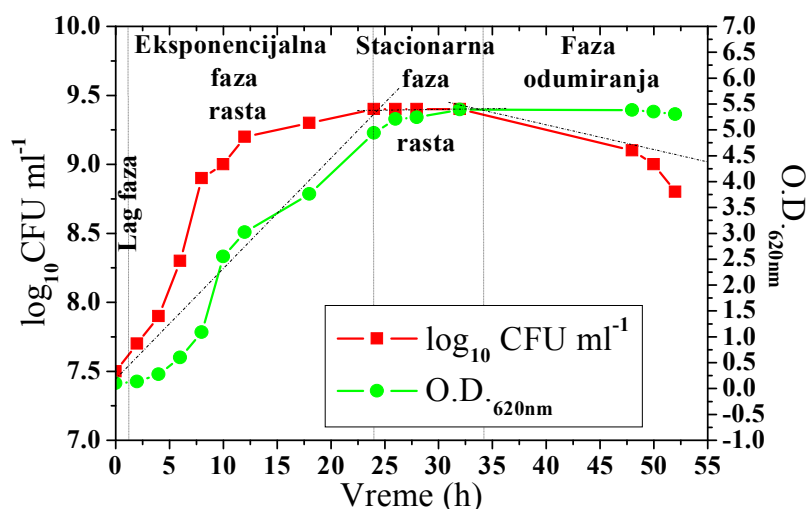
REZULTATI I
DISKUSIJA

14. UTVRĐIVANJE FAZA RASTA I GENERACIJSKOG VREMENA MIKROORGANIZAMA

Određivanje parametara rasta mikroorganizama u laboratorijskim uslovima u kojima se izvodi eksperiment prvi je važan korak za dalja ispitivanja. Iz tog razloga utvrđene su faze krive rasta, generacijska vremena i koeficijenti rasta korišćenih mikroorganizama kako bi se definisalo trajanje aktivacije fermentativnih mikroorganizama i precizirala početna brojnost ćelija u inokulumu za fermentacije.

14.1. FAZE RASTA I GENERACIJSKO VREME *LACTOBACILLUS PLANTARUM*

Na osnovu rezultata dobijenih praćenjem dinamike rasta ćelija *L. plantarum* u MRS bujonu u 30 minutnom vremenskom intervalu u trajanju od 54 h (**Prilog 1**) određene su faze rasta korišćene kulture mikroorganizma u datim eksperimentalnim uslovima. Rezultati su prikazani na **grafikonu 14.1.1**.



Grafikon 14.1.1. Faze rasta *Lactobacillus plantarum*

Kao što se sa grafikona može videti, lag faza u datim laboratorijskim uslovima za ovu kulturu mikroorganizma izrazito je mala, pa ćelije *L. plantarum* već nakon dva sata inkubacije započinju ubrzanu deobu tj. ekspanzivnu fazu rasta (t_0). Kratka lag faza karakteristična je za *L. plantarum* bez obzira da li se uzgaja u klasičnoj MRS podlozi ili u MRS podlozi dodatno obogaćenju glukozom i laktozom [180]. Sa druge strane iz dobijenih rezultata se može videti da se u MRS bujonu koji

nije modifikovan dodavanjem izvora ugljenih hidrata eksponencijalna faza rasta produžava do 24 h (nasuprot 14 h u modifikovanom MRS bujonu) [180]. Stacionarna faza koja počinje nakon 24 h (t) završava se nakon 34 h od početka inkubacije na 30 °C u MRS bujonu kada započinje odumiranje ćelija, koje se, razume se, jasnije uočava kao smanjenje vijabilnosti ćelija tj. smanjenje CFU parametra, dok optička gustina ostaje konstantna u ovoj fazi (**Grafikon 14.1.1.**).

Broj ćelija *L. plantarum* na početku esponencijalne faze rasta iznosi oko 5×10^7 /mL podloge (\log_{10} CFU/mL je 7,7) pri čemu absorbanca O.D._{620nm} iznosi 0,1, dok na kraju eksponencijalne faze rasta broj ćelija prestiže nivo od 10^9 /mL podloge (\log_{10} CFU/mL je iznad 9) pri čemu absorbanca pri merenju optičke gustine na 620 nm dostiže 5.

Kao parametri za izračunavanje konstante stope rasta (μ) i generacijskog vremena (g) korišćene kulture *L. plantarum* u datim laboratorijskim uslovima definisani su:

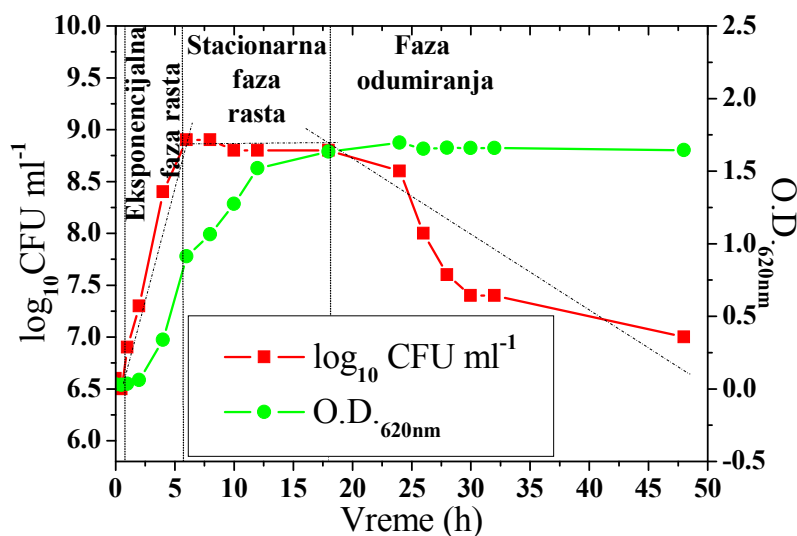
- početak eksponencijalne faze rasta: $t_0 = 2$ h
- brojnost ćelija u trenutku početka eksponencijalne faze rasta: $N_0 = 5,35 \times 10^7$ /mL
- $\log_{10}N_0 = 7,7283$
- kraj eksponencijalne faze tj. početak stacionarne faze rasta: $t = 24$ h
- brojnost ćelija na kraju eksponencijalne faze rasta: $N_t = 2,34 \times 10^9$ /mL
- $\log_{10}N_t = 9,3692$

Dobijena konstanta stope rasta je $\mu = 0,17$ /h, dok je $g = 5,45$ generacija za 22 h odnosno generacijsko vreme je 4,04 h.

Utvrđivanjem faza rasta *L. plantarum* u datim laboratorijskim uslovima određeno je da je optimalno trajanje svake sledeće aktivacije 24 h u MRS bujonu na 30 °C. Na ovaj način dostiže se broj ćelija od $\sim 10^9$ /mL u inokulumu koji će se dalje koristiti za fermentaciju pšenice.

14.2. FAZE RASTA I GENERACIJSKO VREME *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Na osnovu rezultata dobijenih praćenjem dinamike rasta ćelija *S. cerevisiae* u YPD bujonu u 30 minutnom vremenskom intervalu u trajanju od 48 h (**Prilog 2**) određene su faze rasta korišćene kulture mikroorganizma u datim eksperimentalnim uslovima. Rezultati su prikazani na **grafikonu 14.2.1.**



Grafikon 14.2.1. Faze rasta *Saccharomyces cerevisiae*

Rezultati prikazani na grafikonu ukazuju na to da je kod korišćene kulture ovog mikroorganizma lag faza u datim laboratorijskim uslovima još kraća nego kod laktobacila, pa ćelije *S. cerevisiae* već nakon prvog sata inkubacije započinju ubranu deobu tj. ekspancijalnu fazu rasta (t_0). Ono što je takođe upečatljivo je da je i ekspancijalna faza rasta kod ovog mikroorganizma veoma mala. Generalno *S. cerevisiae* karakteriše izrazito brz rast [181], što je i u ovom slučaju potvrđeno, pa se ekspancijalna faza rasta završava već nakon 5 h od početka inkubacije (t). Stacionarna faza se završava već nakon 16 h od početka inkubacije na 30 °C u YPD bujonu kada započinje odumiranje ćelija, koje se, opet, jasnije uočava kao smanjenje vijabilnosti ćelija tj. smanjenje CFU parametra, dok optička gustina ostaje konstantna u ovoj fazi (**Grafikon 14.2.1.**).

Broj ćelija *S. cerevisiae* na početku ekspancijalne faze rasta iznosi oko $10^7/\text{mL}$ podloge ($\log_{10}\text{CFU}/\text{mL}$ je 6,9) pri čemu absorbanca $\text{O.D.}_{620\text{nm}}$ iznosi 0,03, dok na kraju ekspancijalne faze rasta broj ćelija dostiže nivo od $10^9/\text{mL}$ podloge ($\log_{10}\text{CFU}/\text{mL}$ je 8,9) pri čemu absorbanca pri merenju optičke gustine na 620 nm do kraja stacionarne faze dostiže 1,7.

Kao parametri za izračunavanje konstante stope rasta (μ) i generacijskog vremena (g) korišćene kulture *S. cerevisiae* u datim laboratorijskim uslovima definisani su:

- početak ekspancijalne faze rasta: $t_0 = 1 \text{ h}$

- brojnost ćelija u trenutku početka eksponencijalne faze rasta: $N_0 = 7,95 \times 10^6 / \text{mL}$
- $\log_{10} N_0 = 6,9004$
- kraj eksponencijalne faze tj. početak stacionarne faze rasta: $t = 5 \text{ h}$
- brojnost ćelija na kraju eksponencijalne faze rasta: $N_t = 7,25 \times 10^8 / \text{mL}$
- $\log_{10} N_t = 8,8603$

Dobijena konstanta stope rasta je $\mu = 1,13/\text{h}$, dok je $g = 6,5$ generacija za 4 h odnosno generacijsko vreme je 36,6 minuta.

Utvrđivanjem faza rasta *S. cerevisiae* u datim laboratorijskim uslovima određeno je da je optimalno trajanje svake sledeće aktivacije 5 h u YPD bujonu na 30 °C. Na ovaj način dostiže se broj ćelija od $\sim 10^9 / \text{mL}$ u inokulumu koje će se dalje koristiti za fermentaciju pšenice.

15. OPTIMIZACIJA USLOVA MIKROBIOLOŠKIH FERMENTACIJA

Kako bi se utvrdila mogućnost izvođenja efikasnih kontrolisanih fermentacija, nakon definisanja parametara rasta korišćenih mikroorganizama bilo je potrebno izvršiti optimizaciju uslova mikrobioloških fermentacija žitnog supstrata u laboratorijskim uslovima u kojima se izvodi eksperiment. U okviru optimizacije definisani su uticaji veličine inokuluma, dužine trajanja fermentacije i temperature inkubacije na efikasnost fermentacije izraženu kroz smanjenje pH vrednosti supstrata, porast broja vijabilnih mikroorganizama kao i produkciju mlečne kiseline tj. ugljen-dioksida od strane *L. plantarum* odnosno *S. cerevisiae*.

15.1. OPTIMIZACIJA USLOVA MLEČNOKISELINSKE FERMENTACIJE PŠENICE

Rezultati ispitivanja uticaja veličine inokuluma, dužine trajanja fermentacije i temperature inkubacije na efikasnost mlečnokiselinske fermentacije izraženu kroz smanjenje pH vrednosti supstrata, porast broja vijabilnih mikroorganizama po gramu supstrata kao i produkciju mlečne kiseline prikazani su u **tabeli 15.1.1.**

Tabela 15.1.1. Uticaj fermentacionih parametara na efikasnost mlečnokiselinske fermentacije

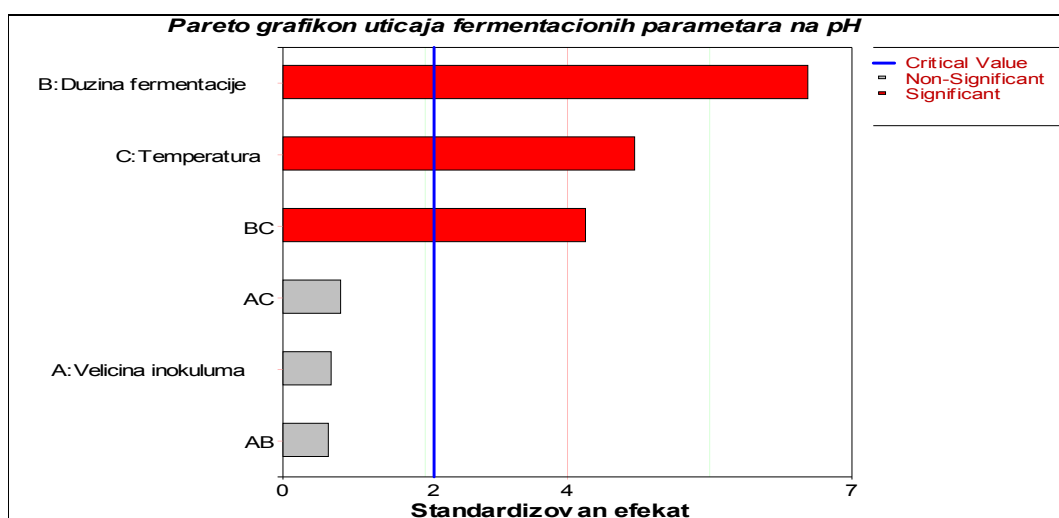
<i>Faktor</i>			<i>Odziv</i>		
A: veličina inokuluma (%)	B: dužina fermentacije (h)	C: temperatura (°C)	pH	TTA (%)	log ₁₀ CFU/g
6	-	-	6,25	0,04	7,9
8	-	-	6,20	0,03	8,1
10	-	-	6,16	0,04	8,3
10	72	30	4,26	0,40	9,2
10	24	30	4,56	0,31	9,1
6	72	30	4,35	0,44	9,1
6	24	30	4,57	0,26	9,1
10	48	37	4,39	0,45	9,1
10	48	23	4,50	0,29	9,0
6	48	37	4,35	0,39	9,0
6	48	23	4,56	0,29	9,0
8	72	37	4,34	0,44	8,7
8	72	23	4,34	0,41	8,9
8	24	37	4,44	0,38	8,9
8	24	23	4,94	0,19	9,0
8	48	30	4,40	0,39	9,1
8	48	30	4,39	0,36	9,1
8	48	30	4,40	0,39	9,1

Kao što se može videti iz **tabele 15.1.1.**, zasejavanje pšeničnog supstrata na nivou 6% (v/w) (inokulumom *L. plantarum* sa $\sim 10^9$ ćelija/mL) obezbedilo je 7,9 log₁₀CFU/g uzorka, zasejavanje na nivou 8% (v/w) 8,1 log₁₀CFU/g uzorka, dok je zasejavanje pšeničnog supstrata na nivou 10% (v/w) obezbedilo 8,3 log₁₀CFU/g uzorka, pri čemu su se početne pH vrednosti kretale oko 6,20.

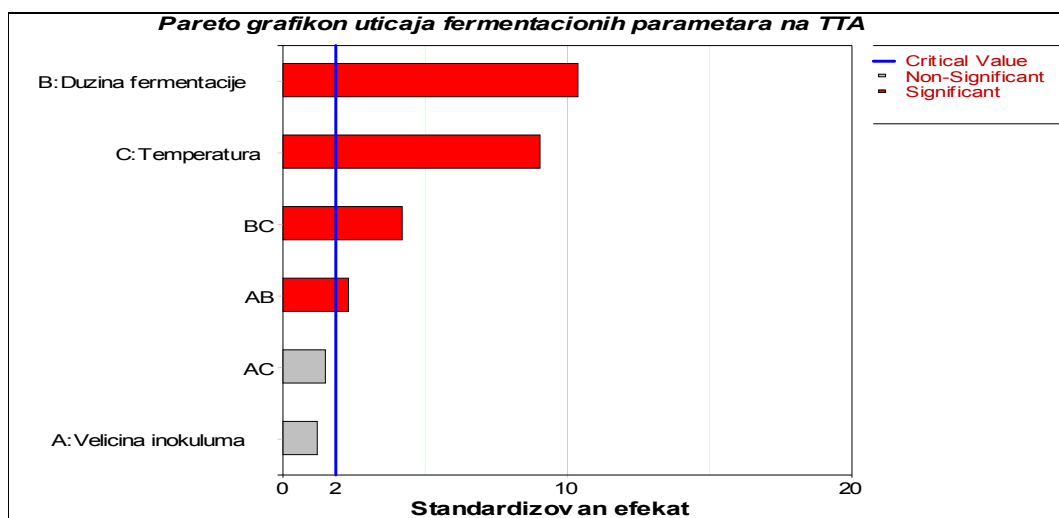
Dobijeni rezultati prezentovani u **tabeli 15.1.1.** ukazuju da promene nivoa nezavisno promenljivih faktora dovode do promena u odzivima. Kako bi se definisale značajnosti uticaja pojedinačnih fermentacionih parametara (faktora) na efikasnost mlečnokiselinske fermentacije (odzive) rezultati su obrađeni u softverskom programu ReliaSoft DOE++ u kojem je zatim urađena i optimizacija ispitivanih fermentacionih parametara.

Značajnosti efekata pojedinačnih faktora (A, B, C) kao i njihovih interakcija (AB, AC, BC) za svaki odziv ponaosob date su Pareto grafikonima (**Grafikoni**

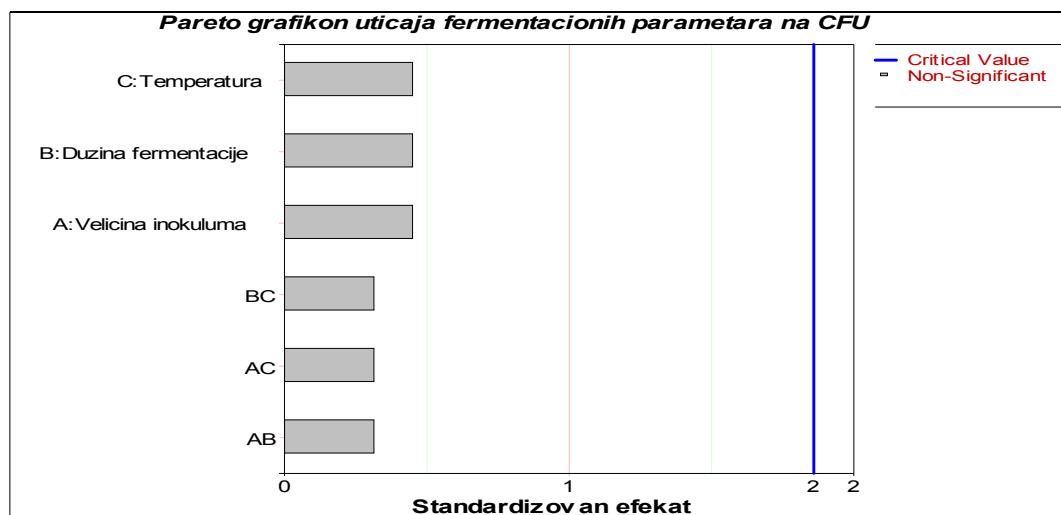
15.1.1.-15.1.3.). Dužine bara na grafikonima proporcionalne su standardizovanim efektima (izračunati efekti podeljeni njihovim standardnim devijacijama), a faktori su poredani po opadajućem apsolutnom efektu. Plava vertikalna linija na grafikonima pokazuje granicu koju prelaze statistički značajni efekti, u odabranom intervalu poverenja od 90% ($\alpha=0,1$).



Grafikon 15.1.1. Pareto grafikon značajnosti uticaja fermentacionih parametara na promene pH vrednosti supstrata pri fermentaciji sa *L. plantarum*



Grafikon 15.1.2. Pareto grafikon značajnosti uticaja fermentacionih parametara na promene u produkciji mlečne kiseline (TTA)



Grafikon 15.1.3. Pareto grafikon značajnosti uticaja fermentacionih parametara na promene brojnosti vijabilnih ćelija *L. plantarum* po gramu pšeničnog supstrata (\log_{10} CFU/g)

Prezentovani podaci iz **tabele 15.1.1.** i sa **grafikona 15.1.1 i 15.1.2.** ukazuju na to da dužina trajanja mlečnokiselinske fermentacije i temperatura inkubacije kao i njihove interakcije značajno utiču na promenu pH vrednosti pšeničnog supstrata kao i na povećanje produkcije TTA, dok veličina inokuluma, ako se izuzme slaba značajnost u interakciji sa dužinom fermentacije (**Grafikon 15.1.2.**), generalno nema efekta na ove odzive. Uzimajući u obzir da se eksponencijalna faza rasta *L. plantarum* završava nakon 24 h, a dužine trajanja fermentacija su 24 h i više, očigledno je da se već nakon tog vremena dostiže dovoljan broj ćelija laktobacila koji omogućuje efikasno odigravanje fermentacije supstrata, pa ukupna efikasnost fermentacionog procesa neće zavisiti od početnog broja ćelija inokuliranih u pšenični supstrat. Što se tiče brojnosti vijabilnih ćelija *L. plantarum* po gramu pšeničnog supstrata (CFU), ni jedan od fermentacionih parametara nema efekat na ovaj odziv (**Grafikon 15.1.3.**). Predpostavka je da su parametri rasta *L. plantarum* u pšeničnom supstratu slični onima u MRS bujonu, i da se stacionarna faza rasta ovog laktobacila, dostignuta nakon 24 h, prolongira do 48 odnosno 72 h održavajući približno istu količinu vijabilnih ćelija u tim vremenskom intervalima. Takođe, znajući da je optimalna temperatura rasta *L. plantarum* u opsegu od 28-35 °C, pri čemu je efektivni rast moguć i na 15 i 40 °C, ne iznenađuje što temperatura inkubacije ne utiče značajno na CFU.

Uzimajući u obzir faktore (A, B, C), njihove interakcije (AB, AC, BC) i interakcije drugog reda (AA, BB, CC) koji su pokazali statistički značajne efekte, urađena je regresiona analiza za svaki odziv.

Regresiona analiza za uticaj fermentacionih parametara na promene pH vrednosti supstrata pri fermentaciji sa *L. plantarum* data je u **tabeli 15.1.2.**

Tabela 15.1.2. Regresiona analiza značajnosti uticaja fermentacionih parametara na promene pH vrednosti supstrata pri fermentaciji sa *L. plantarum*

REGRESIONA ANALIZA			
	Regresioni koeficijent*	Standardna greška koeficijenta	T vrednost [#]
Konstanta	4,3885	0,02	219,9661
B:Dužina fermentacije	-0,1525	0,0147	-10,386
C:Temperatura	-0,1025	0,0147	-6,9807
BC	0,125	0,0208	6,0197
BB	0,0527	0,0215	2,4452
CC	0,0677	0,0215	3,1413

* Veći apsolutni regresioni koeficijent = veći stepen povezanosti faktora i odziva

[#] Veća apsolutna T-vrednost = veća statistička značajnost efekta

Regresionom analizom određeni su regresioni koeficijenti za značajne parametre i izračunate su standardne greške koeficijenata koje omogućavaju jednostavno merenje nepouzdanosti izračunatih vrednosti. Veći apsolutni regresioni koeficijenti ukazuju na veći stepen povezanosti faktora i odziva, a njihovi predznaci na prirodu odnosa između njih. Takođe, veće apsolutne T-vrednosti, koje se dobijaju kada se koeficijent podeli njegovom standardnom greškom, označavaju manju mogućnost da je vrednost koeficijenta nula i time ukazuje na veću statističku značajnost člana.

Regresionom analizom statistički značajnih parametara, dobijen je sledeći matematički model za promenu pH supstrata pri fermentaciji sa *L. plantarum*:

$$Y = 4,397 - 0,1525B - 0,1025C + 0,125BC + 0,0527BB + 0,0677CC$$

odakle se može videti da produžavanje fermentacije i porast temperature dovode do smanjenja pH vrednosti (odziva), dok interakcije porasta ovih faktora, kao i interakcija drugog reda za porast temperaturnog faktora negativno utiču na smanjenje pH. Adekvatnost dobijene regresije je određena korišćenjem analize varijanse (ANOVA), a rezultati su prikazani u **tabeli 15.1.3.**

Tabela 15.1.3. ANOVA tabela za uticaj fermentacionih parametara na promene pH vrednosti supstrata pri fermentaciji sa *L. plantarum*

ANOVA tabela*					
	DF	SS	MS	F	P [#]
Model	5	0,3582	0,0716	41,5321	5,96*10 ⁻⁶
B:Dužina fermentacije	1	0,1861	0,1861	107,8684	2,61*10 ⁻⁶
C:Temperatura	1	0,0841	0,0841	48,7307	6,46*10 ⁻⁵
BC	1	0,0625	0,0625	36,2364	0,0002
BB	1	0,0103	0,0103	5,9791	0,037
CC	1	0,017	0,017	9,8678	0,0119
Rezidual	9	0,0155	0,0017		
„Lack of fit“	3	0,0088	0,0029	2,5881	0,1484
R² = 0,9585					

* DF – stepeni slobode; SS – suma kvadrata; MS- srednja kvadratna vrednost; F – F vrednost; P – P vrednost

[#] P<0,1 (crvena boja) ukazuje na statistički značajan uticaj faktora na odziv; niža P-vrednost ukazuje na veću statističku značajnost člana

U **tabeli 15.1.3.** su date funkcije greške u cilju definisanja značaja faktora i vrednosti faktora tj. parametara fermentacije. Data suma kvadrata (SS) za svaki faktor, koja se dobija kao suma kvadrata razlika između eksperimentalne vrednosti i vrednosti izračunate dobijenim matematičkim modelom (1), kvantifikuje njegov značaj i što je njegova vrednost veća veći je i značaj faktora. Definisana je i srednja kvadratna vrednost (MS), kao količnik sume kvadrata i odgovarajućeg broja stepeni slobode. Dalje je izračunata F-vrednost, kao odnos srednje kvadratne greške usled regresije i srednje kvadratne greške usled reziduala, pri čemu veća F-vrednost ukazuje na veći značaj člana, kao i P-vrednost koja se koristi za definisanje statistički značajnih varijabla u odabranom intervalu poverenja od 90% ($\alpha=0,1$). Visoka vrednost R² i neznačajnost nedostatka podešenja (*lack of fit*) pokazatelji su da je dobijena disperzija tačaka oko prave nagiba veoma mala što ukazuje na dobro slaganje tj. visok stepen korelacije modela datog jednačinom i eksperimentalnih vrednosti, odnosno na to da model verodostojno opisuje ekperimentalne rezultate.

Po istom principu kao regresiona analiza za uticaj fermentacionih parametara na promene pH vrednosti supstrata urađene su regresione analize i za druga dva odziva.

Regresiona analiza za uticaj fermentacionih parametara na promene u produkciji mlečne kiseline (TTA) data je u **tabeli 15.1.4.**

Tabela 15.1.4. Regresiona analiza značajnosti uticaja fermentacionih parametara na promene u produkciji mlečne kiseline (TTA)

REGRESIONA ANALIZA			
	Regresioni koeficijent	Standardna greška koeficijenta	T vrednost
Konstanta	0,3593	0,0052	69,1695
A:Veličina inokuluma	0,0088	0,0071	1,2301
B:Dužina fermentacije	0,0687	0,0071	9,6647
C:Temperatura	0,06	0,0071	8,4347
AB	-0,0225	0,0101	-2,2366
BC	-0,04	0,0101	-3,9761

* Veći apsolutni regresioni koeficijent = veći stepen povezanosti faktora i odziva

Veća apsolutna T-vrednost = veća statistička značajnost efekta

Regresionom analizom statistički značajnih parametara, dobijen je sledeći matematički model za promene u produkciji mlečne kiseline:

$$Y = 0,3593 + 0,0088A + 0,0687B + 0,06C - 0,00225AB - 0,04BC$$

odakle se može videti da produžavanje fermentacije i porast temperature i, u maloju meri, povećanje veličine inokuluma, dovode do porasta u produkciji mlečne kiseline (odziva), dok interakcije povećanje veličine inokuluma – produžavanje fermentacije i produžavanje fermentacije – porast temperature negativno utiču na ovu produkciju. Adekvatnost dobijene regresije je određena korišćenjem analize varijanse (ANOVA), a rezultati su prikazani u **tabeli 15.1.5.**

Tabela 15.1.5. ANOVA tabela za uticaj fermentacionih parametara na promene u produkciji mlečne kiseline (TTA)

	ANOVA tabela*				P [#]
	DF	SS	MS	F	
Model	5	0,0757	0,0151	37,3751	9,33*10⁻⁶
A:Veličina inokuluma	1	0,0006	0,0006	1,513	0,2499
B:Dužina fermentacije	1	0,0378	0,0378	93,4069	4,75*10⁻⁶
C:Temperatura	1	0,0288	0,0288	71,1436	1,45*10⁻⁵
AB	1	0,002	0,002	5,0023	0,0521
BC	1	0,0064	0,0064	15,8097	0,0032
Rezidual	9	0,0036	0,0004		
„Lack of fit“	7	0,003	0,0004	1,4492	0,4673
R² = 0,9541					

* DF – stepeni slobode; SS – suma kvadrata; MS- srednja kvadratna vrednost; F – F vrednost; P – P vrednost

P<0,1 (crvena boja) ukazuje na statistički značajan uticaj faktora na odziv; niža P-vrednost ukazuje na veću statističku značajnost člana

Dobijena visoka vrednost R^2 i neznačajnost nedostatka podešenja (*lack of fit*) pokazatelji su da je dobijena disipacija tačaka oko prave nagiba veoma mala što ukazuje na dobro slaganje tj. visok stepen korelacije modela datog jednačinom i eksperimentalnih vrednosti, odnosno na to da model verodostojno opisuje ekperimentalne rezultate.

Regresiona analiza za uticaj fermentacionih parametara na promene brojnosti vijabilnih ćelija *L. plantarum* po gramu pšeničnog supstrata (\log_{10} CFU/g) data je u tabeli 15.1.6..

Tabela 15.1.6. Regresiona analiza značajnosti uticaja fermentacionih parametara na promene brojnosti vijabilnih ćelija *L. plantarum* po gramu pšeničnog supstrata (\log_{10} CFU/g)

REGRESIONA ANALIZA			
	Regresioni koeficijent	Standardna greška koeficijenta	T vrednost
Konstanta	9,1143	0,0351	259,5627
C: Temperatura	-0,025	0,0328	-0,7611
CC	-0,1643	0,0481	-3,4168

* Veći apsolutni regresioni koeficijent = veći stepen povezanosti faktora i odziva

Veća apsolutna T-vrednost = veća statistička značajnost efekta

Regresionom analizom statistički značajnih parametara, dobijen je sledeći matematički model za promene u brojnosti vijabilnih ćelija *L. plantarum* po gramu pšeničnog supstrata (\log_{10} CFU/g):

$$Y = 9,1143 - 0,025C - 0,1643CC$$

odakle se može videti da porast temperature, a naročito interakcija drugog reda za porast temperaturnog faktora, dovode do smanjenja brojnosti vijabilnih ćelija *L. plantarum* po gramu pšeničnog supstrata (\log_{10} CFU/g). Adekvatnost dobijene regresije je određena korišćenjem analize varijanse (ANOVA), a rezultati su prikazani u tabeli 15.1.7..

Tabela 15.1.7. ANOVA tabela za uticaj fermentacionih parametara na promene brojnosti vijabilnih ćelija *L. plantarum* po gramu pšeničnog supstrata (\log_{10} CFU/g)

ANOVA tabela*					
	DF	SS	MS	F	P [#]
Model	2	0,1058	0,0529	6,1269	0,0147
C: Temperatura	1	0,005	0,005	0,5793	0,4613
CC	1	0,1008	0,1008	11,6745	0,0051
Rezidual	12	0,1036	0,0086		

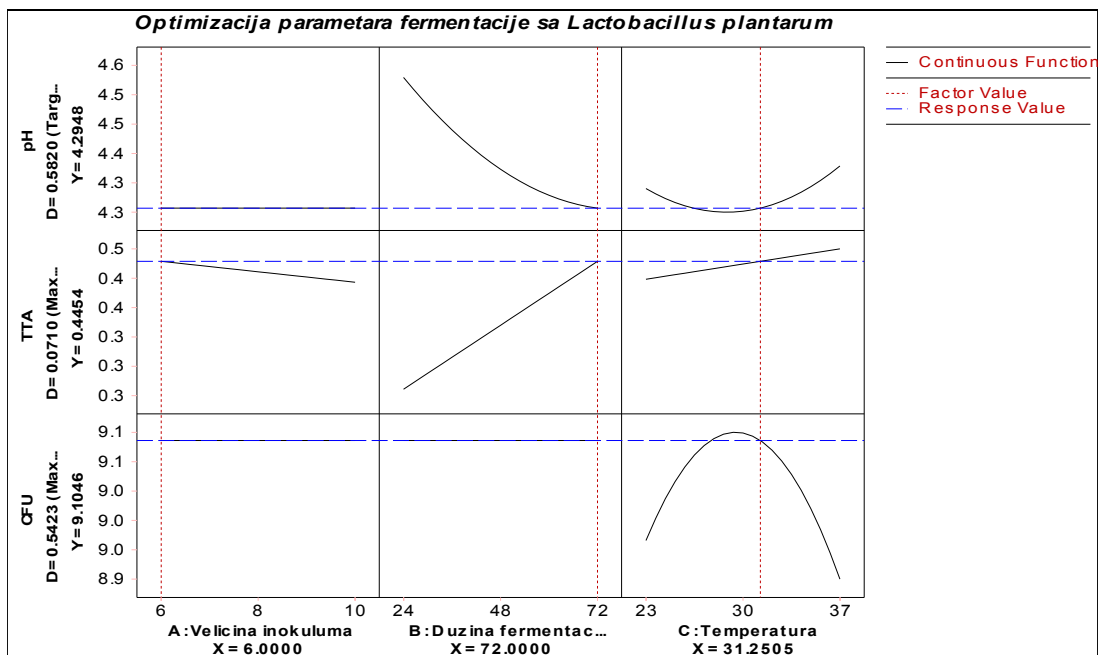
R² = 0,5052

* DF – stepeni slobode; SS – suma kvadrata; MS- srednja kvadratna vrednost; F – F vrednost; P – P vrednost

P<0,1 (crvena boja) ukazuje na statistički značajan uticaj faktora na odziv; niža P-vrednost ukazuje na veću statističku značajnost člana

Dobijena niska vrednost R² pokazatelj je da je dobijena disipacija tačaka oko prave nagiba velika što ukazuje na to da model ne opisuje ekperimentalne rezultate verodostojno.

Nakon utvrđivanja značajnosti uticaja pojedinačnih fermentacionih parametara na fermentaciju, u softverskom programu ReliaSoft DOE++ urađena je i optimizacija ispitivanih fermentacionih parametara u cilju određivanja njihovih optimalnih nivoa pri kojima se postiže maksimalna efikasnost fermentacije sa *L. plantarum*. Dobijeni rezultati prikazani su na **grafikonu 15.1.4.**



Grafikon 15.1.4. Optimizacija parametara fermentacije pšeničnog supstrata sa *Lactobacillus plantarum*

Sa prikazanog grafikona može se videti da je maksimalna efikasnost mlečnokiselinske fermentacije pšeničnog supstrata inokulisanog sa *L. plantarum* dostignuta nakon 72 h pri temperaturi koja je najbliža njegovoj optimalnoj temperaturi rasta (~31 °C) i uz inokulaciju na nivou od 6% (v/w). Pri ovim fermentacionim parametrima pH vrednost supstrata spustila se na 4,3 uz produkciju mlečne kiseline od 0,44 % i dostizanje brojnosti vijabilnih ćelija *L. plantarum* od 9,1 log₁₀CFU/g.

15.2. OPTIMIZACIJA USLOVA KVASNE FERMENTACIJE PŠENICE

Rezultati ispitivanja uticaja veličine inokuluma, dužine trajanja fermentacije i temperature inkubacije na efikasnost kvasne fermentacije izraženu kroz smanjenje pH vrednosti supstrata, porast broja vijabilnih mikroorganizama po gramu supstrata kao i produkciju CO₂ prikazani su u **tabeli 15.2.1.**

Tabela 15.2.1. Uticaj fermentacionih parametara na efikasnost kvasne fermentacije

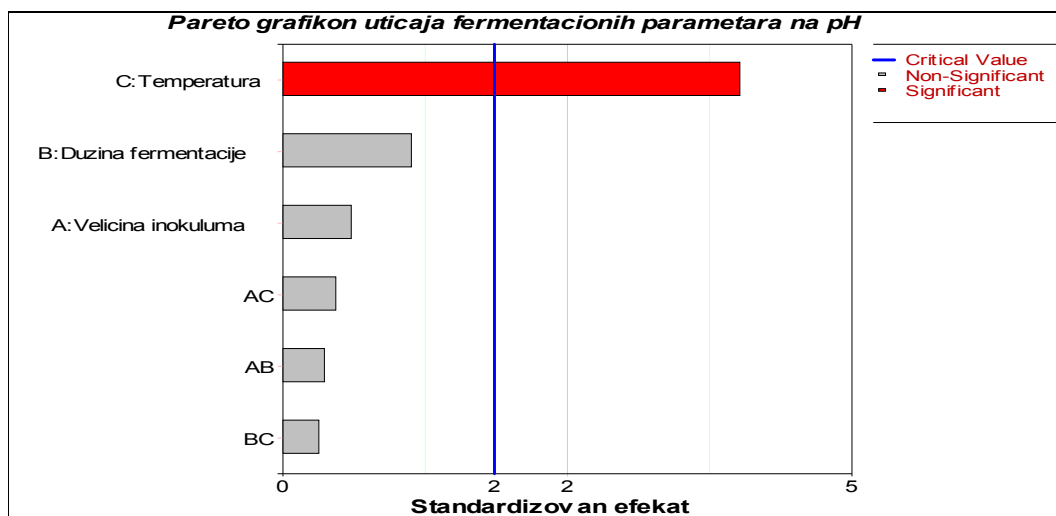
<i>Faktor</i>			<i>Odziv</i>			
A: veličina inokuluma (%)	B: dužina fermentacije (h)	C: temperatura (°C)	pH	CO₂/kg	log₁₀CFU/g	
6	-	-	6,61	-	7,3	
8	-	-	6,33	-	7,5	
10	-	-	6,36	-	7,6	
10	72	30	5,24	4,33	9,1	
10	24	30	5,37	2,93	8,9	
6	72	30	5,21	4,72	9,0	
6	24	30	5,42	2,64	8,8	
10	48	37	5,02	4,43	8,8	
10	48	23	5,30	4,54	8,9	
6	48	37	5,05	4,57	8,6	
6	48	23	5,43	4,62	8,9	
8	72	37	5,07	4,18	8,9	
8	72	23	5,28	5,75	9,0	
8	24	37	5,03	4,38	8,7	
8	24	23	5,31	2,23	8,9	
8	48	30	5,18	2,73	8,9	
8	48	30	5,11	3,23	9,0	
8	48	30	5,16	2,82	8,9	

Kao što se može videti iz **tabele 15.2.1.**, zasejavanje pšeničnog supstrata na nivou 6% (v/w) (inokulumom *S. cerevisieasa* sa ~10⁹ ćelija/mL) obezbedilo je 7,3 log₁₀CFU/g uzorka, zasejavanje na nivou 8% (v/w) 7,5 log₁₀CFU/g uzorka, dok je

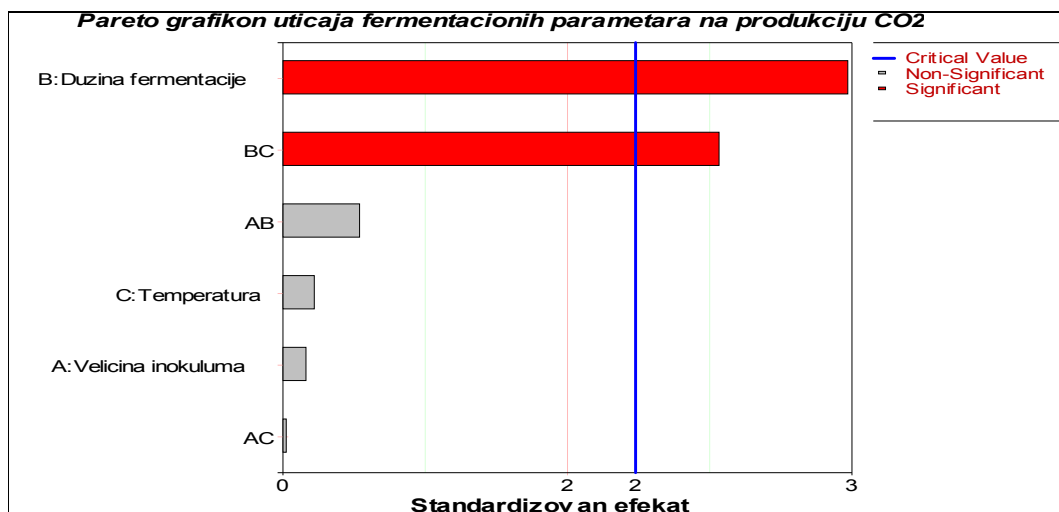
zasejavanje pšeničnog supstrata na nivou 10% (v/w) obezbedilo 7,6 log₁₀CFU/g uzorka, pri čemu su se početne pH vrednosti kretale u proseku oko 6,50.

Dobijeni rezultati prezentovani u **tabeli 15.2.1.** ukazuju da promene nivoa nezavisno promenljivih faktora dovode do promena u odzivima. Po ugledu na obradu podataka iz optimizacije uslova mlečnokiselinske fermentacije (*Odeljak 15.1.*), i ovde su rezultati obrađeni u softverskom programu ReliaSoft DOE++ kako bi se definisale značajnosti uticaja pojedinačnih fermentacionih parametara (faktora) na efikasnost kvasne fermentacije (odzive), a zatim je takođe urađena i optimizacija ispitivanih fermentacionih parametara.

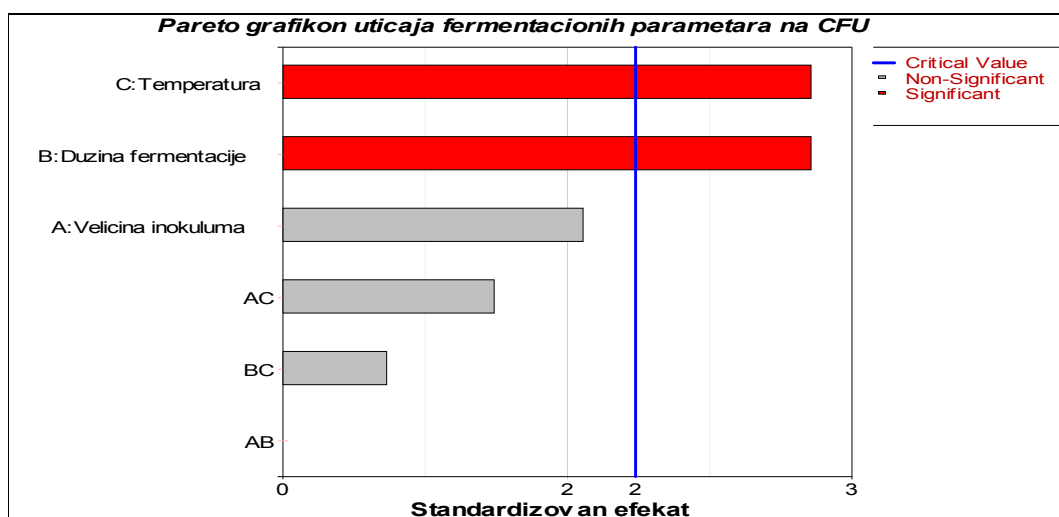
Značajnosti efekata pojedinačnih faktora (A, B, C) kao i njihovih interakcija (AB, AC, BC) za svaki odziv ponaosob date su Pareto grafikonima (**Grafikoni 15.2.1.-15.2.3.**). Dužine bara na grafikonima proporcionalne su standardizovanim efektima, a faktori su poređani po opadajućem apsolutnom efektu. Plava vertikalna linija na grafikonima pokazuje granicu koju prelaze statistički značajni efekti, u odabranom intervalu poverenja od 90% ($\alpha=0.1$).



Grafikon 15.2.1. Pareto grafikon značajnosti uticaja fermentacionih parametara na promene pH vrednosti supstrata pri fermentaciji sa *S. cerevisiae*



Grafikon 15.2.2. Pareto grafikon značajnosti uticaja fermentacionih parametara na promene u produkciji CO₂



Grafikon 15.2.3. Pareto grafikon značajnosti uticaja fermentacionih parametara na promene brojnosti vijabilnih ćelija *S. cerevisiae*

Prezentovani podaci ukazuju na to temperatura i dužina trajanja fermentacije značajno utiču na brojnost vijabilnih ćelija *S. cerevisiae* (**Grafikon 15.2.3**). Očigledno je da se parametri rasta kvasca u pšeničnom supstratu razlikuju od onih u YPD bujonu, i da se njegova eksponencijalna faza rasta, verovatno zbog dovoljne količine hranjivih materija u supstratu, prolongira do 48 odnosno 72 h, iako se u tim vremenskim intervalima održava približno ista količina vijabilnih ćelija (**Tabela 15.2.1**). Takođe, znajući da je optimalna temperatura rasta *S. cerevisiae* u opsegu od

25-35 °C, uticaj temperature na CFU, tj. nešto manja brojnost ćelija na 23 i 37 °C (**Tabela 15.2.1.**) nije iznenađujuć. Međutim, zbog činjenice da veličina inokuluma ne utiče značajno, ne samo na CFU, nego ni na jedan od odziva, pretpostavka je da se već nakon 24h u supstratu dostiže dovoljan broj ćelija kvasca koji omogućuje efikasno odigravanje fermentacije, pa ukupna efikasnost fermentacionog procesa neće zavisiti od početnog broja ćelija inokuliranih u pšenični supstrat. Na promenu pH vrednosti pšeničnog supstrata značajno utiče jedino temperatura (**Grafikon 15.2.1.**), dok na produkciju CO₂ značajan efekat ima dužina fermentacije i temperatura ali samo u interakciji sa dužinom procesa (**Grafikon 15.2.2.**).

Uzimajući u obzir faktore (A, B, C), njihove interakcije (AB, AC, BC) i interakcije drugog reda (AA, BB, CC) koji su pokazali statistički značajne efekte, urađena je regresiona analiza za svaki odziv.

Regresiona analiza za uticaj fermentacionih parametara na promene pH vrednosti supstrata pri fermentaciji sa *S. cerevisiae* data je u **tabeli 15.2.2.**

Tabela 15.2.2. Regresiona analiza značajnosti efekata fermentacionih parametara na promene pH vrednosti supstrata pri fermentaciji sa *S. cerevisiae*

REGRESIONA ANALIZA			
	Regresioni koeficijent	Standardna greška koeficijenta	T vrednost
Konstanta	5,1629	0,0297	173,7576
A:Veličina inokuluma	-0,0225	0,0278	-0,8095
C:Temperatura	-0,1437	0,0278	-5,172
AA	0,0921	0,0407	2,2647

* Veći apsolutni regresioni koeficijent = veći stepen povezanosti faktora i odziva

Veća apsolutna T-vrednost = veća statistička značajnost efekta

Regresionom analizom statistički značajnih parametara, dobijen je sledeći matematički model za promenu pH vrednosti supstrata pri fermentaciji sa *S. cerevisiae*:

$$Y = 5,1629 - 0,0225A - 0,1437C + 0,0921AA$$

odakle se može videti da porast temperature, kao i povećanje veličine inokuluma ali na veoma niskom nivou, dovode do smanjenja pH vrednosti (odziva), dok interakcija drugog reda za povećanje faktora veličine inokuluma negativno utiče na smanjenje pH. Adekvatnost dobijene regresije je određena korišćenjem analize varijanse (ANOVA), a rezultati su prikazani u **tabeli 15.2.3.**

Tabela 15.2.3. ANOVA tabela za uticaj fermentacionih parametara na promene pH vrednosti supstrata pri fermentaciji sa *S. cerevisiae*

	ANOVA tabela*				P [#]
	DF	SS	MS	F	
Model	3	0,2011	0,067	10,8446	0,0013
A:Veličina inokuluma	1	0,004	0,004	0,6553	0,4354
C:Temperatura	1	0,1653	0,1653	26,7495	0,0003
AA	1	0,0317	0,0137	5,129	0,0447
Rezidual	11	0,068	0,0062		
„Lack of fit“	5	0,0336	0,0057	1,1749	0,4181
R² = 0,7473					

* DF – stepeni slobode; SS – suma kvadrata; MS- srednja kvadratna vrednost; F – F vrednost; P – P vrednost

P<0,1 (crvena boja) ukazuje na statistički značajan uticaj faktora na odziv; niža P-vrednost ukazuje na veću statističku značajnost člana

Relativno visoka vrednost R² i neznačajnost nedostatka podešenja (*lack of fit*) ukazuju na prilično dobro slaganje tj. zadovoljavajuć stepen korelacije modela datog jednačinom i eksperimentalnih vrednosti, odnosno na to da model dovoljno verodostojno opisuje ekperimentalne rezultate.

Regresiona analiza za uticaj fermentacionih parametara na promene u produkciji CO₂ data je u **tabeli 15.2.4.**

Tabela 15.2.4. Regresiona analiza značajnosti efekata fermentacionih parametara na promene u produkciji CO₂

REGRESIONA ANALIZA			
	Regresioni koeficijent	Standardna greška koeficijenta	T vrednost
Konstanta	3,0262	0,1112	27,2184
A:Veličina inokuluma	-0,04	0,0818	-0,4888
B:Dužina fermentacije	0,85	0,0818	10,3878
C:Temperatura	0,0525	0,0818	0,6416
BC	-0,93	0,1157	-8,0366
AA	0,5542	0,1201	4,6152
CC	1,0342	0,1201	8,6122

* Veći apsolutni regresioni koeficijent = veći stepen povezanosti faktora i odziva

Veća apsolutna T-vrednost = veća statistička značajnost efekta

Regresionom analizom statistički značajnih parametara, dobijen je sledeći matematički model za promene u produkciji CO₂:

$$Y = 3,0262 - 0,04A + 0,85B + 0,0525C - 0,93BC + 0,5542AA + 1,0342CC$$

odakle se može videti da produžavanje fermentacije i porast temperature, kao i interakcije drugog reda za porast temperaturnog faktora i povećanje faktora veličine

inokuluma, dovode do porasta u produkciji CO₂ (odziva), dok interakcija produžavanje fermentacije – porast temperature i, u maloj meri, povećanje veličina inokuluma negativno utiču na ovu produkciju. Adekvatnost dobijene regresije je određena korišćenjem analize varijanse (ANOVA), a rezultati su prikazanih u **tabeli 15.2.5.**

Tabela 15.2.5. ANOVA tabela za uticaj fermentacionih parametara na promene u produkciji CO₂

ANOVA tabela*					
	DF	SS	MS	F	P [#]
Model	6	14,1088	2,3515	43,8994	1,08*10⁻⁵
A:Veličina inokuluma	1	0,0128	0,0128	0,239	0,6381
B:Dužina fermentacije	1	5,78	5,78	107,9065	6,38*10⁻⁶
C:Temperatura	1	0,022	0,022	0,4117	0,5391
BC	1	3,4596	3,4596	64,5871	4,23*10⁻⁵
AA	1	1,1409	1,1409	21,2998	0,0017
CC	1	3,9729	3,9729	74,1703	2,53*10⁻⁵
Rezidual	8	0,4285	0,0536		
„Lack of fit“	6	0,2865	0,0477	0,6721	0,7013
R² = 0,9705					

* DF – stepeni slobode; SS – suma kvadrata; MS- srednja kvadratna vrednost; F – F vrednost; P – P vrednost

P<0,1 (crvena boja) ukazuje na statistički značajan uticaj faktora na odziv; niža P-vrednost ukazuje na veću statističku značajnost člana

Visoka vrednost R² i neznačajnost nedostatka podešenja (*lack of fit*) pokazatelji su da postoji dobro slaganje tj. visok stepen korelacije modela datog jednačinom i eksperimentalnih vrednosti, odnosno da model verodostojno opisuje ekperimentalne rezultate.

Regresiona analiza za uticaj fermentacionih parametara na promene brojnosti vijabilnih ćelija *S. cerevisiae* po gramu pšeničnog supstrata (log₁₀CFU/g) data je u **tabeli 15.2.6.**, a regresionom analizom statistički značajnih parametara, dobijen je sledeći matematički model za promene u brojnosti vijabilnih ćelija *S. cerevisiae* po gramu pšeničnog supstrata (log₁₀CFU/g):

$$Y = 8,9154 + 0,05A + 0,0875B - 0,0875C + 0,05AC + 0,0481BB - 0,1019CC$$

odakle se može videti da porast temperature, a naročito interakcija drugog reda za porast temperaturnog faktora, dovode do smanjenja brojnosti vijabilnih ćelija *S. cerevisiae* po gramu pšeničnog supstrata (log₁₀CFU/g), dok povećanje veličine inokuluma, produžavanje fermentacije, kao i interakcija povećanje veličine

inokuluma – porast temperature i interakcija drugog reda za produžavanja faktora dužine fermentacije dovode do porasta CFU.

Tabela 15.2.6. Regresiona analiza značajnosti efekata fermentacionih parametara na promene brojnosti vijabilnih ćelija *S. cerevisiae* po gramu pšeničnog supstrata (\log_{10} CFU/g)

REGRESIONA ANALIZA			
	Regresioni koeficijent	Standardna greška koeficijenta	T vrednost
Konstanta	8,9154	0,0207	431,3725
A:Veličina inokuluma	0,05	0,0152	3,2871
B:Dužina fermentacije	0,0875	0,0152	5,7525
C:Temperatura	-0,0875	0,0152	5,7525
AC	0,05	0,0215	2,3243
BB	0,0481	0,0223	2,1537
CC	-0,1019	0,0223	-4,5657

* Veći apsolutni regresioni koeficijent = veći stepen povezanosti faktora i odziva

Veća apsolutna T-vrednost = veća statistička značajnost efekta

Adekvatnost dobijene regresije je određena korišćenjem analize varijanse (ANOVA), a iz rezultata prikazanih u **tabeli 15.2.7.** vidi se da su dobijene visoka vrednost R^2 i neznačajnost nedostatka podešenja (*lack of fit*), pokazatelji da postoji visok stepen korelacije modela datog jednačinom i eksperimentalnih vrednosti, tj. da model verodostojno opisuje ekperimentalne rezultate.

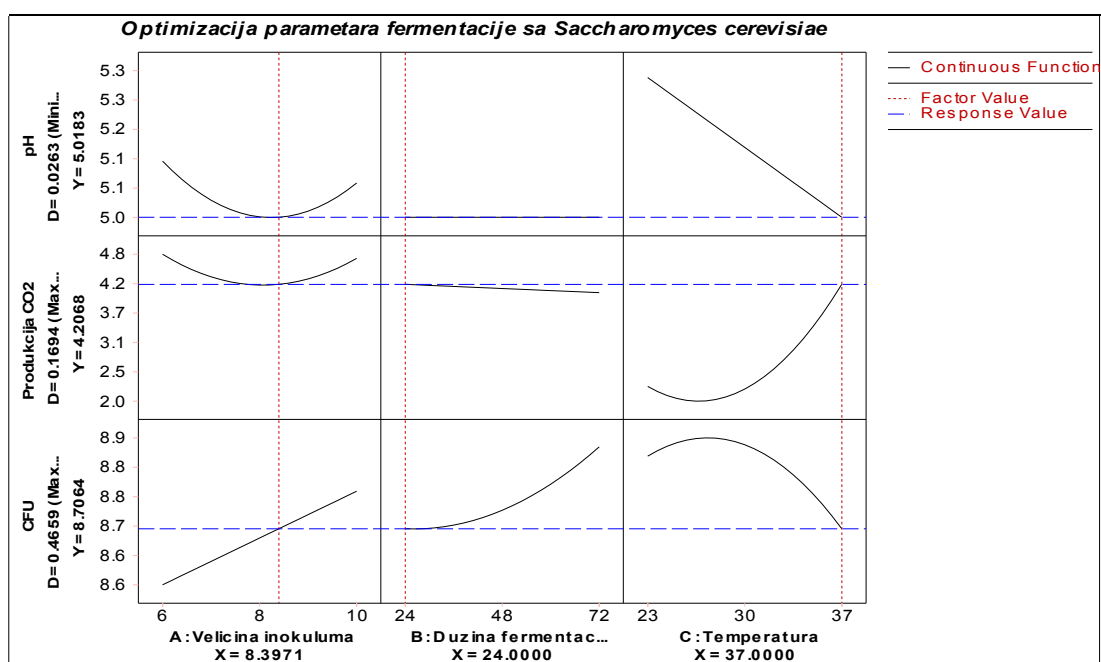
Tabela 15.2.7. ANOVA tabela za uticaj fermentacionih parametara na promene brojnosti vijabilnih ćelija *S. cerevisiae* po gramu pšeničnog supstrata (\log_{10} CFU/g)

ANOVA tabela*					
	DF	SS	MS	F	P [#]
Model	6	0,2025	0,0338	18,2361	0,0003
A:Veličina inokuluma	1	0,02	0,02	10,8052	0,0111
B:Dužina fermentacije	1	0,0612	0,0612	33,0909	0,0004
C:Temperatura	1	0,0613	0,0613	33,0909	0,0004
AB	1	0,01	0,01	5,4026	0,0486
BB	1	0,0086	0,0086	4,6382	0,0434
CC	1	0,0386	0,0386	20,846	0,0018
Rezidual	8	0,0148	0,0019		
„Lack of fit“	6	0,0081	0,0014	0,4071	0,8338
R² = 0,9319					

* DF – stepeni slobode; SS – suma kvadrata; MS- srednja kvadratna vrednost; F – F vrednost; P – P vrednost

P<0,1 (crvena boja) ukazuje na statistički značajan uticaj faktora na odziv; niža P-vrednost ukazuje na veću statističku značajnost člana

Nakon utvrđivanja značajnosti uticaja pojedinačnih fermentacionih parametara na fermentaciju, u softverskom programu ReliaSoft DOE++ urađena je i optimizacija ispitivanih fermentacionih parametara u cilju određivanja njihovih optimalnih nivoa pri kojima se postiže maksimalna efikasnost fermentacije sa *S. cerevisiae*. Dobijeni rezultati prikazani su na **grafikonu 15.2.4.**



Grafikon 15.2.4. Optimizacija parametara fermentacije pšeničnog supstrata sa *Saccharomyces cerevisiae*

Sa prikazanog grafikona može se videti da je maksimalna efikasnost kvasne fermentacije pšeničnog supstrata inokulisanog sa *S. cerevisiae* dostignuta nakon 24 h pri temperaturi od 37 °C i uz inokulaciju na nivou od 8% (v/w). Pri ovim fermentacionim parametrima, bez obzira što brojnosti vijabilnih ćelija *S. cerevisiae* od 8,7 log₁₀CFU/g nije dostigao svoj najveći nivo, pH vrednost supstrata spustila se najniže (na 5,0) uz najveću produkciju CO₂ od 4,2 CO₂/kg, te su stoga ovi uslovi uzeti za optimalne.

16. ISPITIVANJE UTICAJA PIRIMIFOS-METILA, HLORPIRIFOS-METILA I BIFENTRINA NA RAST I AKTIVNOST FERMENTATIVNIH MIKROORGANIZAMA

Na rast i aktivnost fermentativnih mikroorganizama utiču brojni faktori sredine u kojima se oni nalaze. Uzimajući u obzir toksičnost koju ispoljavaju pesticidi pretpostavka je da njihovo prisustvo može da dovede do smanjenja brojnosti i vijabilnosti ispitivanih mikroorganizama, što bi rezultiralo smanjenjem fermentacije pšenice. Kako bi se predvidela efikasnost fermentacije u uzorcima tretiranim pesticidima u datim laboratorijskim uslovima, ispitivan je uticaj korišćenih pesticida (na nivoima $1/2$ MDK, 1xMDK, 2xMDK, 5xMDK, 10xMDK, 15xMDK i 20xMDK pesticida u pšenici) na rast i aktivnost *Lactobacillus plantarum* i *Saccharomyces cerevisiae* u supstratima za rast (MRS i YPD bujon).

16.1. ISPITIVANJE UTICAJA PIRIMIFOS-METILA, HLORPIRIFOS-METILA I BIFENTRINA NA RAST I AKTIVNOST *LACTOBACILLUS PLANTARUM*

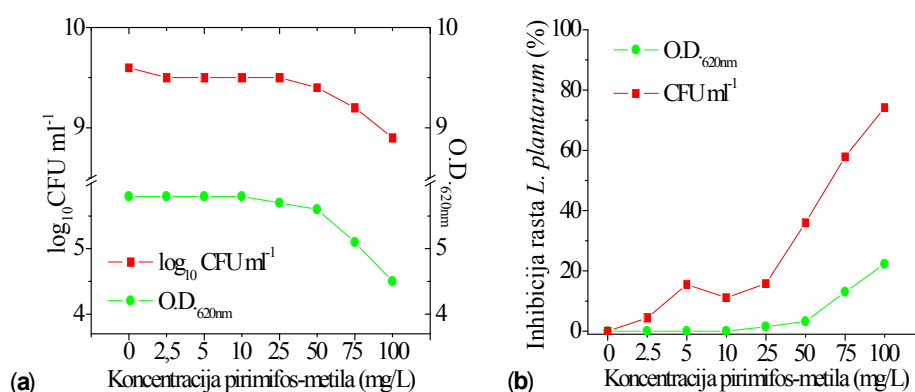
Efekat kontaminacije MRS bujona pirimifos-metilom na rast i aktivnost *L. plantarum* prikazan je u **tabeli 16.1.1.** i na **grafikonu 16.1.1.**

Tabela 16.1.1. Rast i aktivnost *Lactobacillus plantarum* u MRS bujonu obogaćenim sa pirimifos-metilom

Koncentracija pirimifos-metila ($\mu\text{g/mL}$)	O.D. 620nm*	CFU ($\times 10^8$)/mL*	\log_{10} CFU
0	5,83 \pm 0,05 ^a	36,1 \pm 5,9 ^a	9,557
2,5048	5,84 \pm 0,06 ^a [0] [#]	34,5 \pm 1,4 ^a [4,4]	9,537
5,0096	5,83 \pm 0,16 ^a [0]	30,5 \pm 0,7 ^a [15,5]	9,484
10,0192	5,83 \pm 0,11 ^a [0]	32,1 \pm 2,3 ^a [11,1]	9,506
25,0480	5,74 \pm 0,02 ^a [1,5]	30,4 \pm 1,5 ^a [15,8]	9,483
50,0960	5,64 \pm 0,01 ^a [3,2]	23,1 \pm 2,6 ^a [36,0]	9,364
75,1440	5,07 \pm 0,27 ^a [13,0]	15,2 \pm 2,8 ^b [57,9]	9,182
100,1920	4,53 \pm 0,02 ^a [22,3]	9,3 \pm 2,2 ^b [74,2]	8,968

* vrednosti obeležene različitim slovima unutar kolona se statistički značajno razlikuju u odnosu na kontrolu sa 0 $\mu\text{g/mL}$ pirimifos-metila (t-test, $p=0,05$)

vrednosti u uglastim zagradama predstavljaju procentualnu inhibiciju parametara (%)



Grafikon 16.1.1. (a) Rast i aktivnost *Lactobacillus plantarum* u MRS bujonu obogaćenim sa pirimifos-metilom; (b) Procenat inhibicije rasta i aktivnosti *Lactobacillus plantarum* u MRS bujonu obogaćenim sa pirimifos-metilom

Kao što se može videti iz prikazanih rezultata, rast *L. plantarum* u MRS bujonu u prisustvu pirimifos-metila u koncentraciji manjoj od maksimalno dozvoljene koncentracije za pšenicu (2,5 $\mu\text{g/mL}$), sa optičkom gustinom (O.D._{620nm}) koja je na nivou kontrolnog uzorka i nešto manjom brojnošću živih kolonija (CFU), nije bio statistički značajno smanjen u poređenju sa kontrolnim nekontaminiranim uzorkom, što se može videti i preko izračunate procentualne inhibicije CFU od svega 4,4 %. Međutim, već pri koncentraciji pirimifos-metila od 5 $\mu\text{g/mL}$ (MDK za pšenicu), broj izraslih kolonija počinje da se smanjuje, premda još uvek ne dolazi do smanjenja optičke gustine, što ukazuje na početak odumiranja ćelija *L. plantarum* u supstratu. Ovaj trend se, kao što rezultati pokazuju, dalje nastavlja na približno istom nivou u prisustvu pirimifos-metila u koncentraciji od 10 i 25 $\mu\text{g/mL}$. Iako statistički gledano dobijene razlike u broju izraslih kolonija između kontrolne grupe i uzoraka obogaćenih pesticidom i dalje nisu značajne (za nivo značajnosti od 0,05), procenat inhibicije CFU pri ovim koncentracijama pesticida već dostiže ne tako zanemarljiv nivo od 10-15 %. Do naglog smanjenja brojnosti izraslih kolonija (procentualna inhibicija CFU od 36 %) praćenog blagim smanjenjem optičke gustine, dolazi prilikom uzgajanja *L. plantarum* u podlozi obogaćenju sa pirimifos-metilom u koncentraciji od 50 $\mu\text{g/mL}$ (10xMDK). Procenat inhibicije broja izraslih kolonija dalje se povećava preko 57,9 % u podlozi sa 75 $\mu\text{g/mL}$ pirimifos-metila, do maksimalnih 74,2 % (koncentracija pirimifos-metila 100 $\mu\text{g/mL}$). Statistički gledano,

do značajnog smanjenja u broju izraslih kolonija dolazi tek nakon inkubacije *L. plantarum* u supstratima sa 75 i 100 $\mu\text{g/mL}$ pirimifos-metila, dok se optička gustina statistički bitno ne menja.

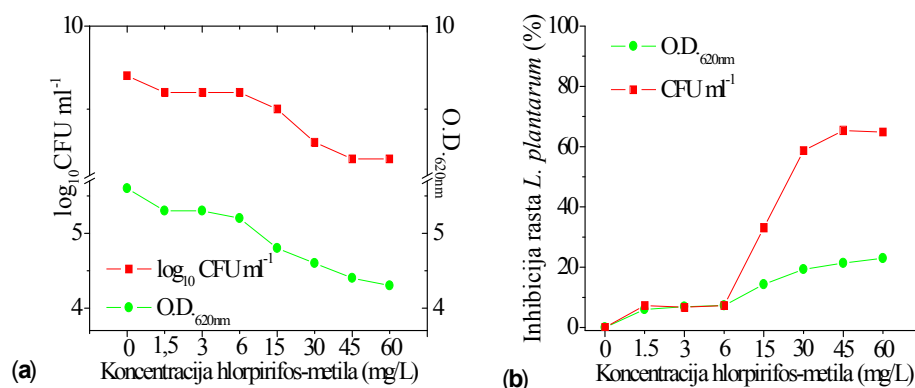
Efekat kontaminacije MRS bujona hlorpirifos-metilom na rast i aktivnost *Lactobacillus plantarum* prikazan je u **tabeli 16.1.2.** i na **grafikonu 16.1.2.**

Tabela 16.1.2. Rast i aktivnost *Lactobacillus plantarum* u MRS bujonu obogaćenim sa hlorpirifos-metilom

Koncentracija hlorpirifos-metila ($\mu\text{g/mL}$)	O.D. 620nm*	CFU ($\times 10^8$)/mL*	\log_{10} CFU
0	$5,65 \pm 0,04^a$	$47,7 \pm 1,2^a$	9,678
1,5135	$5,31 \pm 0,12^b [6,0]^\#$	$44,2 \pm 1,8^a [7,3]$	9,645
3,0270	$5,26 \pm 0,01^b [6,9]$	$44,5 \pm 0,7^b [6,7]$	9,648
6,0394	$5,24 \pm 0,04^b [7,3]$	$42,2 \pm 1,6^b [7,3]$	9,625
15,1348	$4,84 \pm 0,04^b [14,3]$	$31,9 \pm 5,1^b [33,1]$	9,504
30,2697	$4,56 \pm 0,08^b [19,3]$	$19,7 \pm 0,2^b [58,7]$	9,294
45,4045	$4,44 \pm 0,11^b [21,4]$	$16,5 \pm 1,1^b [65,4]$	9,217
60,5394	$4,35 \pm 0,12^b [23,0]$	$16,8 \pm 0,8^b [64,8]$	9,225

* vrednosti obeležene različitim slovima unutar kolona se statistički značajno razlikuju u odnosu na kontrolu sa 0 $\mu\text{g/mL}$ hlorpirifos-metila (t-test, $p=0,05$)

[#] vrednosti u uglastim zagradama predstavljaju procentualnu inhibiciju parametara



Grafikon 16.1.2. (a) Rast i aktivnost *Lactobacillus plantarum* u MRS bujonu obogaćenim sa hlorpirifos-metilom; (b) Procenat inhibicije rasta i aktivnosti *Lactobacillus plantarum* u MRS bujonu obogaćenim sa hlorpirifos-metilom

Iz prikazanih rezultata može se videti da, u slučaju kontaminacije hlorpirifos-metilom, inhibicija rasta *L. plantarum* u MRS bujonu započinje već u prisustvu ovog pesticida u koncentraciji manjoj od maksimalno dozvoljene koncentracije za pšenicu i ovaj trend umerene inhibicije se dalje nastavlja na

približno istom nivou u prisustvu hlorspirifos-metila u koncentraciji od 3 i 6 $\mu\text{g/mL}$ (inhibicija CFU i O.D._{620nm} $\sim 7\%$). Statistički gledano, optička gustina se značajno smanjila već nakon inkubacije *L. plantarum* u supstratu sa 1,5 $\mu\text{g/mL}$ hlorspirifos-metila, a do statistički značajnog smanjenja u broju izraslih kolonija dolazi već nakon inkubacije *L. plantarum* u supstratu sa 3 $\mu\text{g/mL}$ hlorspirifos-metila (MDK za pšenicu), bez obzira na to što se u tim opsezima koncentracije pesticida procentualna inhibicija oba parametra zadržava ispod 10 %. Do naglog izraženijeg smanjenja brojnosti izraslih kolonija (inhibicija CFU od 33,1 %), praćenog daljim smanjenjem optičke gustine, dolazi prilikom uzgajanja *L. plantarum* u podlozi obogaćenoj sa 15 $\mu\text{g/mL}$ hlorspirifos-metila. Procenat inhibicije broja izraslih kolonija dalje se povećava do maksimalnih 65,4 % pri koncentraciji pesticida od 45 $\mu\text{g/mL}$, i ostaje na istom nivou i pri maksimalnoj koncentraciji pesticida (60 $\mu\text{g/mL}$).

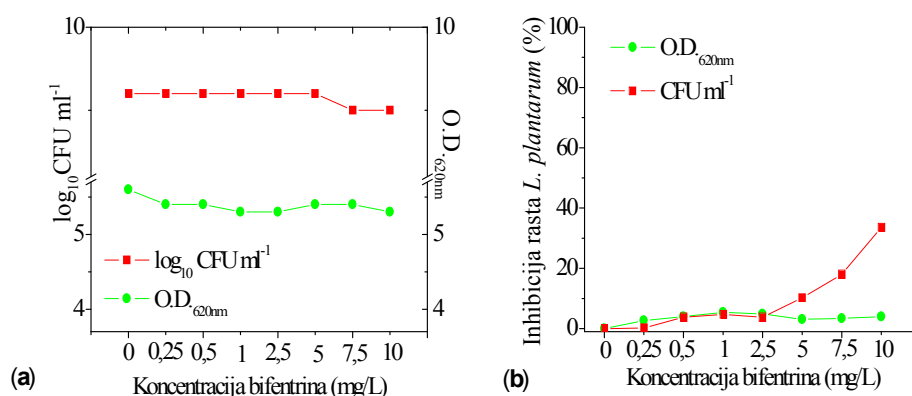
Efekat kontaminacije MRS bujona bifentrinom na rast i aktivnost *Lactobacillus plantarum* prikazan je u **tabeli 16.1.3.** i na **grafikonu 16.1.3.**

Tabela 16.1.3. Rast i aktivnost *Lactobacillus plantarum* u MRS bujonu obogaćenim sa bifentrinom

Koncentracija bifentrina ($\mu\text{g/mL}$)	O.D. 620nm*	CFU ($\times 10^8$)/mL*	log ₁₀ CFU
0	5,56 \pm 0,29 ^a	42,3 \pm 2,8 ^a	9,626
0,2534	5,41 \pm 0,05 ^a [2,7] [#]	42,2 \pm 2,1 ^a [0,2]	9,625
0,5068	5,37 \pm 0,12 ^a [4,0]	40,7 \pm 1,1 ^a [3,8]	9,610
1,0135	5,26 \pm 0,11 ^a [5,4]	40,3 \pm 5,2 ^a [4,7]	9,605
2,5338	5,30 \pm 0,07 ^a [4,9]	40,7 \pm 3,2 ^a [3,8]	9,610
5,0676	5,39 \pm 0,24 ^a [3,1]	40,0 \pm 4,1 ^a [10,2]	9,580
7,6014	5,37 \pm 0,04 ^a [3,4]	34,7 \pm 1,4 ^a [18,0]	9,540
10,1352	5,34 \pm 0,30 ^a [4,0]	28,1 \pm 1,3 ^b [33,6]	9,449

* vrednosti obeležene različitim slovima unutar kolona se statistički značajno razlikuju u odnosu na kontrolu sa 0 $\mu\text{g/mL}$ bifentrina (t-test, p=0,05)

[#] vrednosti u uglastim zagradama predstavljaju procentualnu inhibiciju parametara



Grafikon 16.1.3. (a) Rast i aktivnost *Lactobacillus plantarum* u MRS bujonu obogaćenim sa bifentrinom; (b) Procenat inhibicije rasta i aktivnosti *Lactobacillus plantarum* u MRS bujonu obogaćenim sa bifentrinom

Iz prikazanih rezultata može se videti da, u slučaju kontaminacije bifentrinom, inhibicija rasta *L. plantarum* u MRS bujonu u prisustvu ovog pesticida u koncentraciji manjoj od maksimalno dozvoljene koncentracije za pšenicu (0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) praktično ne postoji (inhibicija CFU 0,2 %), dok izrazito slaba inhibicija (inhibicija CFU i O.D._{620nm} ~4 %) započinje u prisustvu bifentrina u koncentraciji 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (MDK za pšenicu) i zadržava se na približno istom nivou u prisustvu ove aktivne materije u koncentraciji od 1 i 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pri čemu statistička značajnost u smanjenju brojnosti izraslih kolonija i optičke gustine nije zabeležena. Do nešto većeg, ali opet umerenog i statistički neznačajnog smanjenja brojnosti izraslih kolonija (10,2 %) dolazi prilikom uzgajanja *L. plantarum* u podlozi obogaćenoj sa bifentrinom u koncentraciji od 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Inhibicija rasta se dalje povećava sa povećanjem koncentracije pesticida u podlozi, ali statistička značajnost inhibicije rasta beleži se tek pri maksimalnoj koncentraciji pesticida (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (inhibicija broja izraslih kolonija od 33,6 %), pri čemu do smanjenja optičke gustine praktično i ne dolazi.

Uopšteno posmatrano, može se zaključiti da, od ispitivanih pesticida, prisustvo organofosfata pirimifos-metila i hlorpirifos-metila ima negativan efekat na rast i aktivnost *L. plantarum* u hranjivoj podlozi za rast, dok piretroid bifentrin ispoljava ovo dejstvo u mnogo manjoj meri i to samo u slučaju kontaminacije 20

puta veće od maksimalno dozvoljene koncentracije za pšenicu. Od sva tri pesticida pirimifos-metil u najvećoj meri inhibira rast ovog laktobacila (do 74,2 % inhibicije CFU), premda se statistički značajna inhibicija javlja samo pri kontaminaciji sa najvišim korišćenim koncentracijama aktivne materije (75 i 100 µg/mL odnosno 15 i 20xMDK za pšenicu). Hlorpirifos-metil, sa druge strane, pak, u manjoj meri inhibira rast kolonija *L. plantarum* (do maksimum 65,4 % u prisustvu najviše korišćenih koncentracija aktivne materije – 45 i 60 µg/mL odnosno 15 i 20xMDK za pšenicu), ali statistički posmatrano, njegov značajan negativan impakt na mikroorganizam započinje pri mnogo manjim koncentracijama tj. već pri koncentraciji od 3 µg/mL (MDK za pšenicu). Negativan efekat bifentrina na rast i aktivnost *L. plantarum* je veoma mali, praktično nepostojeći, sa nešto većim i statistički značajnim procentom inhibicije samo u prisustvu koncentracije aktivne materije 20 puta veće od MDK za pšenicu (inhibicija CFU od 33,6 %).

Dobijeni rezultati u saglasnosti su sa ranije utvrđenim pravilnostima, s obzirom da je ustanovljeno da prisustvo različitih pesticida negativno utiče na rast različitih vrsta bakterija mlečne kiseline (*Lactobacillus acidophilus*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* i *L. casei subsp. casei*), pri čemu insekticidi hlorpirifos-metil i metomil znatno više inhibiraju njihov rast u poređenju sa herbicidima (glifosat i tiobenkarb) ili fungicidima (mankozeb i metalaksil) [182]. Tako prisustvo hlorpirifos-metila već pri koncentraciji od 10 µg/mL redukuje broj izraslih kolonija za preko 50 % [182], a komercijalni preparat glifosata već pri koncentraciji znatno manjoj od koncentracije primene ispoljava mikrobicidni efekat na BMK [183]. Takođe, pokazano je da, kao ni druge BMK, ni *Lactobacillus plantarum* nije rezistentan na kontaminaciju pesticidima, s obzirom da je prisustvo DDT-a ili lindana imalo negativan uticaj na porast broja ćelija *L. plantarum* u toku prvih 24 časa inkubacije u supstratima za rast, pri čemu, iako je nakon početnog perioda adaptacije broj mikroorganizama dostizao nivo broja laktobacila u supstratu bez pesticida, kriva rasta do kraja ne postiže normalnu logaritamsku fazu i ukupan broj vijabilnih ćelija ostaje na nižem nivou [114]. Takođe, na sličan način i prisustvo hlorpirifosa u supstratu prilikom pripreme kimhija (tradicionalnog koreanskog jela od fermentisanog povrća) utiče na smanjenje ukupnog broja bakterija mlečno kiselinskog vrenja među kojima je prisutan i *L. plantarum* [117].

16.2. ISPITIVANJE UTICAJA PIRIMIFOS-METILA, HLORPIRIFOS-METILA I BIFENTRINA NA RAST I AKTIVNOST *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

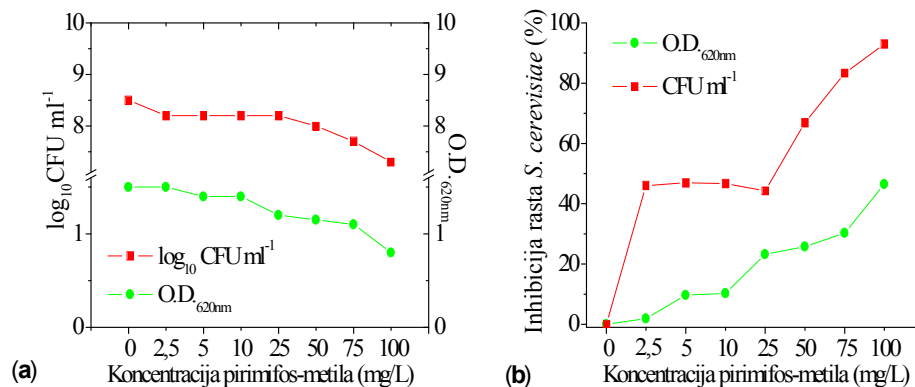
Efekat kontaminacije YPD bujona pirimifos-metilom na rast i aktivnost *Saccharomyces cerevisiae* prikazan je u **tabeli 16.2.1.** i na **grafikonu 16.2.1.**

Tabela 16.2.1. Rast i aktivnost *Saccharomyces cerevisiae* u YPD bujonu obogaćenim sa pirimifos-metilom

Koncentracija pirimifos-metila ($\mu\text{g/mL}$)	O.D. 620nm*	CFU ($\times 10^7$)/mL*	\log_{10} CFU
0	$1,55 \pm 0,06^a$	$28,7 \pm 2,4^a$	8,458
2,5668	$1,55 \pm 0,05^a$ [1,9] #	$15,5 \pm 1,3^b$ [46,0]	8,190
5,1336	$1,40 \pm 0,01^a$ [9,7]	$15,2 \pm 2,7^b$ [47,0]	8,182
10,2672	$1,39 \pm 0,01^b$ [10,3]	$15,3 \pm 0,6^b$ [46,7]	8,185
25,6680	$1,19 \pm 0,04^b$ [23,2]	$16,0 \pm 2,3^b$ [44,3]	8,204
51,3360	$1,15 \pm 0,01^b$ [25,8]	$9,5 \pm 4,9^b$ [66,9]	7,978
77,0040	$1,08 \pm 0,03^b$ [30,3]	$4,8 \pm 1,9^b$ [83,3]	7,681
102,6720	$0,83 \pm 0,19^b$ [46,5]	$2,0 \pm 0,7^b$ [93,0]	7,301

* vrednosti obeležene različitim slovima unutar kolona se statistički značajno razlikuju u odnosu na kontrolu sa 0 $\mu\text{g/mL}$ pirimifos-metila (t-test, $p=0,05$)

vrednosti u uglastim zagradama predstavljaju procentualnu inhibiciju parametara



Grafikon 16.2.1. (a) Rast i aktivnost *Saccharomyces cerevisiae* u YPD bujonu obogaćenim sa pirimifos-metilom; (b) Procenat inhibicije rasta i aktivnosti *Saccharomyces cerevisiae* u YPD bujonu obogaćenim sa pirimifos-metilom

Rezultati ukazuju da do početka odumiranja ćelija *S. cerevisiae* u YPD bujonu dolazi na statistički značajnom nivou već u prisustvu pirimifos-metila u

koncentraciji manjoj od MDK za pšenicu, s obzirom da, iako još uvek ne dolazi do smanjenja O.D._{620nm}, brojnost kolonija naglo opada. Procenat inhibicije CFU dostiže 46 %, i zadržava se na tom nivou u prisustvu pesticida na nivou od 5, 10 i 25 µg/mL, dok statistički značajno smanjenje O.D._{620nm} započinje u prisustvu 10 µg/mL pirimifos-metila. Nakon stagnacije na nivou inhibicije od ~46 % pri uzgoju u podlogama sa ½MDK, MDK, 2x i 5xMDK pirimifos-metila, do dodatnog smanjenja CFU (procentualna inhibicija od 66,9 %) praćenog primetnijim smanjenjem O.D._{620nm} (>25 %), dolazi u podlozi obogaćenoj sa 50 µg/mL pesticida. Procenat inhibicije broja izraslih kolonija dalje se povećava do 83,3 % u podlozi sa 75 µg/mL, do maksimalnih 93 % (sa 100 µg/mL pirimifos-metila). Očigledno je, da prisustvo pirimifos-metila u koncentraciji 20xMDK, ima izrazito negativan efekat na kvasac, dok prisustvo ove aktivne materije, već u koncentraciji dva puta nižoj od propisane, može da smanji brojnost populacije za skoro 50 %, što ukazuje na to da nakon tretiranja pšenice pomenutim pesticidom može da dođe do značajnog smanjenja efikasnosti kvasne fermentacije.

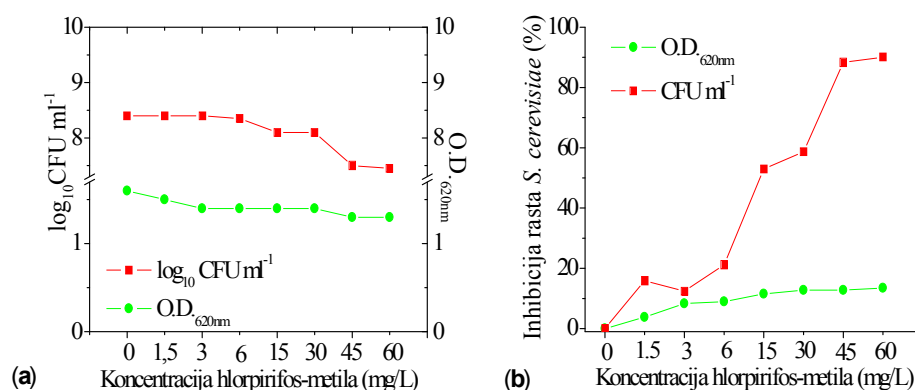
Efekat kontaminacije YPD bujona hlorpirifos-metilom na rast i aktivnost *Saccharomyces cerevisiae* prikazan je u **tabeli 16.2.2.** i na **grafikonu 16.2.2.**

Tabela 16.2.2. Rast i aktivnost *Saccharomyces cerevisiae* u YPD bujonu obogaćenim sa hlorpirifos-metilom

Koncentracija hlorpirifos-metila (µg/mL)	O.D. 620nm*	CFU (x10 ⁷)/mL*	log ₁₀ CFU
0	1,56±0,21 ^a	28,3±0,3 ^a	8,452
1,5509	1,50±0,02 ^a [3,8] [#]	23,8±3,2 ^a [15,9]	8,376
3,1019	1,43±0,01 ^a [8,3]	24,8±1,8 ^a [12,4]	8,394
6,2038	1,42±0,02 ^a [9,0]	22,3±2,5 ^a [21,2]	8,348
15,5095	1,38±0,03 ^a [11,5]	13,3±2,5 ^b [53,0]	8,124
31,0189	1,36±0,03 ^a [12,8]	11,7±1,1 ^b [58,7]	8,068
46,5284	1,36±0,01 ^a [12,8]	3,3±3,2 ^b [88,3]	7,518
62,0379	1,35±0,05 ^a [13,5]	2,8±0,8 ^b [90,1]	7,447

* vrednosti obeležene različitim slovima unutar kolona se statistički značajno razlikuju u odnosu na kontrolu sa 0 µg/mL hlorpirifos-metila (t-test, p=0,05)

[#] vrednosti u uglastim zagradama predstavljaju procentualnu inhibiciju parametara



Grafikon 16.2.2. (a) Rast i aktivnost *Saccharomyces cerevisiae* u YPD bujonu obogaćenim sa hlorspirifos-metilom; (b) Procenat inhibicije rasta i aktivnosti *Saccharomyces cerevisiae* u YPD bujonu obogaćenim sa hlorspirifos-metilom

Iz prikazanih rezultata može se videti da, u slučaju kontaminacije hlorspirifos-metilom, umereno ali statistički neznačajno smanjenje brojnosti i optičke gustine *S. cerevisiae* u YPD bujonu započinje već u prisustvu ove aktivne materije u koncentraciji 1,5 $\mu\text{g/mL}$ ($\frac{1}{2}$ MDK za pšenicu) i zadržava se na približno istom nivou u prisustvu ove aktivne materije u koncentraciji od 3 i 6 $\mu\text{g/mL}$, pri čemu procenat inhibicije CFU dostiže ~20 %, a procenat inhibicije O.D._{620nm} ~9 %. Do naglog izraženijeg smanjenja brojnosti izraslih kolonija (procentualna inhibicija CFU od 53 %), praćenog daljim (premda i dalje statistički neznačajnim) smanjenjem optičke gustine, dolazi prilikom uzgajanja *S. cerevisiae* u podlozi obogaćenoj sa hlorspirifos-metilom u koncentraciji od 15 $\mu\text{g/mL}$ (5xMDK za pšenicu). Procenat inhibicije broja izraslih kolonija dalje se povećava do 88,3 % pri koncentraciji hlorspirifos-metila od 45 $\mu\text{g/mL}$, i ostaje na približnom nivou (90,1 %) i pri maksimalnoj koncentraciji pesticida (60 $\mu\text{g/mL}$), pri čemu smanjenje optičke gustine i dalje ostaje na statistički neznačajnom nivou (13,5 %). Može se zaključiti i da prisustvo hlorspirifos-metila u koncentraciji dvadeset puta većoj od propisane, ima izrazito negativan efekat na *S. cerevisiae*, dok do smanjenja brojnosti populacije kvasca za skoro 50 % dolazi u prisustvu ove aktivne materije u koncentraciji pet puta većoj od propisane, što ukazuje na to da je u slučaju pojačane kontaminacije pomenutim pesticidom realno za očekivati da će doći do značajnog smanjenja efikasnosti kvasne fermentacije.

Efekat kontaminacije YPD bujona bifentrinom na rast i aktivnost *Saccharomyces cerevisiae* prikazan je u tabeli 16.2.3. i na grafikonu 16.2.3..

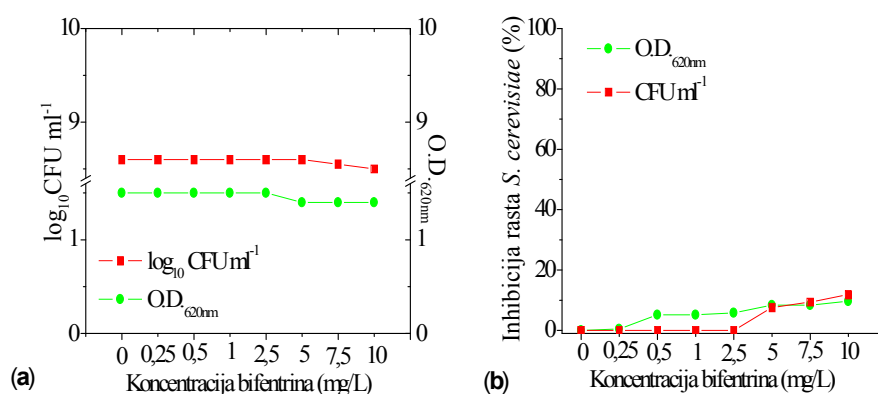
Tabela 16.2.3. Rast i aktivnost *Saccharomyces cerevisiae* u YPD bujonu obogaćenim sa bifentrinom

Koncentracija bifentrina ($\mu\text{g/mL}$)	O.D. 620nm*	CFU ($\times 10^7$)/mL*	\log_{10} CFU
0	1,55 \pm 0,02 ^a	39,5 \pm 4,8 ^a	8,597
0,2640	1,54 \pm 0,04 ^a [0,6]	44,5 \pm 8,0 ^a [0]	8,648
0,5280	1,47 \pm 0,06 ^a [5,2]	44,3 \pm 5,0 ^a [0]	8,646
1,0561	1,47 \pm 0,00 ^b [5,2]	44,7 \pm 3,0 ^a [0]	8,650
2,6402	1,46 \pm 0,02 ^b [5,8]	41,8 \pm 6,4 ^a [0]	8,621
5,2804	1,42 \pm 0,01 ^b [8,4]	36,5 \pm 1,2 ^a [7,6]	8,562
7,9207	1,42 \pm 0,01 ^b [8,4]	35,8 \pm 1,2 ^a [9,4]	8,554
10,5609	1,40 \pm 0,00 ^b [9,7]	34,8 \pm 4,4 ^a [11,9]	8,542

* vrednosti obeležene različitim slovima unutar kolona se statistički značajno razlikuju u odnosu na kontrolu sa 0 $\mu\text{g/mL}$ bifentrina (t-test, $p=0,05$)

vrednosti u uglastim zagradama predstavljaju procentualnu inhibiciju parametara

Iz prikazanih rezultata može se videti da, u slučaju kontaminacije bifentrinom, inhibicija rasta *S. cerevisiae* u YPD bujonu u prisustvu ovog pesticida u koncentracijama $\frac{1}{2}$ MDK, 1xMDK, 2xMDK i 5xMDK praktično ne postoji, pri čemu čak dolazi do slabije stimulacije rasta u ovim uslovima tj. manjeg povećanja brojnosti izraslih kolonija. Slaba inhibicija (inhibicija CFU i O.D._{620nm} ~8 %) započinje tek u prisustvu bifentrina u koncentraciji 5 $\mu\text{g/mL}$ (10xMDK za pšenicu) i zadržava se na približno istom nivou i pri maksimalnim koncentracijama pesticida od 7,5 i 10 $\mu\text{g/mL}$ (inhibicija broja izraslih kolonija do svega 11,9 %), pri čemu statistička značajnost u smanjenju brojnosti izraslih kolonija nije zabeležena.



Grafikon 16.2.3. (a) Rast i aktivnost *Saccharomyces cerevisiae* u YPD bujonu obogaćenim sa bifentrinom; (b) Procenat inhibicije rasta i aktivnosti *Saccharomyces cerevisiae* u YPD bujonu obogaćenim sa bifentrinom

Dakle, negativan efekat bifentrina na rast i aktivnost *S. cerevisiae* je praktično nepostojeći, sa veoma malim procentom inhibicije samo u prisustvu koncentracije aktivne materije 15 i 20 puta veće od MDK za pšenicu (inhibicija broja izraslih kolonija od 9,4 tj. 11,9 %).

Uopšteno posmatrano, uočava se da, od ispitivanih pesticida, prisustvo organofosfata pirimifos-metila i hlorspirifos-metila ima izrazito negativan efekat na rast i aktivnost *Saccharomyces cerevisiae* u hranjivoj podlozi za rast, dok piretroid bifentrin ispoljava ovo dejstvo u značajno manjoj meri i to samo u slučaju većih kontaminacija. Od sva tri pesticida pirimifos-metil ima najveći negativan impakt na kvasac, s obzirom da do veoma velike inhibicije rasta *S. cerevisiae* dolazi već pri koncentraciji od 2,5 µg/mL ($\frac{1}{2}$ MDK za pšenicu) (do 46 % inhibicije CFU), a pri kontaminaciji sa najvišim korišćenim koncentracijama aktivne materije (75 i 100 µg/mL odnosno 15 i 20xMDK za pšenicu) dolazi do drastičnog smanjenja brojnosti. Hlorpirifos-metil, sa druge strane takođe ima izrazito negativan efekat na kvasac u prisustvu najviše korišćenih koncentracija aktivne materije – 45 i 60 µg/mL (15 i 20xMDK za pšenicu), ali njegov značajan negativan impakt na mikroorganizam na nivou inhibicije CFU od ~50 % započinje tek pri koncentraciji od 15 µg/mL (5xMDK za pšenicu). Negativan efekat bifentrina na rast i aktivnost *S. cerevisiae* je veoma mali, praktično nepostojeći, sa blago povišenim ali statistički neznačajnim procentom inhibicije samo u prisustvu koncentracije aktivne materije 10, 15 i 20 puta veće od MDK za pšenicu (inhibicija broja izraslih kolonija do maksimalnih 11,9 %).

Dobijeni rezultati u saglasnosti su sa brojnim ranije publikovanim radovima i još jedna su potvrda da na rast kvasaca u toku fermentacije, pored brojnih drugih faktora, utiče i prisustvo ostataka pesticida u supstratu [184]. Inhibicija rasta kvasca u supstratu sa fungicidima (pirimetanil, hlortalonil, maneb, kaptan, pirazofos heksakonazol, propikonazol) je očekivana s obzirom na prirodu ovog mikroorganizma, a potvrđena je ranije od strane više autora [185-188]. Međutim, nisu retki ni oni koji su utvrdili i suprotno, tj. da fungicidi kao što su pirimetanil, kvinoksifen, penkonazol i mankozeb nemaju negativan uticaj na rast *S. cerevisiae* [189-191], odnosno da, iako negativno utiču na početak i trajanje eksponencijalne faze rasta ovog mikroorganizma, nemaju negativan efekat na krajnji ukupan broj vijabilnih ćelija [188]. Osim fungicida, dokazano je da i herbicidi, kao što su

fenoksaprop-P-etil, tribenuron-metil i glifosat, drastično inhibiraju rast kvasca, pri čemu je ova inhibicija prouzrokovana sposobnošću pomenutih herbicida da utiču na enzimsku aktivnost katalaze i superoksid dismutaze, kao i da indukuju modifikaciju proteina [192, 193]. Takođe i prisustvo insekticida utiče na rast i aktivnost kvasca. Tako je utvrđeno da, iako malation, hlörpirifos i deltametrin nisu ispoljili negativan uticaj na rast kvasca, prisustvo organohlornog kontaktnog insekticida endosulfana u brašnu može da utiče na inhibiciju rasta ovog mikroorganizma i to do 31 % u procesu proizvodnje hleba [68].

Kada se porede rezultati efekata pesticida korišćenih u istraživanjima na ispitivane mikroorganizme, može se uočiti da su i *L. plantarum* i *S. cerevisiae* slabo osetljivi na prisustvo bifentrina u podlogama za rast, dok organofosfati u daleko većoj meri utiču na ove fermentativne mikroorganizme, ali značajnije na kvasac. Pirimifos-metil za obe vrste mikroorganizama ima najveći negativan impakt na rast i aktivnost, ali ovaj uticaj kod kvasca dolazi do izražaja već u prisustvu minimalnih koncentracija aktivne materije i dostiže veoma visok nivo, dok je laktobacil nešto otporniji. Veća otpornost laktobacila u poređenju sa kvascem je zabeležena takođe i u prisustvu hlörpirifos-metila, koji, iako ima značajan negativan uticaj na rast *L. plantarum* i to i pri najmanjim primenjivanim koncentracijama pesticida, ipak nema mikrobicidno dejstvo pri maksimalnim koncentracijama, što je pak slučaj kod *S. cerevisiae*.

Uzimajući u obzir sve dobijene rezultate ispitivanja uticaja pesticida na rast i aktivnost fermentativnih mikroorganizama, za dalja ispitivanja uticaja pesticida na efikasnost procesa mikrobioloških fermentacija žitnog supstrata kao i ispitivanja uticaja fermentacije na degradaciju pesticida izabrane su tri koncentracije kontaminacije za svaku aktivnu materiju. Za prvu koncentraciju kontaminacije izabrana je koncentracija jednaka MDK vrednostima ispitivanih pesticida u pšenici (5 mg/kg za pirimifos-metil, 3 mg/kg za hlörpirifos-metil i 0,5 mg/kg za bifentrin). Za drugu koncentraciju izabrana je koncentracija 5 puta veća od MDK vrednosti (25 mg/kg za pirimifos-metil, 15 mg/kg za hlörpirifos-metil i 2,5 mg/kg za bifentrin), imajući u vidu da je pri ovoj koncentraciji uglavnom već dolazilo do značajnijih inhibicija rasta mikroorganizama. Za treću koncentraciju izabrana je koncentracija 15

puta veća od MDK vrednosti (75 mg/kg za pirimifos-metil, 45 mg/kg za hlorspirifos-metil i 7,5 mg/kg za bifentrin), kao jedna od maksimalno korišćenih koncentracija pri kojima je i inhibicija rasta dostizala uglavnom maksimalni nivo.

17. ISPITIVANJE UTICAJA PIRIMIFOS-METILA, HLORPIRIFOS-METILA I BIFENTRINA NA EFIKASNOST PROCESA MIKROBIOLOŠKIH FERMENTACIJA ŽITNOG SUPSTRATA

Iako je u toku optimizacije fermentacije utvrđeno da se efikasna mlečnokiselinska i kvasna fermentacija pšeničnog supstrata uspešno odigrava i u prisustvu nešto manjeg broja ćelija mikroorganizama (*Odeljak 15.1 i 15.2.*), imajući u vidu da je prisustvo pesticida, naročito organofosfata, imalo veliki negativan impakt na rast i aktivnost laktobacila i kvasca u supstratima za rast (*Odeljak 16.1. i 16.2.*), u daljem toku eksperimenta testiran je uticaj prisustva ovih agrohemičalija u pšenici (pri koncentracijama MDK, 5xMDK i 15xMDK) na efikasnost fermentacija žitnog supstrata.

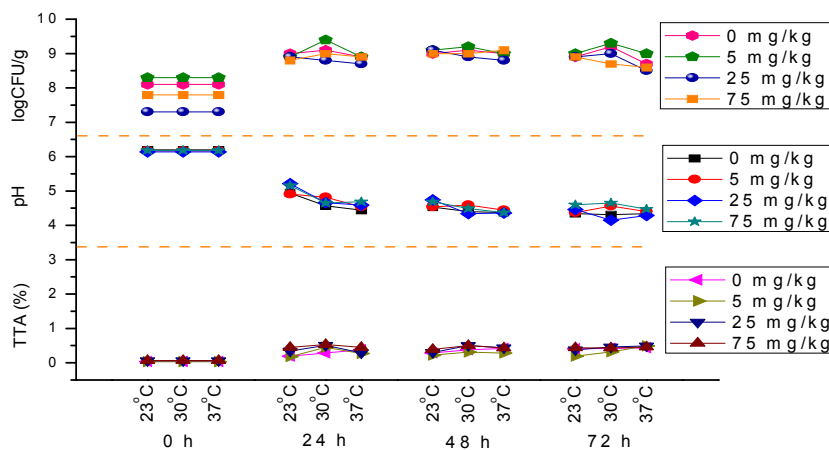
S obzirom da su ispitivanja parametara fermentacija pokazala da variranje veličine inokuluma u opsegu 6-10 % nema značajan uticaj na efikasnost ni mlečnokiselinske ni kvasne fermentacije (**Grafikoni 15.1.1-15.1.3 i 15.2.1-15.2.3.**), a da je maksimalna efikasnost mlečnokiselinske fermentacije pšeničnog supstrata dostignuta uz inokulaciju na nivou od 6% (v/w) (**Grafikon 15.1.4.**) dok je maksimalna efikasnost kvasne fermentacije dostignuta uz inokulaciju na nivou od 8% (v/w) (**Grafikon 15.2.4.**), u ovoj fazi eksperimenta pšenični supstrat zasejavan je samo na nivou 8 % (v/w) inokuluma. Ostali parametri fermentacije varirani su u istim opsezima (dužina fermentacije 24-72 h i temperatura 23-37 °C).

17.1. ISPITIVANJE UTICAJA PESTICIDA NA EFIKASNOST PROCESA MLEČNOKISELINSKE FERMENTACIJE ŽITNOG SUPSTRATA

Rezultati ispitivanja uticaja pirimifos-metila na efikasnost mlečnokiselinske fermentacije prikazani su u **tabeli 17.1.1.** i na **grafikonu 17.1.1.**

Tabela 17.1.1. Uticaj pirimifos-metila na efikasnost fermentacije sa *L. plantarum*

Pirimifos-metil (mg/kg)	Temperatura (°C)	Dužina inokulacije											
		0h			24h			48h			72h		
		pH	TTA (%)	log ₁₀ CFU/g	pH	TTA (%)	log ₁₀ CFU/g	pH	TTA (%)	log ₁₀ CFU/g	pH	TTA (%)	log ₁₀ CFU/g
0	23	6,20	0,04	8,1	4,94	0,19	9,0	4,53	0,29	9,0	4,34	0,41	8,9
	30	6,20	0,04	8,1	4,57	0,29	9,1	4,40	0,38	9,1	4,31	0,42	9,2
	37	6,20	0,04	8,1	4,44	0,38	8,9	4,37	0,42	9,0	4,34	0,44	8,7
5	23	6,17	0,03	8,3	4,91	0,18	8,9	4,54	0,34	9,1	4,37	0,45	9,0
	30	6,17	0,03	8,3	4,82	0,45	9,4	4,59	0,51	9,2	4,56	0,53	9,3
	37	6,17	0,03	8,3	4,54	0,27	8,9	4,44	0,29	9,0	4,40	0,45	9,0
25	23	6,14	0,06	7,3	5,21	0,22	8,9	4,74	0,30	9,1	4,46	0,39	8,9
	30	6,14	0,06	7,3	4,66	0,31	8,8	4,34	0,50	8,9	4,15	0,50	9,0
	37	6,14	0,06	7,3	4,59	0,28	8,7	4,36	0,44	8,8	4,29	0,43	8,5
75	23	6,18	0,07	7,8	5,16	0,19	8,8	4,69	0,38	9,0	4,60	0,44	8,9
	30	6,18	0,07	7,8	4,65	0,32	9,0	4,49	0,46	9,0	4,65	0,43	8,7
	37	6,18	0,07	7,8	4,69	0,49	8,7	4,37	0,49	9,1	4,47	0,46	8,6

Grafikon 17.1.1. Uticaj pirimifos-metila na efikasnost fermentacije sa *L. plantarum*

Kada se posmatraju rezultati uticaja pirimifos-metila na efikasnost fermentacije može se uočiti da se prisustvo ovog pesticida nije negativno odrazilo na mlečnokiselinsku fermentaciju pšenice. Naime iako je obogaćivanje od 5 mg/kg prvobitno dovelo do značajnijeg porasta broja ćelija u supstratu, da bi pri koncentracijama od 25 i 75 mg/kg došlo do značajnog smanjenja CFU, ove promene u broju nisu imale značajnog uticaja na promenu pH vrednosti niti na količinu

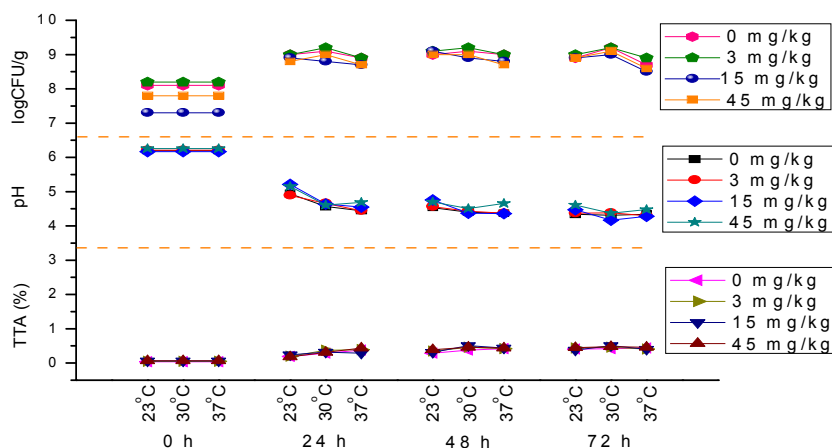
produkovane mlečne kiseline. Statističkom obradom eksperimentalnih podataka (ANOVA) u odabranom intervalu poverenja od 99% ($\alpha=0,01$) konstatovano je da, iako P-vrednost za faktor promene koncentracije pirimifos-metila u supstratu (od 0 do 75 mg/kg) iznosi $2,86 \cdot 10^{-8}$ za CFU, za promenu pH vrednosti i za produkciju mlečne kiseline ona prelazi interval od 0,01 ($P=0,1403$ odnosno $P=0,3288$). Ovo ukazuje na nepostojanje statistički značajnog uticaja pirimifos-metila na sveukupnu efikasnost fermentacije. Očigledno je da i u prisustvu pesticida rast laktobacila dostiže dovoljan nivo potreban za efikasnu fermentaciju pšeničnog supstrata.

Rezultati ispitivanja uticaja hlorpirifos-metila na efikasnost mlečnokiselinske fermentacije prikazani su u **tabeli 17.1.2.** i na **grafikonu 17.1.2.**

Rezultati pokazuju da ni prisustvo hlörpirifos-metila nema negativni uticaj na mlečnokiselinsku fermentaciju pšenice. Naime iako je kontaminacija pesticidom do 15 i 45 mg/kg dovela do značajnijeg smanjenja broja ćelija u supstratu, ni ovde promene u broju nisu imale značajnog uticaja na promenu pH vrednosti i na produkciju mlečne kiseline.

Tabela 17.1.2. Uticaj hlörpirifos-metila na efikasnost fermentacije sa *L. plantarum*

Hlorpirifos-metil (mg/kg)	Temperatura (°C)	Dužina inokulacije											
		0h			24h			48h			72h		
		pH	TTA (%)	$\log_{10}CFU/g$	pH	TTA (%)	$\log_{10}CFU/g$	pH	TTA (%)	$\log_{10}CFU/g$	pH	TTA (%)	$\log_{10}CFU/g$
0	23	6,20	0,04	8,1	4,94	0,19	9,0	4,53	0,29	9,0	4,34	0,41	8,9
	30	6,20	0,04	8,1	4,57	0,29	9,1	4,40	0,38	9,1	4,31	0,42	9,2
	37	6,20	0,04	8,1	4,44	0,38	8,9	4,37	0,42	9,0	4,34	0,44	8,7
3	23	6,21	0,05	8,2	4,89	0,20	9,0	4,56	0,35	9,1	4,37	0,44	9,0
	30	6,21	0,05	8,2	4,66	0,37	9,2	4,43	0,46	9,2	4,38	0,46	9,2
	37	6,21	0,05	8,2	4,44	0,39	8,9	4,37	0,42	9,0	4,30	0,41	8,9
15	23	6,17	0,06	7,3	5,21	0,24	8,9	4,76	0,31	9,1	4,47	0,38	8,9
	30	6,17	0,06	7,3	4,64	0,32	8,8	4,37	0,51	8,9	4,17	0,51	9,0
	37	6,17	0,06	7,3	4,55	0,29	8,7	4,36	0,44	8,8	4,28	0,40	8,5
45	23	6,26	0,07	7,8	5,15	0,18	8,8	4,70	0,39	9,0	4,61	0,45	8,9
	30	6,26	0,07	7,8	4,61	0,31	9,0	4,51	0,46	9,0	4,37	0,48	9,1
	37	6,26	0,07	7,8	4,69	0,44	8,7	4,66	0,44	8,7	4,48	0,46	8,6



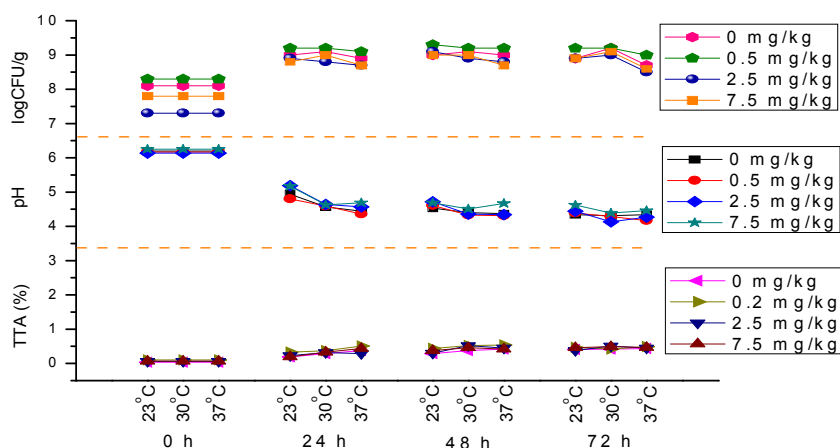
Grafikon 17.1.2. Uticaj hlorthirifos-metila na efikasnost fermentacije sa *L. plantarum*

Statističkom obradom eksperimentalnih podataka (ANOVA, $\alpha=0,01$) konstatovano je da, iako P-vrednost za faktor hlorthirifos-metila u supstratu (0 – 45 mg/kg) iznosi $2,81 \cdot 10^{-8}$ za CFU, za promenu pH vrednosti i za TTA ona prelazi interval od 0,01 ($P=0,0473$ tj. $P=0,3232$), što ukazuje na nepostojanje statistički značajnog uticaja hlorthirifos-metila na sveukupnu efikasnost fermentacije. Iako je, u poređenju sa pirimifos-metilom, P-vrednost za pH niža, što ukazuje na veću statističku značajnost ovog pesticida na promenu pH vrednosti supstrata, ipak i u prisustvu ovog pesticida rast *L. plantarum* dostiže dovoljan nivo potreban za efikasnu fermentaciju pšenice.

Rezultati ispitivanja uticaja bifentrina na efikasnost mlečnokiselinske fermentacije prikazani u **tabeli 17.1.3.** i na **grafikonu 17.1.3.** pokazuju da prisustvo ovog pesticida u koncentraciji 0,5 mg/kg negativno utiče na brojnost ćelija laktobacila, ali ne i na smanjenje pH i produkciju mlečne kiseline. Međutim, obogaćivanje sa 2,5 i 7,5 mg/kg dovodi i do značajnijeg povećanje pH i smanjenja TTA uz značajno smanjenje broja ćelija u supstratu. Statističkom obradom eksperimentalnih podataka (ANOVA, $\alpha=0,01$) konstatovano je da P-vrednosti za faktor bifentrina u supstratu (0 – 7,5 mg/kg) iznose 0,0095 za promenu pH vrednosti, 0,0024 za TTA i $4,07 \cdot 10^{-7}$ za CFU, što ukazuje na postojanje statistički značajnog uticaja bifentrina na sveukupnu efikasnost fermentacije, iako je P-vrednost za pH praktično na graničnom nivou.

Tabela 17.1.3. Uticaj bifentrina na efikasnost fermentacije sa *L. plantarum*

Bifentrin (mg/kg)	Temperatura (°C)	Dužina inokulacije											
		0h			24h			48h			72h		
		pH	TTA (%)	log ₁₀ CFU/g	pH	TTA (%)	log ₁₀ CFU/g	pH	TTA (%)	log ₁₀ CFU/g	pH	TTA (%)	log ₁₀ CFU/g
0	23	6,20	0,04	8,1	4,94	0,19	9,0	4,53	0,29	9,0	4,34	0,41	8,9
	30	6,20	0,04	8,1	4,57	0,29	9,1	4,40	0,38	9,1	4,31	0,42	9,2
	37	6,20	0,04	8,1	4,44	0,38	8,9	4,37	0,42	9,0	4,34	0,44	8,7
0,5	23	6,17	0,10	8,3	4,80	0,33	9,2	4,61	0,44	9,3	4,39	0,47	9,2
	30	6,17	0,10	8,3	4,59	0,37	9,2	4,33	0,52	9,2	4,29	0,42	9,2
	37	6,17	0,10	8,3	4,36	0,51	9,1	4,31	0,54	9,2	4,17	0,49	9,0
2,5	23	6,14	0,06	7,3	5,19	0,23	8,9	4,72	0,30	9,1	4,44	0,38	8,9
	30	6,14	0,06	7,3	4,64	0,32	8,8	4,36	0,52	8,9	4,13	0,51	9,0
	37	6,14	0,06	7,3	4,57	0,29	8,7	4,34	0,45	8,8	4,27	0,45	8,5
7,5	23	6,25	0,07	7,8	5,17	0,19	8,8	4,69	0,38	9,0	4,62	0,46	8,9
	30	6,25	0,07	7,8	4,63	0,33	9,0	4,51	0,46	9,0	4,39	0,49	9,1
	37	6,25	0,07	7,8	4,69	0,44	8,7	4,67	0,42	8,7	4,46	0,47	8,6

Grafikon 17.1.3. Uticaj bifentrina na efikasnost fermentacije sa *L. plantarum*

Međutim, ako se uzme u obzir da se po završetku fermentacije od 72 h nivoi količine produkovane mlečne kiseline izjednačuju sa kontrolnim uzorcima, i da su, generalno gledano, pH vrednosti većine uzoraka na zadovoljavajućem nivou (~4,5), stiče se utisak da negativan uticaj bifentrina na efikasnost fermentacije pšenice nije zabrinjavajući.

Uzimajući, dakle, sve u obzir, pirimifos-metil i hlorspirifos-metil, iako imaju izrazito negativan uticaj na rast i razvoj *L. plantarum* u MRS bujonu, i donekle dovode do smanjenja brojnosti laktobacila u pšeničnom supstratu, apsolutno ne utiču na njihovu sposobnost fermentacije pšenice. Sa druge strane, prisustvo bifentrina, koji nema izražen efekat na rast i aktivnost ove bakterije u supstratu za rast, dovodi do smanjenja njegove fermentacione sposobnosti u pšenici. I rezultati ranijih istraživanja o uticajima različitih pesticida na efikasnost fermentacija sa bakterijama mlečnokiselinskog vrenja prilično su oprečni. Dok jedni govore u prilog tome da pesticidi ne utiču negativno na ove procese bez obzira na smanjenje brojnosti aktivnih ćelija fermentativnih laktobacila [200], drugi pak tvrde suprotno [182,201]. Međutim, pregledom literature konstatovano je da nema puno publikacija vezanih za ispitivanje uticaja pesticida na fermentativnu efikasnost *Lactobacillus plantarum*, a dostupni podaci u saglasnosti su sa rezultatima ovog istraživanja. Tako su Cabras i sar. (1999, 2000) utvrdili da efikasnost fermentacije *L. plantarum* pri proizvodnji vina nije smanjena ni u prisustvu azoksistrobina, ciprodinila, fludioksonila, mepanipirima, pirimetanila i tetrakonazola [189] ni u prisustvu kvinoksifena [109] u grožđu, dok su Cho i sar. (2009) konstatovali da hlorspirifos ne utiče negativno na smanjenje pH vrednosti i produkciju mlečne kiseline pri pripremi tradicionalnog koreanskog jela od fermentisanog povrća [117]. Iz svega navedenog, a imajući u vidu rezultate dobijene ovim istraživanjem, evidentno je da svaka vrsta fermentativnog laktobacila drugačije reaguje na prisustvo različitih pesticida, što svakako treba uzeti u obzir prilikom postavljanja ogleda.

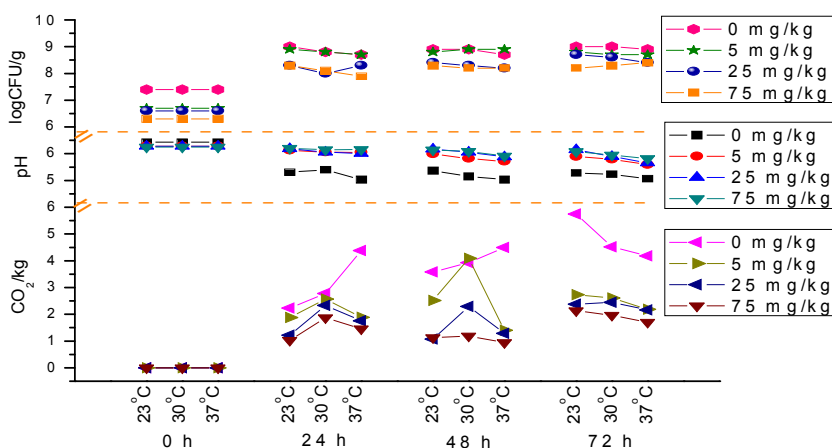
17.2. ISPITIVANJE UTICAJA PESTICIDA NA EFIKASNOST PROCESA KVASNE FERMENTACIJE ŽITNOG SUPSTRATA

Rezultati ispitivanja uticaja pirimifos-metila na efikasnost kvasne fermentacije prikazani su u **tabeli 17.2.1.** i na **grafikonu 17.2.1.**

Iz prezentovanih rezultata može se uočiti da prisustvo ovog pesticida ima negativni efekat i na smanjenje pH vrednosti supstrata i na produkciju CO₂. Kontaminacija na sva tri koncentraciona nivoa prouzrokuje značajno smanjenje CFU, što rezultira značajnim povećanjem pH vrednosti supstrata, na približno istom nivou.

Tabela 17.2.1. Uticaj pirimifos-metila na efikasnost fermentacije sa *S. cerevisiae*

Pirimifos-metil (mg/kg)	Temperatura (°C)	Dužina inokulacije											
		0h			24h			48h			72h		
		pH	CO ₂ /kg	log ₁₀ CFU/g	pH	CO ₂ /kg	log ₁₀ CFU/g	pH	CO ₂ /kg	log ₁₀ CFU/g	pH	CO ₂ /kg	log ₁₀ CFU/g
0	23	6,43	0	7,4	5,31	2,23	9,0	5,37	3,58	8,9	5,28	5,75	9,0
	30	6,43	0	7,4	5,40	2,78	8,8	5,15	3,93	8,9	5,23	4,52	9,0
	37	6,43	0	7,4	5,03	4,38	8,7	5,04	4,50	8,7	5,07	4,18	8,9
5	23	6,28	0	6,7	6,13	1,88	8,9	5,99	2,52	8,8	5,90	2,73	8,8
	30	6,28	0	6,7	6,06	2,57	8,8	5,82	4,09	8,9	5,80	2,61	8,7
	37	6,28	0	6,7	6,05	1,89	8,7	5,71	1,40	8,9	5,59	2,19	8,7
25	23	6,28	0	6,6	6,19	1,22	8,3	6,17	1,07	8,4	6,15	2,38	8,7
	30	6,28	0	6,6	6,06	2,33	8,0	6,06	2,29	8,3	5,90	2,45	8,6
	37	6,28	0	6,6	6,01	1,76	8,3	5,88	1,29	8,2	5,66	2,16	8,4
75	23	6,25	0	6,3	6,20	1,03	8,3	6,14	1,13	8,3	6,08	2,13	8,2
	30	6,25	0	6,3	6,15	1,87	8,1	6,09	1,19	8,2	5,95	1,96	8,3
	37	6,25	0	6,3	6,16	1,46	7,9	5,91	0,94	8,2	5,82	1,70	8,4

Grafikon 17.2.1. Uticaj pirimifos-metila na efikasnost fermentacije sa *S. cerevisiae*

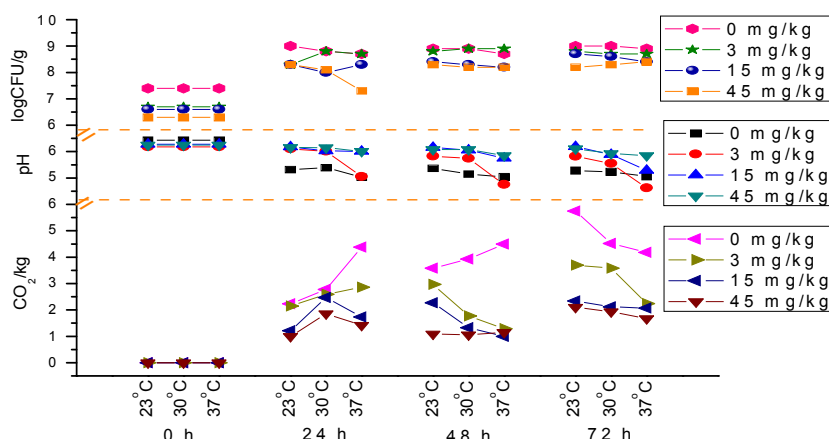
Značajnost ovog uticaja potvrđena je i statističkom obradom eksperimentalnih podataka (ANOVA) u odabranom intervalu poverenja od 99% ($\alpha=0,01$), gde su za faktor promene koncentracije pirimifos-metila u supstratu (od 0 do 75 mg/kg) dobijene P-vrednosti od čak $1,64 \cdot 10^{-15}$ za CFU i $2,72 \cdot 10^{-14}$ za promenu pH vrednosti. Ove vrednosti, koje su znatno manje od 0,01, ukazuju ne samo na to da prisustvo pirimifos-metila predstavlja varijabilu statistički značajnu za

efikasnost fermentacije izraženu kroz smanjenje pH vrednosti, nego i na to da je njena statistička značajnost izrazito velika. Kada se posmatra promena produkcije CO₂ u kontrolnom supstratu bez pesticida, može se uočiti pravilnost da je u toku fermentacije od 24 i 48 h povećanje produkcije proporcionalno sa povećanjem temperature inkubacije, dok u toku 72 h sa povećanjem temperature dolazi do njenog opadanja. Prisustvo pirimifos-metila u supstratu, osim što generalno smanjuje količinu produkovanog CO₂ pri čemu je smanjenje proporcionalno sa porastom koncentracije pesticida, dovodi i do promene u pomenutoj pravilnosti. Tako pri inkubaciji na 37 °C u toku 24 i 48 h dolazi do naglog opadanja u produkciji CO₂ i to na sva tri koncentraciona nivoa proporcionalno. Značajnost negativnog uticaja pirimifos-metila na produkciju CO₂ potvrđena je takođe statističkom obradom eksperimentalnih podataka (ANOVA, $\alpha=0,01$), pri čemu je za faktor promene koncentracije pirimifos-metila u supstratu dobijena P-vrednost od $7,51 \cdot 10^{-8}$ za ovaj fermentacioni odziv.

Rezultati ispitivanja uticaja hlorpirifos-metila na efikasnost kvasne fermentacije prikazani su u **tabeli 17.2.2.** i na **grafikonu 17.2.2.**

Tabela 17.2.2. Uticaj hlörpirifos-metila na efikasnost fermentacije sa *S. cerevisiae*

Hlorpirifos-metil (mg/kg)	Temperatura (°C)	Dužina inokulacije											
		0h			24h			48h			72h		
		pH	CO ₂ /kg	log ₁₀ CFU/g	pH	CO ₂ /kg	log ₁₀ CFU/g	pH	CO ₂ /kg	log ₁₀ CFU/g	pH	CO ₂ /kg	log ₁₀ CFU/g
0	23	6,43	0	7,4	5,31	2,23	9,0	5,37	3,58	8,9	5,28	5,75	9,0
	30	6,43	0	7,4	5,40	2,78	8,8	5,15	3,93	8,9	5,23	4,52	9,0
	37	6,43	0	7,4	5,03	4,38	8,7	5,04	4,50	8,7	5,07	4,18	8,9
3	23	6,18	0	6,7	6,10	2,15	8,3	5,83	2,97	8,8	5,82	3,70	8,8
	30	6,18	0	6,7	6,01	2,59	8,8	5,74	1,77	8,9	5,55	3,58	8,7
	37	6,18	0	6,7	5,05	2,86	8,7	4,75	1,29	8,9	4,62	2,24	8,7
15	23	6,28	0	6,6	6,18	1,21	8,3	6,16	2,27	8,4	6,19	2,34	8,7
	30	6,28	0	6,6	6,03	2,47	8,0	6,06	1,33	8,3	5,89	2,12	8,6
	37	6,28	0	6,6	6,01	1,73	8,3	5,75	1,00	8,2	5,29	2,07	8,4
45	23	6,25	0	6,3	6,16	1,00	8,3	6,08	1,09	8,3	6,11	2,10	8,2
	30	6,25	0	6,3	6,15	1,86	8,1	6,08	1,06	8,2	5,93	1,93	8,3
	37	6,25	0	6,3	6,01	1,42	7,3	5,85	1,15	8,2	5,85	1,67	8,4



Grafikon 17.2.2. Uticaj hlorpirifos-metila na efikasnost fermentacije sa *S. cerevisiae*

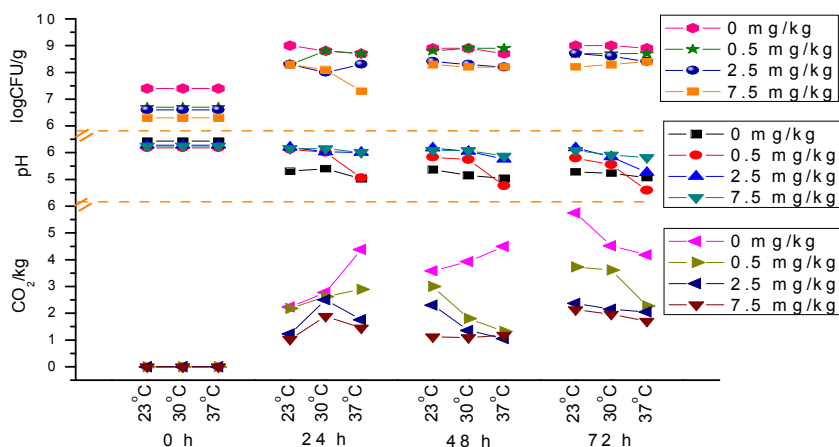
Rezultati prikazani na grafikonu i u tabeli pokazuju da i prisustvo hlorpirifos-metila ima negativan uticaj na kvasnu fermentaciju pšenice. Međutim, iako kontaminacija na sva tri koncentraciona nivoa prouzrokuje značajno smanjenje CFU, ova promena je najmanja u prisustvu pesticida u koncentraciji od 3 mg/kg, i u skladu sa tim i povećanje pH vrednosti supstrata, naročito pri fermentaciji od 48 i 72 h, nije u velikoj meri izraženo, a čak dolazi i do njegovog smanjenja pri inkubaciji na 37 °C. Obogaćivanje sa 15 i 45 mg/kg dovodi, pak, do značajnijeg povećanja pH vrednosti, iako se nakon 72 h fermentacije pri 37 °C pH vrednost spušta do nivoa kontrolnog uzorka. Statističkom obradom eksperimentalnih podataka (ANOVA, $\alpha=0,01$) konstatovano je da za faktor hlorpirifos-metila u supstratu (0 – 45 mg/kg) P-vrednost iznosi $1,10 \cdot 10^{-10}$ za CFU i $1,68 \cdot 10^{-7}$ za promenu pH vrednosti. U poređenju sa pirimifos-metilom, ove P-vrednosti su znatno više, što ukazuje na manju statističku značajnost ovog pesticida na pH i CFU. Što se tiče promene produkcije CO₂, prisustvo hlorpirifos-metila takođe generalno smanjuje količinu produkovanog CO₂ pri čemu je smanjenje opet proporcionalno sa porastom koncentracije pesticida. Osim toga, i hlorpirifos-metil dovodi do promene u pravilnosti uočenoj u kontrolnom supstratu bez pesticida, pri čemu se pravilnost zadržava samo na najmanjem koncentracionom nivou pri fermentaciji od 24 h. Tako u prisustvu hlorpirifos-metila u koncentracijama od 15 i 45 mg/kg, pri inkubaciji na 37 °C u toku 24 h dolazi do naglog opadanja u produkciji CO₂, dok je u toku fermentacije od 48 i 72 h ovo smanjenje proporcionalno sa porastom temperature na sva tri koncentraciona nivoa. Značajnost negativnog uticaja hlorpirifos-metila na produkciju CO₂ potvrđena

je statističkom obradom eksperimentalnih podataka (ANOVA, $\alpha=0,01$), a za faktor promene koncentracije ovog pesticida u supstratu dobijena je P-vrednost od $1,60 \cdot 10^{-7}$ za ovaj fermentacioni odziv.

Rezultati ispitivanja uticaja bifentrina na efikasnost kvasne fermentacije prikazani u **tabeli 17.2.3.** i na **grafikonu 17.2.3.** pokazuju da prisustvo ovog pesticida, na veoma sličan način kao i hlorporifos-metil, negativno utiče na kvasnu fermentaciju pšenice.

Tabela 17.2.3. Uticaj bifentrina na efikasnost fermentacije sa *S. cerevisiae*

Bifentrin (mg/kg)	Temperatura (°C)	Dužina inokulacije											
		0h			24h			48h			72h		
		pH	CO ₂ /kg	log ₁₀ CFU/g	pH	CO ₂ /kg	log ₁₀ CFU/g	pH	CO ₂ /kg	log ₁₀ CFU/g	pH	CO ₂ /kg	log ₁₀ CFU/g
0	23	6,43	0	7,4	5,31	2,23	9,0	5,37	3,58	8,9	5,28	5,75	9,0
	30	6,43	0	7,4	5,40	2,78	8,8	5,15	3,93	8,9	5,23	4,52	9,0
	37	6,43	0	7,4	5,03	4,38	8,7	5,04	4,50	8,7	5,07	4,18	8,9
0,5	23	6,18	0	6,7	6,13	2,18	8,3	5,83	3,00	8,8	5,80	3,73	8,7
	30	6,18	0	6,7	6,01	2,62	8,8	5,74	1,80	8,9	5,55	3,61	8,7
	37	6,18	0	6,7	5,05	2,89	8,7	4,76	1,32	8,9	4,59	2,27	8,7
2,5	23	6,28	0	6,6	6,20	1,23	8,3	6,17	2,30	8,4	6,18	2,37	8,7
	30	6,28	0	6,6	6,03	2,50	8,0	6,05	1,36	8,3	5,84	2,15	8,6
	37	6,28	0	6,6	6,01	1,76	8,3	5,76	1,05	8,2	5,26	2,05	8,4
7,5	23	6,25	0	6,3	6,16	1,03	8,3	6,09	1,12	8,3	6,08	2,13	8,2
	30	6,25	0	6,3	6,15	1,89	8,1	6,08	1,09	8,2	5,91	1,96	8,3
	37	6,25	0	6,3	6,01	1,45	7,3	5,87	1,18	8,2	5,82	1,70	8,4



Grafikon 17.2.3. Uticaj bifentrina na efikasnost fermentacije sa *S. cerevisiae*

I kod bifentrina kontaminacija na sva tri koncentraciona nivoa prouzrokuje značajno smanjenje CFU, a promena je najmanja pri koncentraciji pesticida od 0,5 mg/kg, kada povećanje pH, naročito pri fermentaciji od 48 i 72 h, nije u velikoj meri izraženo, dok pri inkubaciji na 37 °C dolazi i do njegovog smanjenja ispod pH kontrolnog uzorka. Premda se nakon 72 h fermentacije pri 37 °C pH vrednost takođe spušta do nivoa kontrolnog uzorka, ipak obogaćivanje sa 2,5 i 7,5 mg/kg bifentrina generalno dovodi do značajnijeg povećanja pH vrednosti. Statističkom obradom eksperimentalnih podataka (ANOVA, $\alpha=0,01$) za faktor bifentrina u supstratu (0 – 7,5 mg/kg) dobijena je P-vrednost od $8,28 \cdot 10^{-11}$ za CFU i $1,67 \cdot 10^{-7}$ za promenu pH vrednosti. U poređenju sa hlorpirifos-metilom, ove P-vrednosti su na sličnom nivou, što ukazuje na istu statističku značajnost ovog pesticida na pH i CFU. Prisustvo bifentrina takođe smanjuje količinu produkovanog CO₂ proporcionalno sa porastom koncentracije pesticida, i dovodi (osim na najmanjem koncentracionom nivou pri fermentaciji od 24 h) do promene u pravilnosti uočenoj u kontrolnom supstratu bez pesticida. U prisustvu bifentrina u koncentracijama od 2,5 i 7,5 mg/kg, pri inkubaciji na 37 °C u toku 24 h dolazi do naglog smanjenja produkcije CO₂, dok je u toku fermentacije od 48 i 72 h ovo smanjenje proporcionalno sa porastom temperature na sva tri koncentraciona nivoa. Za faktor promene koncentracije bifentrina u supstratu, statističkom obradom eksperimentalnih podataka (ANOVA, $\alpha=0,01$), dobijena je P-vrednost od $1,95 \cdot 10^{-7}$ što potvrđuje značajnost negativnog uticaja bifentrina na ovaj fermentacioni odziv.

U literaturi nema mnogo eksperimentalnih podataka za komparaciju rezultata, s obzirom da su ranija istraživanja fokusirana prvenstveno na uticaj fungicida na fermentacionu efikasnost kvasca u toku proizvodnje vina. Ove publikacije učestale su zbog pretpostavke da će prisustvo fungicida, kojima se vinova loza tretira u cilju uništavanja štetnih patogenih gljiva, suzbijati i rast fermentativne gljive, čime će se komprovitovati efikasnost fermentacije grožđa u proizvodnji vina. Neočekivano, većina dobijenih rezultata baziranih na ispitivanju rasta *S. cerevisiae*, bilo u podlogama za rast kontaminiranim brojnim fungicidima (zoksamid, pirimetanil, azoksistrobin, ciprodinil, fludioksonil, mepanirim, tetrakonazol, kvinoksifen), bilo u fermentacionom supstratu od grožđa tretiranog fungicidima (pirimetanil, iprodion, fludioksonil, fenheksamid) saglasni su sa time da

nema negativnog uticaja pesticida [109,186,189,202,204,205]. Međutim, postoji i podatak da je tebukonazol, iako nije negativno uticao na fermentativnu sposobnost kvasca u toku proizvodnje vina, inhibirao njegovu fermentaciju u podlozi za rast [203]. S obzirom na to, a imajući u vidu rezultate dobijene ovim istraživanjem, evidentno je da kvasac drugačije reaguje na prisustvo različitih pesticida, a naročito u drugačijim supstratima za rast, što svakako treba uzeti u obzir prilikom postavljanja ogleda.

18. ISPITIVANJE EFIKASNOSTI RAZLIČITIH METODA PRIPREME UZORAKA ZA ODREĐIVANJE OSTATAKA PIRIMIFOS-METILA, HLORPIRIFOS-METILA I BIFENTRINA U FERMENTISANIM UZORCIMA PŠENICE

Ispitivanju uticaja fermentacije na degradaciju izabranih aktivnih materija pesticida predhodio je izbor optimalne analitičke metode za pripremu uzoraka za određivanje ostataka ovih pesticida u fermentisanim proizvodima. Naime, kako bi rezultati o eventualnom pozitivnom efektu mlečnokiselinske i kvasne fermentacije na smanjenje nivoa rezidua pesticida u uzorcima pšenice bili validni, bilo je potrebno odabrati adekvatnu metodu pripreme fermentisanih uzoraka tj. metodu kojom će se rezidue ovih pesticida efektivno ekstrahovati iz njih. Odabir najadekvatnije metode obuhvatao je poređenje najvažnijih analitičkih parametara tri različite metode pripreme fermentisanih uzoraka obogaćenih do tri koncentraciona nivoa – MDK, 2xMDK i 4xMDK (*Odeljak 12.2.*). Rezultati ispitivanja prikazani su u **tabeli 18.1.** i na **grafikonu 18.1.**

Efikasnost testiranih metoda utvrđena je izračunavanjem prinosa metoda (*recovery*), tj. procentualnog odnosa količine aktivne materije ekstrahovane iz uzorka datom metodom i količine aktivne materije aplikovane na uzorak. Svi eksperimenti rađeni su u po tri ponavljanja, a preciznost testiranih metoda izražena je kao relativna standardna devijacija (%RSD).

Tabela 18.1. Efikasnost različitih metoda pripreme uzoraka za određivanje ostataka pirimifos-metila, hlörpirifos-metila i bifentrina u fermentisanom žitnom supstratu, izražena kroz prinos metoda (*recovery*) i preciznost merenja (RSD)

	Prinos metode – <i>recovery</i> (%) ± RDS (%) [#]			
	Ca.m. [§] (mg/kg)	Metoda 1 (Al ₂ O ₃ -DHM) [*]	Metoda 2 (Fl-EtA:Ac)	Metoda 3 (Al ₂ O ₃ -EtA:Ac)
Pirimifos-metil	5	48,8±3,5 ^a	93,0±2,7 ^b	61,4±2,7 ^c
	10	44,9±4,0 ^a	96,0±2,2 ^b	63,3±3,3 ^c
	20	48,2±2,5 ^a	93,7±3,5 ^b	62,0±2,6 ^c
Hlorpirifos-metil	3	31,3±9,2 ^a	88,2±4,6 ^b	51,1±2,7 ^c
	6	34,6±5,0 ^a	82,8±2,7 ^b	54,8±5,8 ^c
	12	32,9±3,8 ^a	85,3±2,5 ^b	54,6±3,5 ^c
Bifentrin	0,5	34,9±5,6 ^a	82,6±4,1 ^b	63,0±4,2 ^c
	1	38,0±9,7 ^a	80,5±2,2 ^b	61,1±6,4 ^c
	2	31,3±4,5 ^a	82,1±3,8 ^b	60,6±10,4 ^c

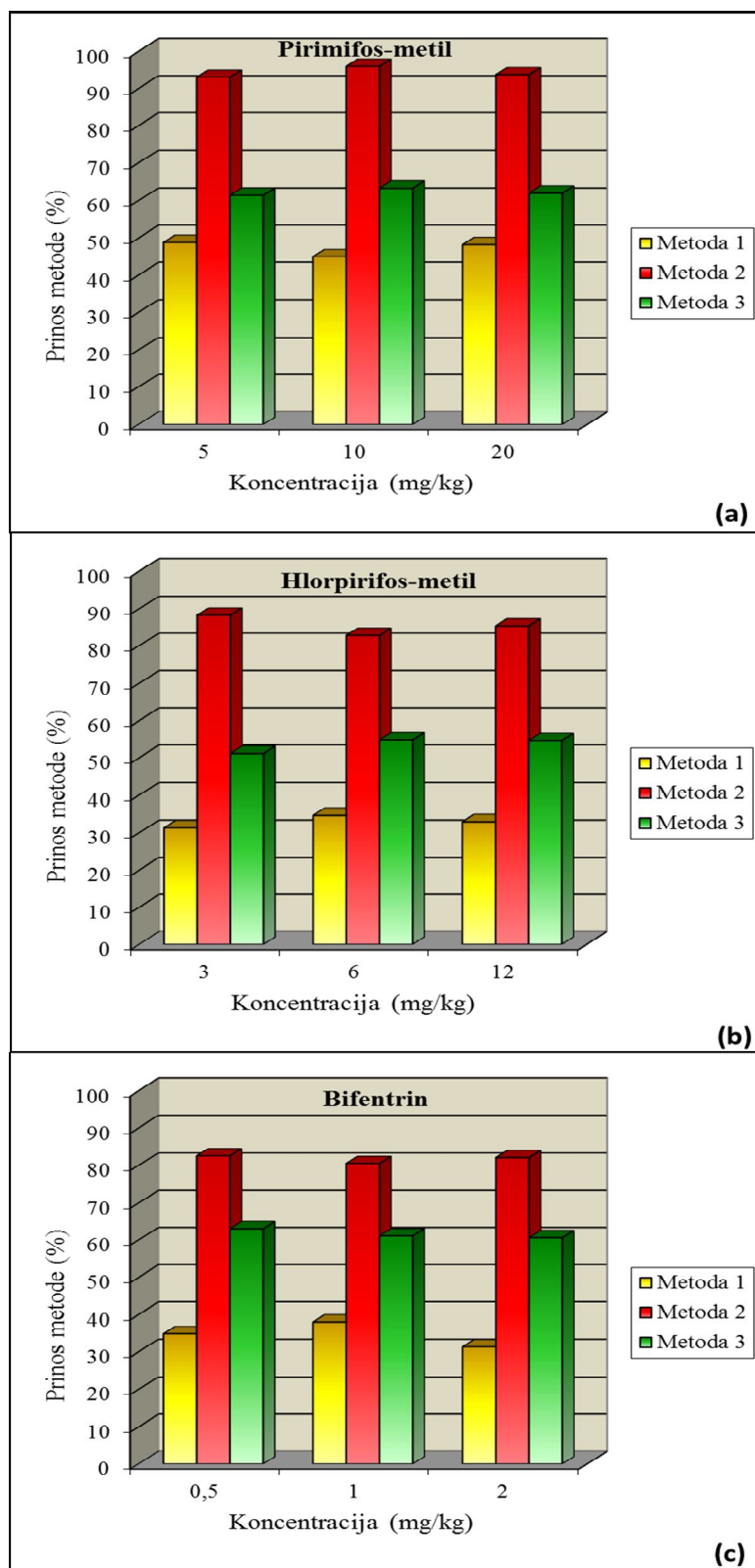
[§]Ca.m. – koncentracija pesticida

^{*} Al₂O₃-DHM – adsorbens mešavina aluminijum oksid:aktivni ugalj=12:1, eluent dihlormetan; Fl-EtA:Ac – adsorbens florisil, eluent meša etil-acetat:aceton=4:1; Al₂O₃-EtA:Ac – adsorbens mešavina aluminijum oksid:aktivni ugalj=12:1, eluent meša etil-acetat:aceton=4:1

[#] vrednosti prinosa za svaki pesticid obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju (t-test, p=0,05)

Kao što se može videti iz rezultata prezentovanih u **tabeli 18.1.** prinosi testiranih metoda statistički se značajno međusobno razlikuju, dok su razlike u prinosima unutar pojedinačnih metoda pri različitim koncentracijama pesticida male.

Prosečni prinosi *Metode 1* za sva tri ispitivana pesticida su na veoma niskom nivou, za sva tri koncentraciona nivoa, i kreću se od 31,3-34,6 % za hlörpirifos-metil, 31,3-38 % za bifentrin i nešto većim prinosom u opsegu od 44,9-48,8 % za pirimifos-metil. Očigledno je, da iako je preciznost testirane metode bila na zadovoljavajućem nivou (opsezi RSD-a od 2,5-4,0 %, 3,8-9,2 % i 4,5-9,7 % za pirimifos-metil, hlörpirifos-metil i bifentrin), ovom metodom se ispitivani pesticidi ne mogu efikasno ekstrahovati iz fermentisanog pšeničnog supstrata. Premda su Khan i sar. (2007) predstavili ovu metodu kao jednostavnu, brzu i ekonomičnu proceduru za efikasnu multirezidualnu analizu ostataka pesticida u pšeničnom brašnu [61], očigledno je da smanjenje pH vrednosti supstrata i druge promene do kojih dolazi u toku fermentacije imaju negativan uticaj na efikasnost predložene metode.



Grafikon 18.1. Efikasnost različitih metoda pripreme uzoraka za određivanje ostataka (a) pirimifos-metila (b) hlorpirifos-metila i (c) bifentrina u fermentisanom žitnom supstratu, izražena kroz prinos metode (*recovery*)

Sa druge strane, prosečni prinosi *Metode 2* za sva tri ispitivana pesticida veoma su visoki na sva tri koncentraciona nivoa. Opsezi prinosa kreću se od 80,5-82,6 % za bifentrin, 82,8-88,2 % za hlorspirifos-metil i 93,0-96,0 % za pirimifos-metil, pri čemu je preciznost metode veoma zadovoljavajuća sa relativnim standardnim devijacijama od 2,2-4,1 %, 2,5-4,6 % i 2,2-3,5 % za ova tri pesticida. Ova metoda, ranije se pokazala kao veoma efikasna za određivanje pesticida u izuzetno kompleksnom zemljišnom matriksu [179], a očigledno je da je florisil, korišćen u ovoj metodi kao adsorbens, na zadovoljavajućem nivou zadržao nečistoće ekstrahovane iz fermentisanog supstrata. Dobijeni prinosi *Metode 2* ukazuju na to da se ova metoda pripreme uzoraka može koristiti za određivanje ostataka ispitivanih pesticida u fermentisanim pšeničnim proizvodima pri ispitivanju uticaja fermentacije na stepen degradacije izabranih aktivnih materija pesticida

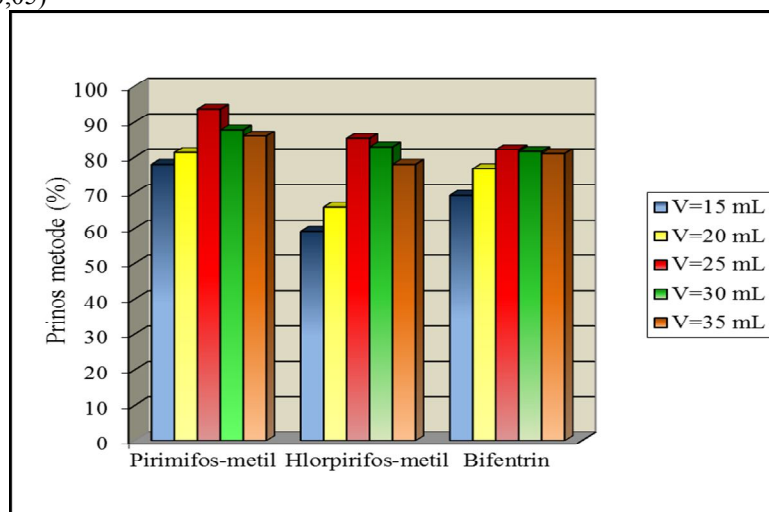
Treća testirana metoda prečišćavanja bazirana je na kombinaciji prve dve metode. Imajući u vidu da je aluminijum oksid sorbent efikasan za prečišćavanje uzoraka koji sadrže uljaste komponente, a aktivni ugalj efikasno uklanja obojene koekstrahante, mešavina ove dve komponente je testirana kao adsorbens. Sa druge strane, dihlormetan kao izuzetno toksičan rastvarač, zamenjen je sa manje toksičnim etil-acetatom i acetonom. Dobijeni prinosi ovako kombinovane *Metode 3* znatno su bolji u poređenju sa prvom testiranom metodom, ali primetno lošiji u poređenju sa drugom. Opsezi prinosa kreću se od 51,1-54,8 % za hlorspirifos-metil, 60,6-63,0 % za bifentrin i 61,4-63,3 % za pirimifos-metil, sa dobrom preciznošću od 2,7-5,8 %, 4,2-10,4 % i 2,6-3,3 % za ova tri pesticida.

Nakon poređenja prinosa sve tri metode, *Metoda 2*, odnosno kombinacija adsorbensa florisila i eluenta etil-acetat:aceton=4:1, odabrana je za dalji rad. U cilju racionalizacije utroška eluenta, metoda je optimizovana određivanjem optimalne zapremine eluenta za ispiranje pesticida sa punjenja kolone prilikom prečišćavanja uzorka. Ova dodatna testiranja efikasnosti metode pri eluiranju kolone sa 15, 20, 25, 30 ili 35 mL eluenta izvršena su na fermentisanim uzorcima obogaćenim sa najvećom koncentracijom pesticida (20 mg/kg za pirimifos-metil, 12 mg/kg za hlorspirifos-metil i 2 mg/kg za bifentrin), a dobijeni prinosi su prikazani u **tabeli 18.2.** i na **grafikonu 18.2.**

Tabela 18.2. Uticaj eluiranja uzorka sa različitim zapreminama eluenta na prinos odabrane metode pripreme uzoraka

Zapremina eluenta (mL)	Prinos metode – recovery (%) ± RDS (%)*		
	Pirimifos-metil	Hlorpirifos-metil	Bifentrin
15	78,1±2,7 ^a	59,2±2,9 ^a	69,3±2,5 ^a
20	81,3±3,3 ^a	65,9±3,7 ^b	76,9±2,4 ^b
25	93,7±3,5 ^b	85,3±2,5 ^c	82,1±3,8 ^b
30	87,8±1,8 ^c	82,9±2,5 ^c	81,6±3,6 ^b
35	86,0±2,5 ^c	78,1±2,6 ^d	81,0±5,8 ^b

* vrednosti prinosa za svaki pesticid obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju (t-test, p=0,05)



Grafikon 18.2. Uticaj eluiranja uzorka sa različitim zapreminama eluenta na prinos odabrane metode pripreme uzoraka

Kao što se može videti iz rezultata prikazanih u **tabeli 18.2.** dobijeni prinosi metode za pirimifos-metil su u opsegu od ~78-94 % (sa relativnim standardnim devijacijama od 1,8-3,5 %) i umereno se statistički razlikuju. Tako je najmanji prinos od 78,1 % postignut nakon eluiranja sa najmanjom zapreminom eluenta (15 mL), a nešto veći prinos, premda statistički neznačajno, postignut je nakon eluiranja sa 20 mL (81,3 %). Najveći prinos postignut je eluiranjem sa 25 mL smeše rastvarača (93,7 %), pri čemu se on statistički razlikuje i od prinosa sa 20 mL eluenta i od nešto manjeg prinosa dobijenog nakon eluiranja sa 30 mL (87,8 %). Eluiranjem sa 35 mL prinos metode je dodatno opao (86 %), mada statistički neznačajno u odnosu na prinos sa 30 mL.

Što se tiče hlorpirifos-metila, dobijeni su prinosi u opsegu od ~59-85 % (RSD od 2,5-3,7 %) sa izraženijim, većinom statistički značajnim međusobnim

razlikama. I za ovaj pesticid najmanji prinos postignut je eluiranjem sa 15 mL rastvarača (59,2 %), dok je već statistički značajno veći prinos postignut nakon eluiranja sa 20 mL (65,9 %). Najveći prinos postignut je eluiranjem sa 25 mL smeše rastvarača (85,3 %), pri čemu je on statistički značajno veći od predhodnog, ali se ne razlikuje značajno od nešto nižeg prinosa dobijenog nakon eluiranja sa 30 mL (82,9 %). Daljim povećanjem zapremine eluenta na 35 mL postignut je značajnije manji prinos od 78,1 %.

Za bifentrin dobijeni su prinosi metode od ~69-82 % sa RSD u opsegu od 2,4-5,8 %, ali razlike među rezultatima uglavnom nisu statistički značajne. Opet je najmanji prinos metode postignut nakon eluiranja sa najmanjom zapreminom eluenta (69,3 %) i on je jedini koji se statistički razlikuje od ostalih. Hijerarhijski niz povećanja prinosa dalje je sa 20 mL (76,9 %), zatim sa 35 mL (81 %), 30 mL (81,6 %), a najveći prinos postignut je sa 25 mL rastvarača (82,1 %).

Uopšteno gledano, najveći prinosi za sva tri pesticida postignuti su nakon eluiranja sa 25 mL smeše rastvarača i, premda se za hlörpirifos-metil ovaj prinos statistički značajno ne razlikuje od prinosa sa 30 mL, a za bifentrin se statistički značajno razlikuje jedino od prinosa sa 15 mL, iz praktičnih razloga i zbog ekonomičnijeg utroška toksičnih rastvarača, zapremina od 25 mL eluenta odabrana je za dalji rad.

S obzirom da je priprema uzoraka po *Metodi 2*, odnosno kombinacija florisila i smeše etil-acetat:aceton=4:1, uz korišćenje 25 mL eluenta za ispiranje kolone odabrana za dalje praćenje degradacije ispitivanih pesticida u toku fermentacije, u cilju potvrđivanja validnosti izabrane metode, određeni su limit detekcije (LOD – Limit Of Detection) tj. najmanja koncentracija ili količina analita za koju se može tvrditi da se statistički razlikuje od slepe probe, kao i limit kvantifikacije (LOQ – Limit Of Quantification) tj. najmanja koncentracija ispitivane supstance u uzorku koja može biti određena sa prihvatljivom preciznošću i tačnošću pod datim eksperimentalnim uslovima. Detekcioni i kvantifikacioni limit odabrane metode izraženi su u skladu sa IUPAC-ovom preporukom [194] kao $3,29 \times S_B$ odnosno $16,67 \times S_B$ gde je S_B standardna devijacija slepe probe. Na ovaj način dobijeni su LOD i LOQ izabrane metode od 0,011 mg/kg odnosno 0,04 mg/kg za pirimifos-metil, 0,007 mg/kg odnosno 0,04 mg/kg za hlörpirifos-metil i 0,004 mg/kg

odnosno 0,014 mg/kg za bifentrin. Imajući u vidu da su najniže koncentracije korišćene u eksperimentu bile aplikacija pirimifos-metila na nivou od 5 mg/kg, hlörpirifos-metila na nivou od 3mg/kg i bifentrina na nivou od 0,5 mg/kg, može se zaključiti da je predložena metoda pripreme uzorka dovoljno osetljiva za određivanje ostataka korišćenih pesticida i praćenje njihove degradacije u toku fermentacije.

19. ISPITIVANJE UTICAJA MLEČNOKISELINSKE I KVASNE FERMENTACIJE NA DEGRADACIJU PIRIMIFOS-METILA, HLORPIRIFOS-METILA I BIFENTRINA

U okviru predstojeće faze eksperimenta, osim ispitivanja uticaja mlečnokiselinske i kvasne fermentacije pšeničnog supstrata na degradaciju ispitivanih pesticida i optimizacije fermentacionih parametara u cilju postizanja maksimalnog stepena degradacije pesticida, određen je i doprinos samog procesa fermentacije degradaciji pesticida i to praćenjem redukcije ispitivanih pesticida nakon sterilizacije i njihove spontane degradacije pri fermentacionim uslovima, tj. na datim temperaturama inkubacije i u određenim vremenskim intervalima.

19.1. ISPITIVANJE SPONTANE DEGRADACIJE PESTICIDA I DEGRADACIJE POD DEJSTVOM STERILIZACIJE

Kako bi se odredio doprinos samog procesa fermentacije u degradaciji pesticida uključenih u istraživanje, prvobitno je, određivanjem ostataka ispitivanih pesticida u uzorcima kontaminirane pšenice odmah nakon autoklaviranja, utvrđeno prisustvo degradacije pirimifos-metila, hlörpirifos-metila i bifentrina pod dejstvom sterilizacije. Na ovaj način ujedno je definisana i početna količina ostataka pesticida u pšeničnim uzorcima koji se uključuju u fermentacione procese.

S obzirom da je u postupku ispitivanja uticaja sterilizacije na degradaciju pesticida korišćena metoda pripreme uzoraka koja se ranije pokazala kao efikasna za određivanje ostataka pesticida u fermentisanim uzorcima (prinosi metode 82,1-93,7 %, *Tabela 18.2.*), a imajući u vidu da se uzorci ispitivani na ostatke pesticida nakon sterilizacije sastoje samo od samlevene kontaminirane pšenice (*odjeljak 13.1.*), ponovo je izračunat prinos metode kako bi se utvrdilo sa pouzdanošću da je ona

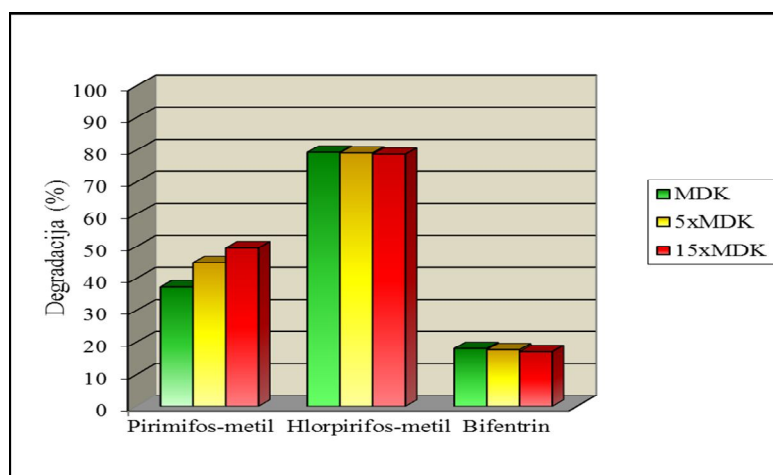
efikasna i za pripremu nefermentisanih pšeničnih uzoraka. Dobijeni rezultati ukazuju da su prinosi metode za sva tri koncentraciona nivoa pšenice (MDK, 5xMDK i 15xMDK) na zadovoljavajućem nivou i u opsezima predhodno dobijenih prinosa, i iznose (sa relativnim standardnim devijacijama) za pirimifos-metil $90\pm 2,3\%$, $87,6\pm 1,1\%$ i $86,1\pm 3,0\%$, za hlörpirifos-metil $87,8\pm 1,9\%$, $85,3\pm 5,2\%$ i $84,4\pm 0,2\%$ i za bifentrin $82,1\pm 3,4\%$, $83\pm 1,6\%$ i $83,1\pm 0,3\%$.

Rezultati ispitivanja uticaja sterilizacije na degradaciju ispitivanih pesticida prikazani su u tabeli 19.1.1. i na grafikonu 19.1.1.

Tabela 19.1.1. Uticaj sterilizacije pšeničnog supstrata na degradaciju pirimifos-metila, hlörpirifos-metila i bifentrina

	Primenjena koncentracija (mg/kg)	Koncentracija a.m. nakon sterilizacije (mg/kg)*	Stepen degradacije (%) [#]
Pirimifos-metil	5,36±0,02	3,36±0,14	37,4±2,3 ^a
	25,58±0,01	14,10±1,73	44,9±6,8 ^a
	75,20±0,10	37,91±0,26	49,6±0,3 ^b
Hlorpirifos-metil	2,99±0,00	0,62±0,03	79,4±0,9 ^a
	15,81±0,01	3,29±0,22	79,2±1,4 ^a
	45,14±0,06	9,58±2,96	78,8±6,5 ^a
Bifentrin	0,53±0,01	0,43±0,01	18,0±0,4 ^a
	2,63±0,01	2,17±0,03	17,6±0,8 ^a
	7,76±0,01	6,44±0,24	17,0±2,9 ^a

* a.m. – aktivna materija; [#]vrednosti nivoa degradacije za svaki pesticid obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju (t-test, p=0,05)



Grafikon 19.1.1. Uticaj sterilizacije pšeničnog supstrata na degradaciju pirimifos-metila, hlörpirifos-metila i bifentrina

Iz prezentovanih rezultata može se videti da hlörpirifos-metil u najvećoj meri degradira pod uticajem temperature (121 °C) i povišenog pritiska (103 kPa) u toku sterilizacije u autoklavu (15 minuta), i to do maksimalnih ~79 % pri čemu je degradacija na približno istom nivou za sve tri primenjene koncentracije pesticida. Od ispitivanih pesticida, hlörpirifos-metil jeste pesticid sa najvećim naponom pare te stoga najpodložniji isparavanju, a dobijen visok procenat degradacije ove aktivne materije u saglasnosti je sa njegovom ranije zabeleženom degradacijom i to ne samo pod uticajem visokih temperatura od 205 °C nego i pod uticajem blaže povišenih temperatura do 40 °C [162,163]. Očigledno je da, kao što su istakli Holland i sar. (1994), procesi koji uključuju povišenu temperaturu lako mogu da dovedu do povećanja isparljivosti, hidrolize ili drugih hemijskih degradacija i na taj način značajno da utiču na smanjenje koncentracije ostataka pesticida [67].

Pirimifos-metil znatno manje od hlörpirifos-metila degradira u uslovima sterilizacije u autoklavu, premda i njegova degradacija dostiže visok nivo do maksimalnih ~50 %, pri čemu je ovde izraženija razlika u degradaciji pri različitim nivoima koncentracije, a značajno veća degradacija je postignuta pri najvećoj koncentraciji. Dobijeni rezultati u saglasnosti su sa podacima publikovanim od strane Uygun i sar. (2008) koji su ustanovili da na degradaciju pirimifos-metila povećanje temperature utiče, ali na znatno manjem nivou u odnosu na hlörpirifos-metil [162]. Uobičajeno je da, kada se supstrat kontaminiran pesticidima podvrgne izlaganju visokoj temperaturi, do gubitka rezidua dolazi usled isparavanja, kodestilacije i/ili termalne degradacije, a do kojeg će fizičko-hemijskog procesa doći zavisi prvenstveno od hemijskih osobina samih pesticida [68]. Dobijena degradacija pirimifos-metila verovatno je posledica nešto većeg napona pare ove aktivne materije u kombinaciji sa njegovom ranije ustanovljenom osobinom da degradira na temperaturama iznad 120 °C [32].

Što se tiče bifentrina, kada se dobijeni rezultati postignutih nivoa degradacije nakon sterilizacije od maksimalno ~18 % uporede sa predhodno pomenutim prinosima metode za određivanje koncentracije rezidua ovog pesticida (82,1-83,1 %), može se ustanoviti da do degradacije bifentrina praktično i ne dolazi, s obzirom da je količina ekstrahovanog bifentrina iz pšeničnog supstrata nakon sterilizacije na istom nivou sa količinom ekstrahovanog bifentrina iz pšenice pre sterilizacije. U toku

fizičko-hemijskih procesa indukovanih povećanjem temperature u sistemu, voda koja se nalazi u supstratu može lako da doprinese kodestilaciji molekula pesticida dok toplota uzrokuje njihovo isparavanje i degradaciju [74]. Bifentrin ima izrazito nizak napon pare tako da mu je isparljivost veoma mala, pri čemu mu je i rastvorljivost u vodi na izuzetno niskom nivou, i shodno tome kombinacija ovih osobina daje mu jaku sposobnost vezivanja za čvrste materijale u korelaciji sa slabom sposobnošću isparavanja iz vlažnog supstrata. Ovo je verovatno jedan od razloga što je bifentrin, za razliku od druga dva testirana pesticida, izrazito stabilan u toku sterilizacije.

Sumirajući rezultate može se doći do zaključka da se sterilizacija, tj. izlaganje temperaturi od 121 °C pod pritiskom od 103 kPa u trajanju od 15 min, kao sredstvo za redukciju potencijalne kontaminacije pšenice sa ispitivanim pesticidima iznad njihovih MDK vrednosti, može veoma efikasno koristiti u slučaju kontaminacije hlorpirifos-metilom, umereno u slučaju kontaminacije sa pirimifos-metilom, dok je praktično neefikasna u slučaju kontaminacije sa bifentrinom.

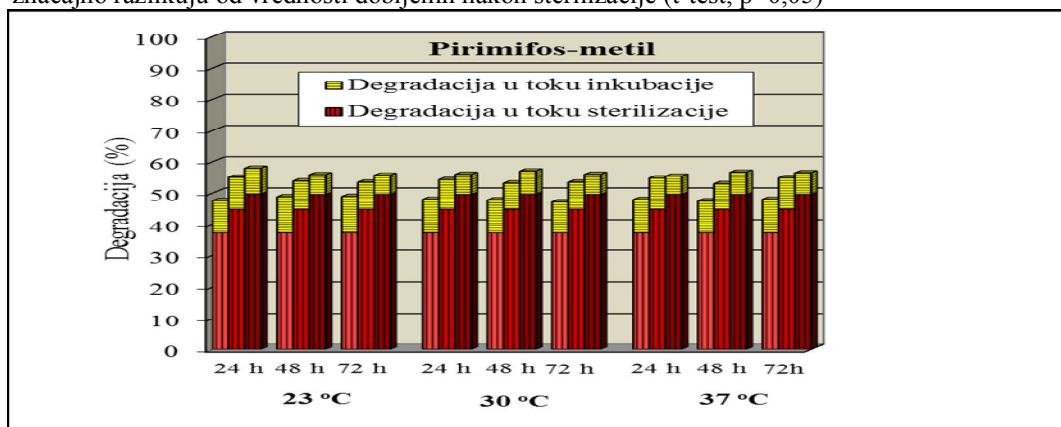
Nakon ispitivanja uticaja sterilizacije na degradaciju pirimifos-metila, hlorpirifos-metila i bifentrina, određivanjem ostataka ispitivanih pesticida u uzorcima pšeničnog supstrata bez mikroorganizama inkubiranog u datim vremenskim intervalima (24, 48 i 72 h) na određenim temperaturama (23, 30 i 37 °C), ispitivano je eventualno postojanje spontane degradacije ovih pesticida u toku inkubacije. Rezultati su prikazani, u **tabelama 19.1.2., 19.1.3. i 19.1.4.** i na **grafikonima 19.1.2., 19.1.3. i 19.1.4.**, i poređeni su sa rezultatima ispitivanja degradacije pesticida pod uticajem sterilizacije (*Tabela 19.1.1.*)

Uočava se da u toku inkubacije dolazi do dodatne degradacije pirimifos-metila u proseku za ~10 %, pri čemu je statistička značajnost povećanja degradacije zabeležena kod svega nekoliko uzoraka (**tabela 19.1.2.**). Razlike u degradacijama pri različitim inkubacionim parametrima takođe nisu statistički značajne, što nije neočekivano s obzirom na utvrđenu perzistentnost insekticida (naročito pirimifos-metila) u toku znatno dužeg perioda skladištenja žitarica [67,79,80]. Umerena degradacija zabeležena u ovom eksperimentu može biti uzrokovana nešto višim temperaturnim uslovima i povećanoj vlažnosti, imajući u vidu da se napon pare ovog pesticida značajno povećava sa povećanjem temperature.

Tabela 19.1.2. Degradacija pirimifos-metila u toku inkubacije

Ca.m.* (mg/kg)	Temperatura inkubacije (°C)	Dužina inkubacije (h)	Preostala Ca.m. (mg/kg)	Stepen degradacije (%) [#]
5,19±0,21	23	24	2,71±0,50	47,6±9,9
25,11±0,05			11,29±0,40	55,0±1,5 ^S
75,45±0,18			31,77±3,61	57,9±4,7
5,19±0,21		48	2,66±0,03	48,8±2,5 ^S
25,12±0,02			11,60±2,29	53,8±9,1
75,34±0,18			33,27±3,08	55,8±4,1
5,19±0,21		72	2,65±0,07	48,9±0,9 ^S
25,10±0,04			11,71±1,36	53,4±5,5
75,32±0,23			33,44±5,94	55,6±7,8
5,19±0,20	30	24	2,70±0,33	48,0±6,2
25,35±0,29			11,62±1,56	54,2±6,4
75,42±0,20			33,24±5,90	55,9±7,7
5,18±0,20		48	2,71±0,19	47,8±2,4 ^S
25,36±0,27			11,90±1,47	53,1±6,0
75,45±0,15			32,46±4,14	57,0±5,4
5,18±0,20		72	2,73±0,18	47,2±2,8 ^S
25,34±0,29			11,80±1,01	53,4±4,5
75,37±0,11			33,24±4,92	55,9±6,5
5,19±0,20	37	24	2,71±0,28	47,9±4,0 ^S
25,35±0,28			11,49±0,41	54,7±2,0 ^S
75,43±0,05			33,74±5,95	55,3±7,9
5,19±0,20		48	2,73±0,29	47,5±4,0 ^S
25,34±0,27			11,94±0,78	52,9±3,4
75,49±0,16			32,76±2,87	56,6±3,7
5,19±0,21		37	2,70±0,53	48,0±9,2
25,32±0,28			11,44±1,06	54,8±4,4
75,43±0,09			32,89±3,80	56,4±5,0

* Ca.m. – primenjena koncentracija aktivne materije; [#] izražene vrednosti predstavljaju ukupnu degradaciju (degradacija nakon sterilizacije+ degradacija nakon inkubacije); ^S vrednosti se statistički značajno razlikuju od vrednosti dobijenih nakon sterilizacije (t-test, p=0,05)



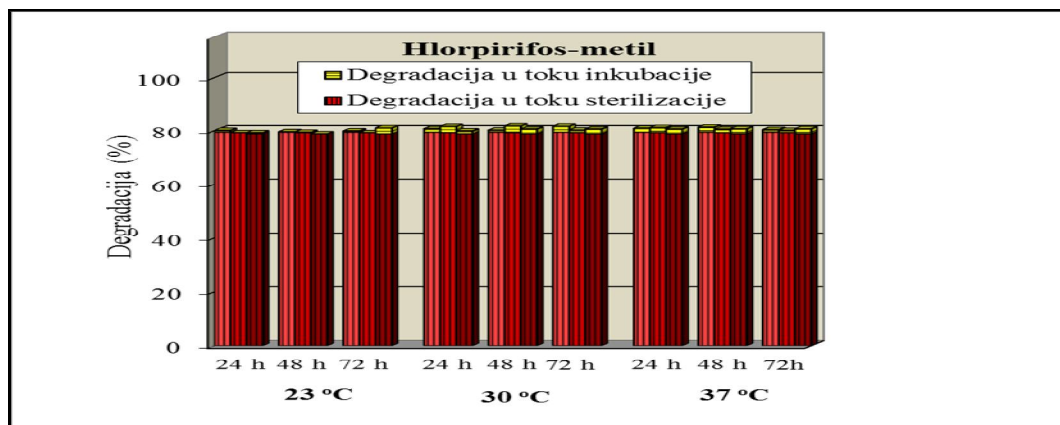
Grafikon 19.1.2. Degradacija pirimifos-metila nakon inkubacije

Što se tiče spontane degradacije hlörpirifos-metila u toku inkubacije na datim temperaturama u određenom vremenskom intervalu upoređujući dobijene rezultate prezentovane u **tabeli 19.1.3.** sa rezultatima ispitivanja njegove degradacije pod uticajem sterilizacije (*Tabela 19.1.1.*) uočava se da, pod ispitivanim uslovima inkubacije, do dodatne degradacije pesticida praktično ne dolazi, s obzirom da je maksimalno povećanje degradacije ispod nivoa statističke greške (1,5 %), a razlike u degradacijama pri različitim inkubacionim parametrima takođe nisu statistički značajno izražene.

Tabela 19.1.3. Degradacija hlörpirifos-metila nakon inkubacije

C_{a.m.}* (mg/kg)	Temperatura inkubacije (°C)	Dužina inkubacije (h)	Preostala C_{a.m.} (mg/kg)	Stepen degradacije (%)[#]
3,06±0,04	23	24	0,61±0,05	80,1±1,7
15,39±0,49			3,35±1,01	78,2±6,3
45,23±0,03			9,42±2,05	79,2±4,5
3,06±0,05		48	0,62±0,04	79,6±1,0
15,40±0,48			3,17±0,76	79,4±4,9
45,16±0,05			9,62±2,48	78,7±5,5
3,06±0,05		72	0,62±0,11	79,9±3,5
15,39±0,49			3,23±0,68	79,0±4,1
45,15±0,08			8,54±1,14	81,0±2,5
3,04±0,07	30	24	0,59±0,05	80,7±1,7
15,40±0,49			2,86±0,87	81,5±5,2
45,21±0,06			8,51±2,15	79,9±4,7
3,04±0,06		48	0,60±0,18	80,2±6,0
15,41±0,47			2,83±0,77	81,7±4,4
45,19±0,06			9,08±0,44	80,6±0,9
3,04±0,06		72	0,56±0,06	81,6±2,1
15,40±0,49			3,04±0,82	80,2±5,2
45,19±0,03			8,78±1,00	80,6±2,2
3,06±0,04	37	24	0,59±0,13	80,9±4,1
15,41±0,48			2,93±0,89	81,1±5,2
45,18±0,03			8,48±2,21	80,9±4,9
3,06±0,04		48	0,27±0,05	81,3±1,5
15,40±0,48			3,01±0,68	80,5±4,2
45,22±0,06			8,61±1,52	80,7±3,4
3,06±0,04		37	0,60±0,18	80,4±6,0
15,39±0,48			3,07±0,84	80,1±5,1
45,19±0,04			8,73±1,63	80,7±3,6

* C_{a.m.} – primenjena koncentracija aktivne materije; [#] izražene vrednosti predstavljaju ukupnu degradaciju (degradacija nakon sterilizacije+ degradacija nakon inkubacije)



Grafikon 19.1.3. Degradacija hlorpirifos-metila nakon inkubacije

Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa ranije utvrđenom veoma izraženom stabilnošću hlorpirifos-metila nakon tretmana žitarica u skladištima. Vreme poluraspada ovog insekticida pri temperaturi od 30 °C već u prvim istraživanjima procenjeno je na 4-5 meseci [195,196], a novije studije potvrđuju veliku stabilnost hlorpirifos-metila u skladišnim uslovima pri ambijentalnoj temperaturi i umerenoj vlažnosti [197], sa nešto kraćim vremenom poluraspada od 2 meseca pri povećanoj vlažnosti na temperaturi od 30 °C [198]

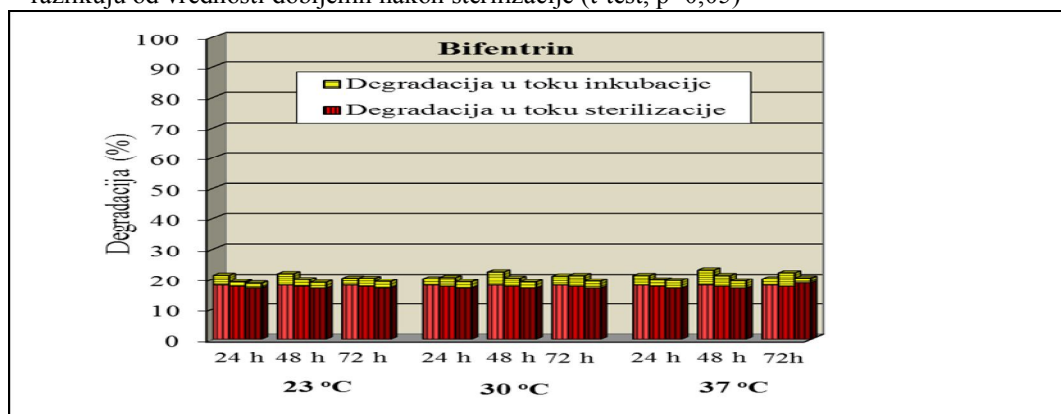
Rezultati ispitivanja spontane degradacije bifentrina u toku inkubacije bez prisustva mikroorganizama prikazani su u **tabeli 19.1.4.** i na **grafikonu 19.1.4.** Kada se rezultati uporede sa rezultatima ispitivanja njegove degradacije pod uticajem sterilizacije (*Tabela 19.1.1.*), uočava se da ovaj insekticid kao što nije podložan degradaciji pod uslovima sterilizacije, tako nije podložan ni degradaciji u toku inkubacije na 23, 30 i 37 °C u trajanju od 24, 48 i 72 h. Naime, nizak nivo degradacije u toku sterilizacije, koji je, kao što je ranije pomenuto, bio na nivou greške uzrokovane prinosom metode manjim od 100 %, zadržao se i nakon inkubacije pod ispitivanim uslovima, sa razlikom od svega ~3 %, pri čemu je, statistički gledano, povećanje stepena degradacije značajno kod samo tri uzorka obogaćena pesticidom do 0,5 i 2,5 mg/kg.

Ovakvi rezultati nisu iznenađujući s obzirom da se bifentrin ne apsorbuje od strane biljaka niti je utvrđena njegova translokacija kroz biljke, a poznato je da ne metaboliše u biljkama i da je veoma stabilan, sa količinom ostataka na kraju skladištenja žitarica na 20 i 25 °C u principu istom kao i na početku, tj. neposredno nakon primene [199].

Tabela 19.1.4. Degradacija bifentrina nakon inkubacije

C _{a.m.} * (mg/kg)	Temperatura inkubacije (°C)	Dužina inkubacije (h)	Preostala C _{a.m.} (mg/kg)	Stepen degradacije (%) [#]
0,51±0,01	23	24	0,40±0,01	21,3±0,7 ^s
2,58±0,06			2,09±0,06	19,1±0,8
7,69±0,09			6,26±0,26	18,6±3,0
0,51±0,01		48	0,40±0,01	21,8±3,5
2,59±0,06			2,07±0,09	19,8±2,9
7,68±0,09			6,23±0,19	18,9±1,6
0,51±0,01		72	0,41±0,01	20,3±0,2 ^s
2,58±0,07			2,06±0,10	20,2±3,3
7,68±0,09			6,21±0,17	19,2±1,5
0,51±0,01	30	24	0,41±0,01	20,1±0,9
2,59±0,06			2,06±0,09	20,5±2,6
7,69±0,09			6,22±0,34	19,1±3,8
0,52±0,01		48	0,40±0,01	22,4±2,2
2,57±0,06			2,05±0,06	20,3±1,0 ^s
7,68±0,09			6,22±0,23	19,0±2,2
0,52±0,01		72	0,41±0,02	21,0±1,8
2,59±0,06			2,04±0,15	21,2±4,9
7,68±0,10			6,20±0,33	19,3±3,7
0,52±0,01	37	24	0,41±0,02	21,2±2,4
2,59±0,06			2,08±0,12	19,7±3,9
7,67±0,08			6,17±0,28	19,5±3,0
0,52±0,01		48	0,40±0,01	23,0±3,8
2,58±0,06			2,04±0,09	21,2±2,3
7,69±0,09			6,20±0,22	19,4±2,0
0,52±0,01		72	0,41±0,02	20,1±3,4
2,58±0,06			2,01±0,15	22,1±4,6
7,68±0,10			6,25±0,19	18,7±1,8

* Ca.m. – koncentracija aktivne materije; [#] izražene vrednosti predstavljaju ukupnu degradaciju (degradacija nakon sterilizacije+ degradacija nakon inkubacije); ^s vrednosti se statistički značajno razlikuju od vrednosti dobijenih nakon sterilizacije (t-test, p=0,05)



Grafikon 19.1.4. Degradacija bifentrina nakon inkubacije

Generalno, kada se posmatraju rezultati degradacija ispitivanih pesticida nakon sterilizacije i dalje u toku inkubacije, može da se konstatuje da pre inokulacije korišćenih mikroorganizama u pšenični supstrat i započinjanja fermentacije dolazi do značajne redukcije ostataka pirimifos-metila do približno 50, 55 i 57 % za uzorke obogaćene sa 5, 25 i 75 mg/kg, hlörpirifos-metil degradira na veoma visokom nivou do približno 82 % za sve tri primenjene koncentracije, dok do redukcije ostataka bifentrina praktično i ne dolazi, s obzirom da se dobijeni maksimalni nivo degradacije od 23 % statistički značajno ne razlikuje od dobijenog prosečnog prinosa metode koja se koristi za kvantifikaciju bifentrina u uzorcima.

19.2. ISPITIVANJE UTICAJA FERMENTACIJE PŠENIČNOG SUPSTRATA NA DEGRADACIJU PESTICIDA UZ OPTIMIZACIJU USLOVA FERMENTACIJE U CILJU POSTIZANJA MAKSIMALNOG STEPENA DEGRADACIJE

U okviru ispitivanja uticaja različitih fermentacionih parametara mlečnokiselinske i kvasne fermentacije pšenice na stepen degradacije pirimifos-metila, hlörpirifos-metila i bifentrina (pri koncentracijama MDK, 5xMDK i 15xMDK), nakon utvrđivanja uticaja sterilizacije i uslova inkubacije na degradaciju, eksperiment je postavljen po Box-Behnken dizajnu sa određivanjem ostataka ispitivanih pesticida u uzorcima kao osnovnim odzivom, u cilju utvrđivanja uticaja fermentacije na smanjenje nivoa ostataka pesticida u supstratu.

19.2.1. ISPITIVANJE UTICAJA FERMENTACIJE PŠENIČNOG SUPSTRATA SA *LACTOBACILLUS PLANTARUM* NA DEGRADACIJU PESTICIDA

Rezultati ispitivanja uticaja fermentacionih parametara na degradaciju pirimifos-metila koncentracije 5 mg/kg prikazani u **tabeli 19.2.1.1.** ukazuju da degradacija pirimifos-metila pod uticajem mlečnokiselinske fermentacije sa *L. plantarum* dostiže do nivoa redukcije od maksimum 82 % u slučaju kontaminacije na nivou MDK.

Tabela 19.2.1.1. Uticaj mlečnokiselinske fermentacije pšeničnog supstrata na degradaciju pirimifos-metila aplikovanog u koncentraciji na nivou MDK

Početna Ca.m. * (mg/kg)	A	B	C	Preostala Ca.m. (mg/kg)	Stepen degradacije (%) [#]
5,37±0,01	6	0	-	3,20±0,04	40,5±0,7 ^d
5,37±0,01	8	0	-	3,23±0,08	40,0±1,4 ^e
5,37±0,01	10	0	-	3,13±0,08	41,7±1,5 ^f
5,35±0,03	10	72	30	1,77±0,06	67,0±1,1 ^F
5,35±0,01	10	24	30	2,12±0,07	60,4±1,4 ^F
5,37±0,01	6	72	30	1,63±0,05	69,6±0,9 ^D
5,37±0,01	6	24	30	2,15±0,05	60,0±1,4 ^D
5,36±0,01	10	48	37	1,20±0,01	77,5±0,0 ^F
5,36±0,02	10	48	23	1,13±0,08	79,0±1,5 ^F
5,36±0,01	6	48	37	1,64±0,04	69,5±0,8 ^D
5,36±0,02	6	48	23	1,59±0,08	70,3±1,4 ^D
5,36±0,01	8	72	37	1,27±0,05	76,4±0,9 ^E
5,36±0,00	8	72	23	1,34±0,06	74,9±1,1 ^E
5,37±0,01	8	24	37	2,34±0,05	56,5±0,9 ^E
5,36±0,01	8	24	23	2,34±0,04	56,3±0,7 ^E
5,38±0,00	8	48	30	0,97±0,05	82,0±0,9 ^E
5,36±0,02	8	48	30	1,14±0,04	78,7±0,8 ^E
5,36±0,01	8	48	30	1,12±0,05	79,1±0,9 ^E

A–veličina inokuluma (%); B–dužina fermentacije (h); C–temperatura (°C)

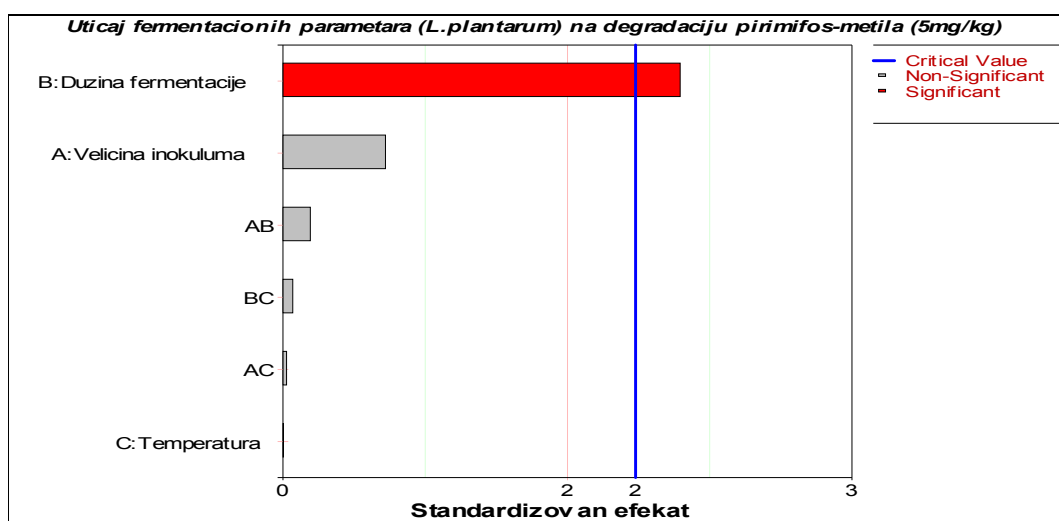
*Ca.m.–koncentracija aktivne materije; [#]izražene vrednosti predstavljaju ukupnu degradaciju; vrednosti obeležene velikim slovima značajno se razlikuju od kontrole sa adekvatnom veličinom inokuluma (t test, p=0,05)

Kada se dobijeni rezultati uporede sa koncentracijama pirimifos-metila ekstrahovanog iz uzoraka odmah nakon inokulacije (kod kojih je količina pesticida usled sterilizacije već redukovana na nivou od ~37 % – tabela 19.1.1.) uočava se da je degradacija pesticida koja se postiže pri svim fermentacionim parametrima statistički značajno veća. Uzimajući u obzir i degradaciju od maksimum 10 % do koje dolazi spontano, bez prisustva *L. plantarum*, pri ovim eksperimentalnim uslovima (Tabela 19.1.2.), može se zaključiti da sâm *L. plantarum* prouzrokuje maksimum ~27 % redukcije pirimifos-metila aplikovanog na pšenicu u MDK koncentraciji (5 mg/kg).

Kako bi se odredilo da li promene nivoa nezavisno promenljivih faktora dovode do promena u degradaciji, po ugledu na obradu podataka iz optimizacije uslova fermentacija (Odeljak 15), i ovde su definisane značajnosti uticaja pojedinačnih fermentacionih parametara na stepen degradacije, a zatim je urađena i

optimizacija ispitivanih fermentacionih parametara u pravcu postizanja najvećeg stepena degradacije pirimifos metila.

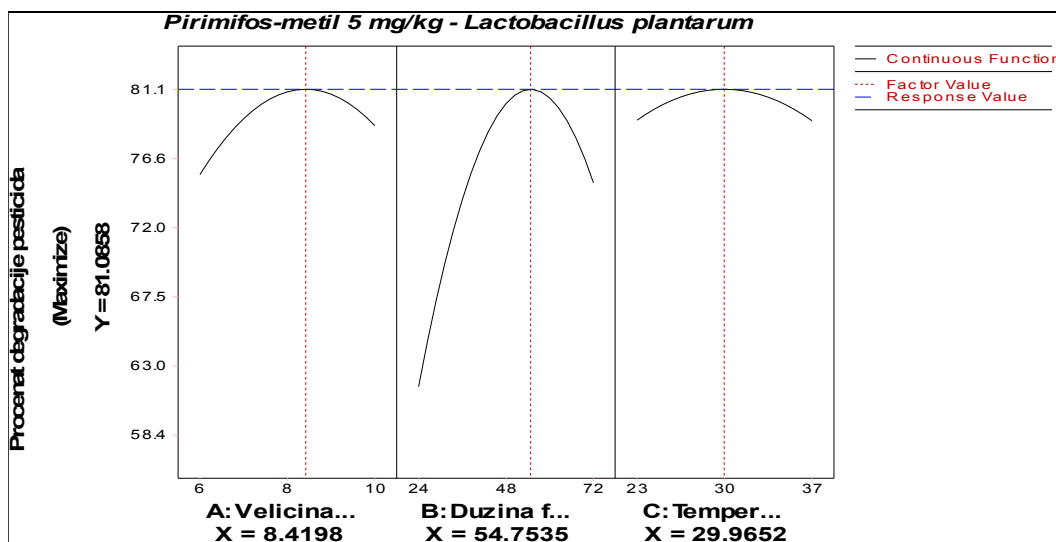
Značajnosti efekata pojedinačnih faktora kao i njihovih interakcija za degradaciju date su Pareto grafikonom (**Grafikon 19.2.1.1.**), sa dužinama bara proporcionalnim standardizovanim efektima, faktorima poređanim po opadajućem apsolutnom efektu, i plavom vertikalnom linijom kao granicom koju prelaze statistički značajni efekti, u odabranom intervalu poverenja od 90% ($\alpha=0.1$).



Grafikon 19.2.1.1. Pareto grafikon značajnosti uticaja fermentacionih parametara na degradaciju pirimifos-metila (MDK) pri fermentaciji sa *L. plantarum*

Prezentovani podaci ukazuju na to da na stepen degradacije pirimifos-metila aplikovanog u koncentraciji od 5 mg/kg, pri fermentaciji pšenice sa *L. plantarum*, značajno utiče samo dužina trajanja mlečnokiselinske fermentacije dok veličina inokuluma, a još manje temperatura inkubacije, nemaju efekta na ovaj odziv.

Rezultati optimizacije ispitivanih fermentacionih parametara u cilju određivanja njihovih optimalnih nivoa pri kojima se postiže maksimalni stepen degradacije pirimifos-metila (MDK) prikazani su na **grafikonu 19.2.1.2.** Sa prikazanog grafikona može se videti da se maksimalna redukcija pirimifos-metila od 81,1 % dostiže nakon 55 sati fermentacije sa *L. plantarum* pri temperaturi od 30 °C i uz inokulaciju na nivou od ~8% (v/w).



Grafikon 19.2.1.2. Optimizacija mlečnokiselinske fermentacije u pravcu postizanja najvećeg stepena degradacije pirimifos-metila koncentracije 5 mg/kg

Rezultati ispitivanja uticaja fermentacionih parametara na degradaciju pirimifos-metila koncentracije 25 mg/kg prikazani su u **tabeli 19.2.1.2.**

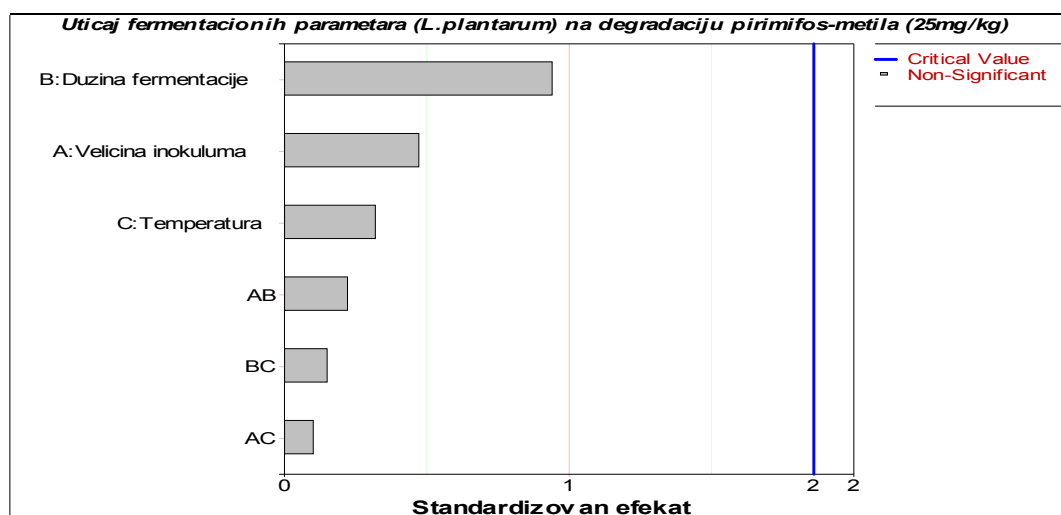
Tabela 19.2.1.2. Uticaj mlečnokiselinske fermentacije pšeničnog supstrata na degradaciju pirimifos-metila aplikovanog u koncentraciji na nivou 5xMDK

Početna Ca.m. * (mg/kg)	A	B	C	Preostala Ca.m. (mg/kg)	Stepen degradacije (%) [#]
25,59±0,01	6	0	-	13,78±0,33	46,2±1,3 ^d
25,60±0,01	8	0	-	13,78±0,26	46,2±1,0 ^c
25,58±0,01	10	0	-	13,95±0,23	45,5±0,9 ^f
25,59±0,01	10	72	30	6,91±0,01	73,0±0,0 ^F
25,58±0,01	10	24	30	7,39±0,13	71,1±0,5 ^F
25,58±0,03	6	72	30	8,44±0,33	67,0±1,3 ^D
25,59±0,01	6	24	30	7,92±0,31	69,0±1,2 ^D
25,57±0,02	10	48	37	8,14±0,20	68,2±0,8 ^F
25,15±0,00	10	48	23	9,44±0,23	62,5±0,9 ^F
25,60±0,00	6	48	37	8,81±0,23	65,6±0,9 ^D
25,13±0,00	6	48	23	9,60±0,33	61,8±1,3 ^D
25,60±0,00	8	72	37	7,57±0,36	70,4±1,4 ^E
25,14±0,01	8	72	23	7,56±0,34	69,9±1,2 ^E
25,58±0,01	8	24	37	10,80±0,15	57,8±0,6 ^E
25,13±0,02	8	24	23	10,05±0,30	60,0±1,2 ^E
25,58±0,01	8	48	30	5,13±0,23	80,0±0,9 ^E
25,59±0,01	8	48	30	5,43±0,33	78,8±1,3 ^E
25,59±0,01	8	48	30	5,53±0,38	78,4±1,5 ^E

A—veličina inokuluma (%); B—dužina fermentacije (h); C—temperatura (°C); *Ca.m.—koncentracija aktivne materije; [#]izražene vrednosti predstavljaju ukupnu degradaciju; vrednosti obeležene velikim slovima značajno se razlikuju od kontrole sa adekvatnom veličinom inokuluma (t test, p=0,05)

Prezentovani rezultati ukazuju da, u slučaju kontaminacije na nivou 5xMDK, degradacija pirimifos-metila pod uticajem fermentacije sa *L. plantarum* dostiže nivo redukcije od maksimum 80 %, pri čemu je degradacija pri svim fermentacionim parametrima statistički značajno veća od redukcije nakon sterilizacije (~45 % – *tabela 19.1.1.*) (uzorci ispitivani na degradaciju odmah nakon inokulacije). Uzimajući u obzir i spontanu degradaciju pri ovim eksperimentalnim uslovima (maksimum 10 % – *tabela 19.1.2.*), može se zaključiti da sâm *L. plantarum* prouzrokuje maksimum ~25 % redukcije pirimifos-metila aplikovanog na pšenicu u 5xMDK koncentraciji (25 mg/kg).

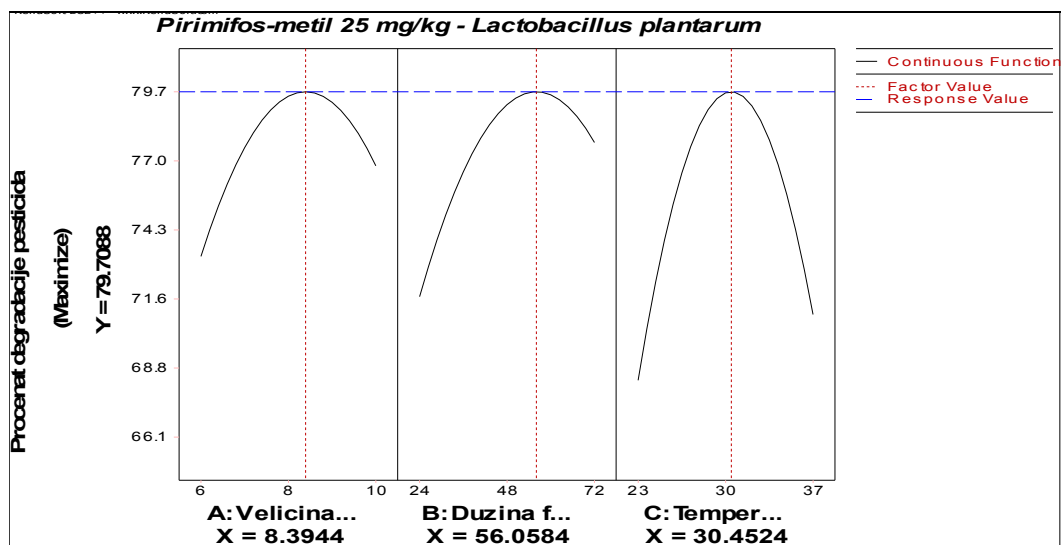
Značajnosti efekata pojedinačnih faktora i njihovih interakcija za degradaciju pirimifos-metila na ovom koncentracionom nivou (5xMDK) prikazane su na **grafikonu 19.2.1.3.**



Grafikon 19.2.1.3. Pareto grafikon značajnosti uticaja fermentacionih parametara na degradaciju pirimifos-metila (5xMDK) pri fermentaciji sa *L. plantarum*

Dobijeni rezultati prezentovani na **grafikonu 19.2.1.3.** ukazuju na to da, pri fermentaciji pšenice sa *L. plantarum*, variranje ni jednog od fermentacionih parametara u ispitivanom opsegu ne utiče značajno na stepen degradacije pirimifos-metila aplikovanog u koncentraciji od 25 mg/kg.

Rezultati optimizacije ispitivanih fermentacionih parametara mlečnokiselinske fermentacije u cilju određivanja njihovih optimalnih nivoa pri kojima se dostiže maksimalan nivo degradacije pirimifos-metila nakon aplikacije 25 mg pesticida po kg pšenice, prikazani su na **grafikonu 19.2.1.4.**



Grafikon 19.2.1.4. Optimizacija mlečnokiselinske fermentacije u pravcu postizanja najvećeg stepena degradacije pirimifos-metila koncentracije 25 mg/kg

Sa prikazanog grafikona može se videti da se, nakon aplikacije 25 mg pirimifos-metila po kg pšenice, dostiže maksimalna redukcija pesticida od 79,7 % nakon 56 sati fermentacije sa *L. plantarum* pri temperaturi od ~30 °C i uz inokulaciju na nivou od ~8% (v/w). Procenat degradacije pri ovoj koncentraciji fortifikacije je neznatno niži u poređenju sa predhodnim, dok su optimalni fermentacioni parametri potrebni za postizanje maksimalne degradacije praktično na istim nivoima.

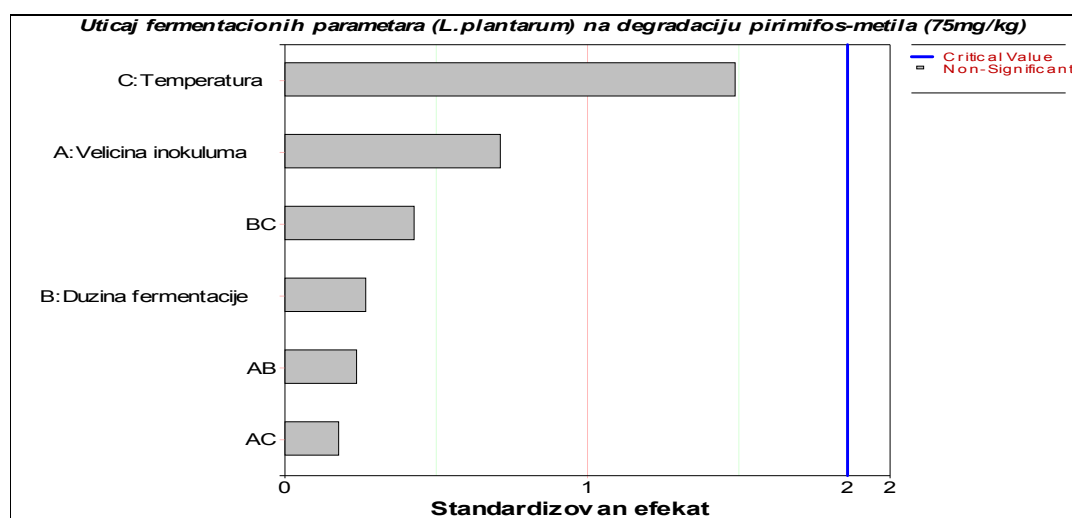
Rezultati ispitivanja uticaja fermentacionih parametara na degradaciju pirimifos-metila koncentracije 75 mg/kg prikazani u tabeli 19.2.1.3. ukazuju da u slučaju kontaminacije na nivou 15xMDK degradacija pirimifos-metila pod uticajem mlečnokiselinske fermentacije dostiže max 71,1 % redukcije, pri čemu se, kada se dobijeni rezultati uporede sa kontrolnim uzorcima pre inokulacije (kod kojih je količina pesticida zbog sterilizacije već redukovana do ~50 % – tabela 19.1.1.) uočava da je degradacija postignuta pri svim fermentacionim parametrima statistički značajno veća. Uračunavajući i degradaciju od max 10 % do koje dolazi spontano pri ovim eksperimentalnim uslovima (Tabela 19.1.2.), može se zaključiti da sâm *L. plantarum* prouzrokuje tek najviše ~10 % redukcije pirimifos-metila aplikovanog na pšenicu u 15 puta većoj koncentraciji od maksimalno dozvoljene (75 mg/kg).

Tabela 19.2.1.3. Uticaj mlečnokiselinske fermentacije pšeničnog supstrata na degradaciju pirimifos-metila aplikovanog u koncentraciji na nivou 15xMDK

Početna Ca.m. * (mg/kg)	A	B	C	Preostala Ca.m. (mg/kg)	Stepen degradacije (%) [#]
75,43±0,02	6	0	-	38,11±0,59	49,5±0,8 ^d
75,41±0,05	8	0	-	37,81±1,12	49,9±1,2 ^e
75,40±0,06	10	0	-	37,19±1,89	50,7±1,5 ^f
75,31±0,02	10	72	30	25,81±1,13	65,7±1,5 ^F
75,30±0,04	10	24	30	27,01±0,83	64,1±1,1 ^F
75,25±0,04	6	72	30	27,95±1,02	62,9±1,4 ^D
75,27±0,02	6	24	30	27,82±0,40	63,0±0,5 ^D
75,41±0,05	10	48	37	24,11±0,42	68,0±0,6 ^F
75,19±0,03	10	48	23	25,75±0,67	65,8±0,9 ^F
75,42±0,03	6	48	37	24,83±0,60	67,1±0,8 ^D
75,21±0,05	6	48	23	27,37±1,08	63,6±1,4 ^D
75,44±0,02	8	72	37	25,48±1,13	66,2±1,5 ^E
75,31±0,01	8	72	23	29,93±0,75	60,3±1,0 ^E
75,42±0,04	8	24	37	25,04±0,68	66,8±0,9 ^E
75,24±0,00	8	24	23	27,14±0,75	63,9±1,0 ^E
75,33±0,01	8	48	30	23,45±0,53	68,9±0,7 ^E
75,26±0,05	8	48	30	21,81±0,45	71,0±0,6 ^E
75,26±0,07	8	48	30	21,75±0,45	71,1±0,6 ^E

A–veličina inokuluma (%); B–dužina fermentacije (h); C–temperatura (°C); *Ca.m.–koncentracija aktivne materije; [#]izražene vrednosti predstavljaju ukupnu degradaciju; vrednosti obeležene velikim slovima značajno se razlikuju od kontrole sa adekvatnom veličinom inokuluma (t test, p=0,05)

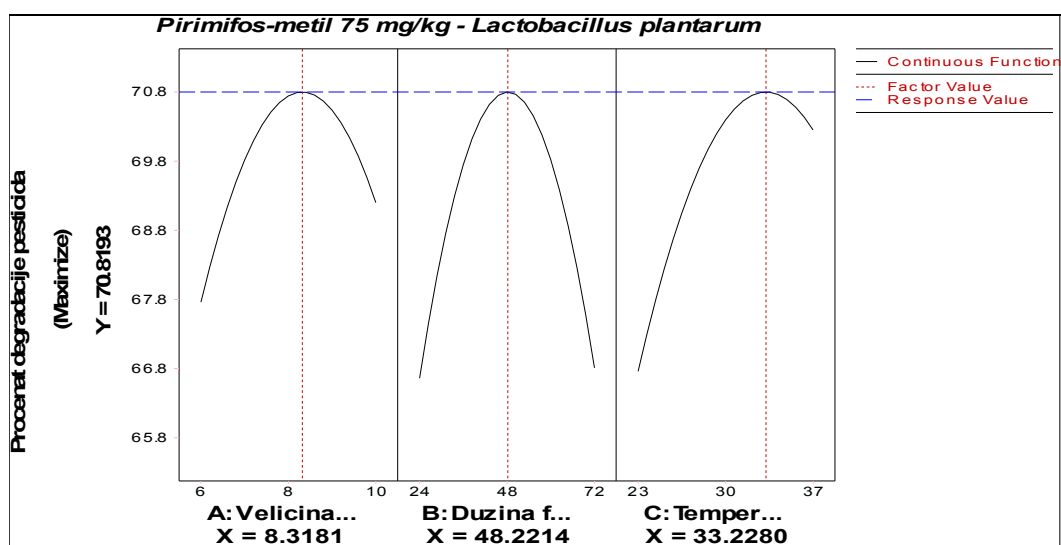
Značajnosti efekata pojedinačnih faktora i njihovih interakcija za degradaciju pirimifos-metila na ovom koncentracionom nivou (15xMDK) prikazane su na grafikonu 19.2.1.5.



Grafikon 19.2.1.5. Pareto grafikon značajnosti uticaja fermentacionih parametara na degradaciju pirimifos-metila (15xMDK) pri fermentaciji sa *L. plantarum*

Prezentovani rezultati sa **grafikona 19.2.1.5.** ukazuju na to da, pri fermentaciji pšenice sa *L. plantarum*, variranje ni jednog od fermentacionih parametara u ispitivanom opsegu ne utiče značajno na stepen degradacije pirimifos-metila aplikovanog u koncentraciji od 75 mg/kg.

Rezultati optimizacije ispitivanih fermentacionih parametara mlečnokiselinske fermentacije u cilju određivanja njihovih optimalnih nivoa pri kojima se dostiže maksimalan nivo degradacije pirimifos-metila nakon aplikacije 75 mg pesticida po kg pšenice, prikazani su na **grafikonu 19.2.1.6.**



Grafikon 19.2.1.6. Optimizacija mlečnokiselinske fermentacije u pravcu postizanja najvećeg stepena degradacije pirimifos-metila koncentracije 75 mg/kg (15xMDK)

Sa prikazanog grafikona može se videti da se, nakon aplikacije 75 mg pirimifos-metila po kg pšenice, dostiže maksimalna redukcija pesticida od 70,8 % već nakon 48 sati fermentacije sa *L. plantarum* pri temperaturi od 33 °C i uz inokulaciju na nivou od ~8% (v/w). Procenat degradacije pri ovoj koncentraciji je dosta niži u poređenju sa predhodnima, pri čemu je i optimalna dužina fermentacije kraća, dok je optimalna temperatura neznatno veća.

Iz svega navedenog, može se zaključiti da *L. plantarum* utiče na redukciju pirimifos-metila u pšeničnom supstratu na nivou od 10-27 %, pri čemu je ovaj efekat najizraženiji u slučaju najmanje koncentracije pesticida, a najmanje izražen u prisustvu najveće primenjene koncentracije, što je u korelaciji sa ranije prezentovanim rezultatima o postojanju inhibicije rasta *L. plantarum* pri većim

kontaminacijama pesticidom (Tabela 16.1.1.). Poznato je da je pirimifos-metil jedinjenje čija je hidrolitička degradacija pH-zavisna, pri čemu se ubrzava sa smanjenjem pH [32], tako da se može pretpostaviti da je razlog značajne redukcije ovog pesticida upravo povećavanje kiselosti sredine usled aktivnosti laktobacila. Međutim, imajući u vidu da je u toku istraživanja utvrđeno da prisustvo pirimifos-metila, iako u većim koncentracijama dovodi do smanjenja brojnosti ćelija *L. plantarum*, ipak ne utiče negativno na smanjenje pH vrednosti (Grafikon 17.1.1.), verovatnije je da je degradacija ovog pesticida u toku mlečnokiselinske fermentacije prouzrokovana enzimatskom aktivnošću ove bakterije [206], tj. predstavlja biološku degradaciju.

Rezultati ispitivanja uticaja fermentacionih parametara na degradaciju hlorpirifos-metila koncentracije 3 mg/kg prikazani su u tabeli 19.2.1.4.

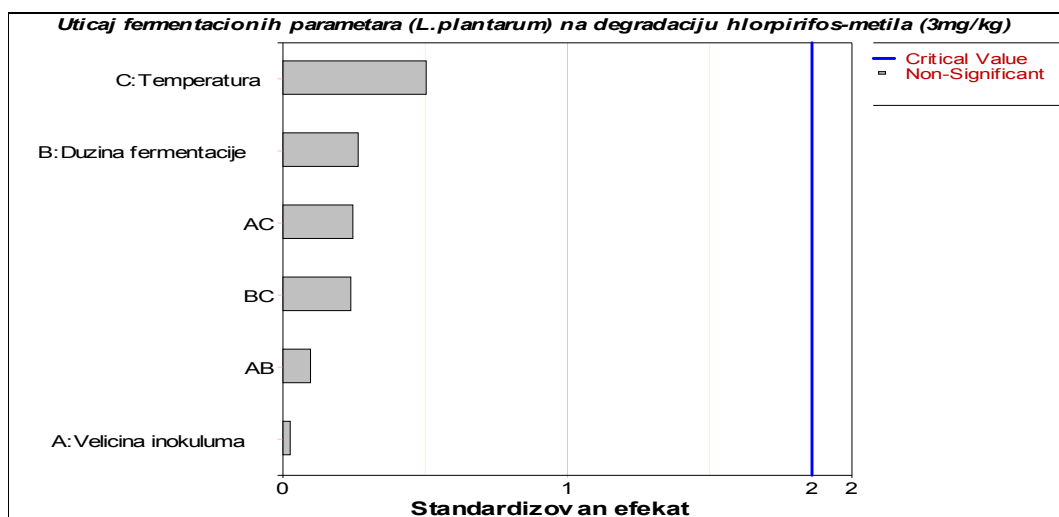
Tabela 19.2.1.4. Uticaj mlečnokiselinske fermentacije pšeničnog supstrata na degradaciju hlorpirifos-metila aplikovanog u koncentraciji na nivou MDK

Početna Ca.m. * (mg/kg)	A	B	C	Preostala Ca.m. (mg/kg)	Stepen degradacije (%) [#]
2,99±0,00	6	0	-	0,61±0,04	79,6±1,4 ^d
2,99±0,00	8	0	-	0,64±0,04	78,5±1,2 ^e
2,99±0,00	10	0	-	0,61±0,03	79,7±0,9 ^f
2,98±0,00	10	72	30	0,36±0,04	88,0±1,2 ^F
2,99±0,00	10	24	30	0,27±0,02	90,9±0,6 ^F
2,99±0,00	6	72	30	0,33±0,04	88,8±1,5 ^D
2,99±0,00	6	24	30	0,29±0,02	90,3±0,8 ^D
3,10±0,00	10	48	37	0,55±0,04	82,5±1,5 ^f
3,10±0,00	10	48	23	0,54±0,05	82,5±1,5 ^f
3,10±0,00	6	48	37	0,59±0,04	81,1±1,3 ^d
3,10±0,00	6	48	23	0,48±0,02	84,4±0,6 ^D
3,10±0,00	8	72	37	0,53±0,03	82,8±1,1 ^e
3,10±0,00	8	72	23	0,41±0,02	86,8±0,7 ^E
3,10±0,00	8	24	37	0,65±0,03	79,1±1,2 ^e
3,10±0,00	8	24	23	0,60±0,03	80,5±1,2 ^e
2,98±0,00	8	48	30	0,21±0,02	92,8±0,6 ^E
2,99±0,00	8	48	30	0,20±0,02	93,3±0,7 ^E
2,99±0,00	8	48	30	0,21±0,03	93,0±0,9 ^E

A—veličina inokuluma (%); B—dužina fermentacije (h); C—temperatura (°C); *Ca.m.—koncentracija aktivne materije; [#]izražene vrednosti predstavljaju ukupnu degradaciju; vrednosti obeležene velikim slovima značajno se razlikuju od kontrole sa adekvatnom veličinom inokuluma (t test, p=0,05)

Dobijeni rezultati ispitivanja uticaja veličine inokuluma, dužine trajanja fermentacije i temperature inkubacije na promene u koncentraciji ostataka hlorpirifos-metila prezentovani u **tabeli 19.2.1.4.** ukazuju da degradacija ovog pesticida pod uticajem mlečnokiselinske fermentacije sa *L. plantarum* dostiže veoma visok nivo od maksimum 93,3 % redukcije u slučaju kontaminacije na nivou MDK (3 mg/kg). Međutim, kada se dobijeni rezultati uporede sa koncentracijama hlorpirifos-metila ekstrahovanog iz uzoraka odmah nakon inokulacije (kod kojih je količina pesticida usled sterilizacije već redukovana na nivou od ~79 % – *tabela 19.1.1.*) uočava se da postignuta degradacija pesticida nije pri svim fermentacionim parametrima statistički značajno veća. Kada se uzme u obzir degradacija pod dejstvom sterilizacije, i činjenica da do spontane degradacije u datim eksperimentalnim uslovima praktično i ne dolazi (maksimum 1,5 % – *tabela 19.1.3.*), može se zaključiti da sâm *L. plantarum* prouzrokuje maksimum ~14 % redukcije hlorpirifos-metila aplikovanog na pšenicu u MDK koncentraciji.

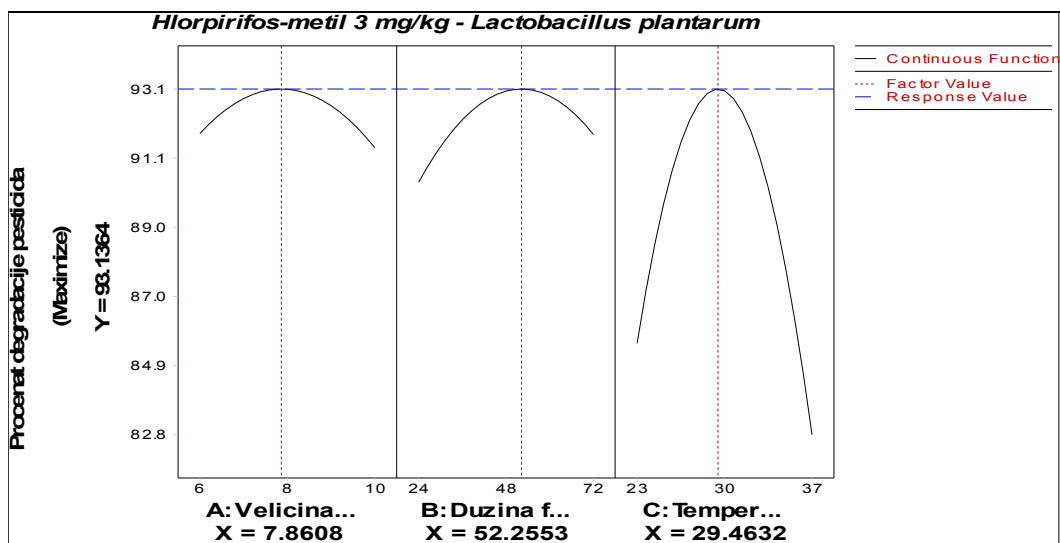
Značajnosti efekata pojedinačnih faktora i njihovih interakcija za degradaciju hlorpirifos-metila na ovom koncentracionom nivou (MDK) prikazane su na **grafikonu 19.2.1.7.**



Grafikon 19.2.1.7. Pareto grafikon značajnosti uticaja fermentacionih parametara na degradaciju hlorpirifos-metila (MDK) pri fermentaciji sa *L. plantarum*

Prezentovani rezultati ukazuju na to da, pri fermentaciji pšenice sa *L. plantarum*, variranje ni jednog od fermentacionih parametara u ispitivanom opsegu ne utiče značajno na stepen degradacije hlorpirifos-metila aplikovanog u

koncentraciji od 3 mg/kg, tako da statistički pomatrano može da se očekuje da će degradacija biti na sličnom nivou pri svim ispitivanim uslovima. Međutim, pošto je statističkom obradom po Studentovom t-testu dobijeno da se pri nekim varijacijama fermentacionih parametara dobijaju značajno veći nivoi degradacije u odnosu na kontrolu pre fermentacije, a kod drugih to nije slučaj (**Tabela 19.2.1.4**), urađena je i optimizacija ispitivanih fermentacionih parametara u pravcu postizanja najvećeg stepena degradacije hlorpirifos metila, a rezultati su prikazani na **grafikonu 19.2.1.8.**



Grafikon 19.2.1.8. Optimizacija mlečnokiselinske fermentacije u pravcu postizanja najvećeg stepena degradacije hlorpirifos-metila koncentracije 3 mg/kg (MDK)

Sa prikazanog grafikona može se videti da se, nakon aplikacije 3 mg hlorpirifos-metila po kg pšenice, dostiže maksimalna redukcija pesticida od 93,1 % nakon 52 sata fermentacije sa *L. plantarum* pri temperaturi od ~30 °C i uz inokulaciju na nivou od ~8% (v/w).

Rezultati ispitivanja uticaja fermentacionih parametara na degradaciju hlorpirifos-metila koncentracije 15 mg/kg prikazani su u **tabeli 19.2.1.5**.

Dobijeni rezultati ispitivanja uticaja veličine inokuluma, dužine trajanja fermentacije i temperature inkubacije na promene u koncentraciji ostataka hlorpirifos-metila prezentovani u **tabeli 19.2.1.5** ukazuju na sličnu pravilnost kao u predhodnoj tabeli.

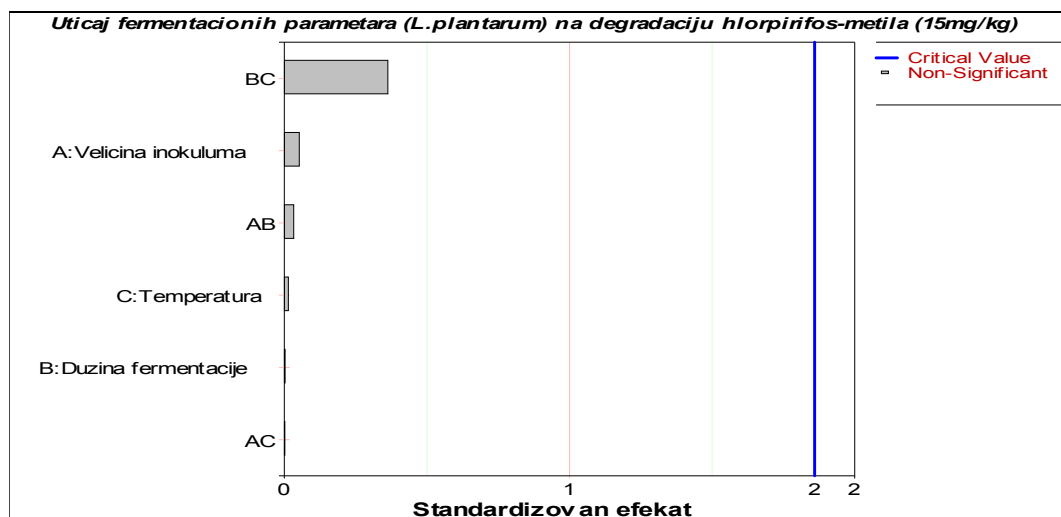
Tabela 19.2.1.5. Uticaj mlečnokiselinske fermentacije pšeničnog supstrata na degradaciju hlorspirifos-metila aplikovanog u koncentraciji na nivou 5xMDK

Početna Ca.m. * (mg/kg)	A	B	C	Preostala Ca.m. (mg/kg)	Stepen degradacije (%) [#]
15,82±0,00	6	0	-	3,24±0,17	79,5±1,1 ^d
15,83±0,01	8	0	-	3,31±0,11	79,1±0,7 ^e
15,81±0,01	10	0	-	3,63±0,22	77,1±1,4 ^f
15,82±0,00	10	72	30	1,78±0,21	88,7±1,3 ^F
15,81±0,01	10	24	30	2,28±0,23	85,6±1,5 ^F
15,81±0,02	6	72	30	1,73±0,11	89,1±0,7 ^D
15,82±0,00	6	24	30	2,13±0,21	86,6±1,3 ^D
15,81±0,01	10	48	37	2,72±0,11	82,8±0,7 ^F
15,83±0,00	10	48	23	3,20±0,17	79,8±1,0 ^f
15,83±0,00	6	48	37	2,73±0,04	82,8±0,2 ^D
15,75±0,10	6	48	23	3,21±0,17	79,6±1,1 ^d
15,82±0,00	8	72	37	3,48±0,24	78,0±1,5 ^e
15,82±0,01	8	72	23	3,41±0,23	78,4±1,5 ^e
15,81±0,01	8	24	37	3,39±0,14	78,5±0,9 ^e
15,82±0,02	8	24	23	2,57±0,23	83,8±1,5 ^e
15,81±0,01	8	48	30	1,27±0,14	92,0±0,9 ^E
15,82±0,01	8	48	30	1,58±0,14	90,0±0,9 ^E
15,82±0,01	8	48	30	1,35±0,17	91,4±1,2 ^E

A–veličina inokuluma (%); B–dužina fermentacije (h); C–temperatura (°C); *Ca.m.–koncentracija aktivne materije; [#]izražene vrednosti predstavljaju ukupnu degradaciju; vrednosti obeležene velikim slovima značajno se razlikuju od kontrole sa adekvatnom veličinom inokuluma (t test, p=0,05)

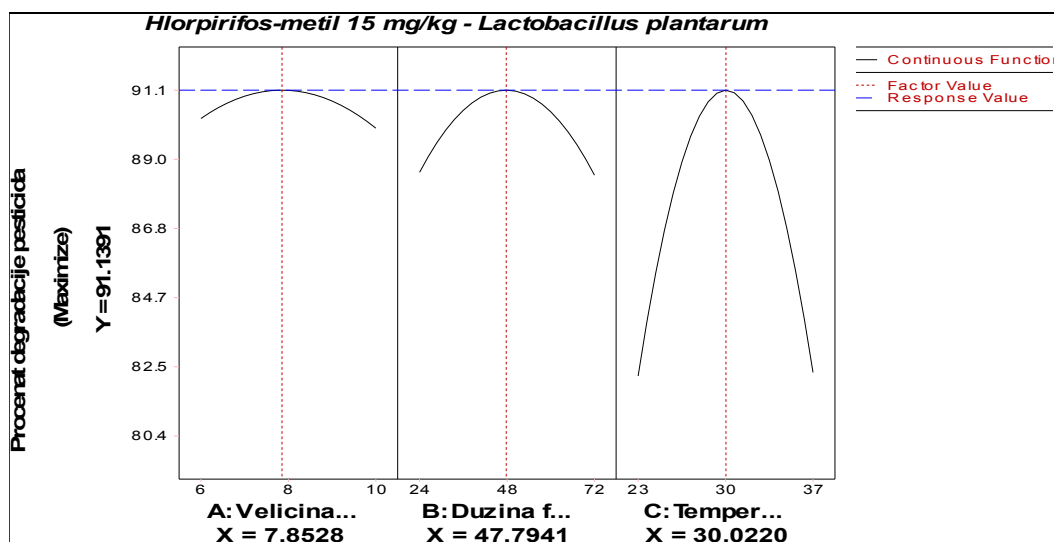
Degradacija hlorspirifos-metila pod uticajem fermentacije sa *L. plantarum* i u slučaju kontaminacije na nivou 5xMDK (15 mg/kg) dostiže izrazito visok nivo od maksimum 92 % redukcije. Međutim, kada se dobijeni rezultati uporede sa kontrolnim uzorcima pre inokulacije (kod kojih je količina pesticida usled sterilizacije već redukovana na nivou od ~79 % – tabela 19.1.1.) uočava se da postignuta degradacija pesticida takođe nije pri svim fermentacionim parametrima statistički značajno veća. Kada se uzme u obzir ova degradacija postignuta pre inokulacije, može se zaključiti da sâm *L. plantarum* prouzrokuje maksimum ~12 % redukcije hlorspirifos-metila aplikovanog na pšenicu u 5xMDK koncentraciji.

Značajnosti efekata pojedinačnih faktora i njihovih interakcija za degradaciju hlorspirifos-metila (5xMDK) prikazane na **grafikonu 19.2.1.9.** pokazuju da variranje ni jednog od fermentacionih parametara u ispitivanom opsegu ne utiče na stepen degradacije hlorspirifos-metila aplikovanog u koncentraciji od 15 mg/kg.



Grafikon 19.2.1.9. Pareto grafikon značajnosti uticaja fermentacionih parametara na degradaciju hlorspirifos-metila (5xMDK) pri fermentaciji sa *L. plantarum*

Međutim, iako statistički pomatrano može da se očekuje da će degradacija biti na sličnom nivou pri svim ispitivanim uslovima, zbog razlika u značajnosti odstupanja nivoa degradacije pri nekim varijacijama fermentacionih parametara u odnosu na kontrolu urađena je optimizacija ispitivanih fermentacionih parametara u pravcu postizanja najvećeg stepena degradacije hlorspirifos metila, a rezultati su prikazani na **grafikonu 19.2.1.10.**



Grafikon 19.2.1.10. Optimizacija mlečnokiselinske fermentacije u pravcu postizanja najvećeg stepena degradacije hlorspirifos-metila koncentracije 15 mg/kg (5xMDK)

Sa prikazanog grafikona može se videti da se, nakon aplikacije 15 mg hlorspirifos-metila po kg pšenice, dostiže maksimalna redukcija pesticida od 91,1 % nakon ~48 sati fermentacije sa *L. plantarum* pri temperaturi od 30 °C i uz inokulaciju na nivou od ~8% (v/w). Procenat degradacije pri ovoj koncentraciji pesticida je neznatno niži u poređenju sa predhodnim, dok je optimalna dužina fermentacije kraća, a ostali optimalni fermentacioni parametri na istim nivoima.

Rezultati ispitivanja uticaja fermentacionih parametara na degradaciju hlorspirifos-metila koncentracije 45 mg/kg prikazani su u **tabeli 19.2.1.6.**

Tabela 19.2.1.6. Uticaj mlečnokiselinske fermentacije pšeničnog supstrata na degradaciju hlorspirifos-metila aplikovanog u koncentraciji na nivou 15xMDK

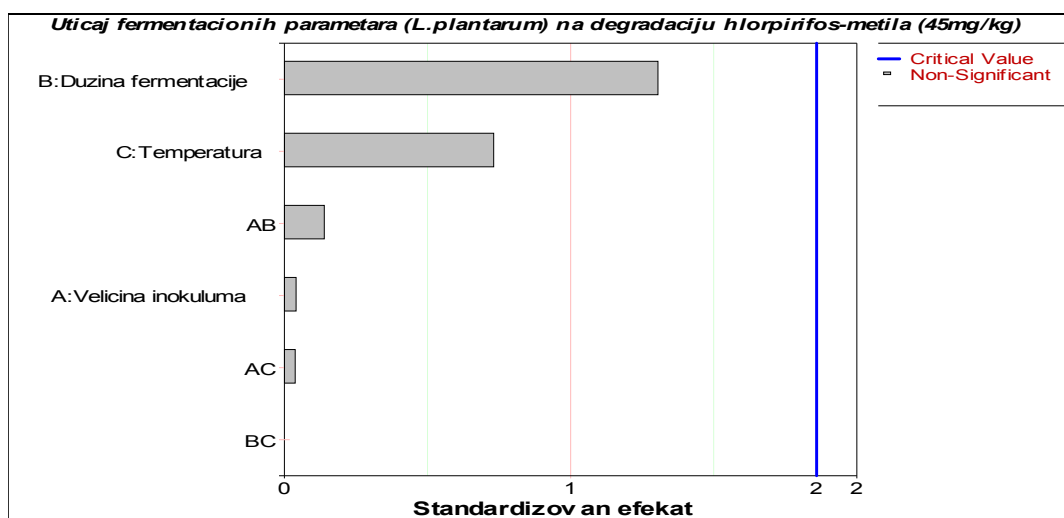
Početa Ca.m. * (mg/kg)	A	B	C	Preostala Ca.m. (mg/kg)	Stepen degradacije (%) [#]
45,22±0,01	6	0	-	10,26±0,49	77,3±1,1 ^d
45,20±0,03	8	0	-	9,71±0,32	78,5±0,7 ^e
45,20±0,03	10	0	-	10,16±0,68	77,5±1,5 ^f
45,21±0,01	10	72	30	5,36±0,57	88,2±1,3 ^f
45,21±0,02	10	24	30	9,04±0,50	80,0±1,1 ^f
45,17±0,02	6	72	30	5,56±0,45	87,7±1,0 ^D
45,18±0,01	6	24	30	8,74±0,32	80,7±0,7 ^d
45,21±0,03	10	48	37	6,99±0,36	84,5±0,8 ^F
45,14±0,02	10	48	23	9,37±0,63	79,2±1,4 ^f
45,21±0,02	6	48	37	7,09±0,54	84,3±1,2 ^D
45,15±0,03	6	48	23	9,64±0,32	78,6±0,7 ^d
45,22±0,01	8	72	37	9,66±0,32	78,6±0,7 ^e
45,21±0,01	8	72	23	9,05±0,33	80,0±0,7 ^e
45,21±0,02	8	24	37	9,54±0,50	78,9±1,1 ^e
45,17±0,00	8	24	23	8,95±0,36	80,2±0,8 ^e
45,22±0,00	8	48	30	6,84±0,12	84,9±0,3 ^E
45,18±0,03	8	48	30	7,11±0,59	84,3±1,3 ^E
45,18±0,04	8	48	30	6,49±0,62	85,6±1,4 ^E

A–veličina inokuluma (%); B–dužina fermentacije (h); C–temperatura (°C); *Ca.m.–koncentracija aktivne materije; [#]izražene vrednosti predstavljaju ukupnu degradaciju; vrednosti obeležene velikim slovima značajno se razlikuju od kontrole sa adekvatnom veličinom inokuluma (t test, p=0,05)

Dobijeni rezultati ispitivanja uticaja veličine inokuluma, dužine trajanja fermentacije i temperature inkubacije na promene u koncentraciji ostataka hlorspirifos-metila ukazuju da degradacija hlorspirifos-metila pod uticajem fermentacije sa *L. plantarum* i u slučaju kontaminacije na nivou 15xMDK (45 mg/kg) takođe dostiže izrazito visok nivo od maksimum 88,2 % redukcije. Ipak, kada se dobijeni rezultati uporede sa kontrolnim uzorcima pre inokulacije (kod kojih je

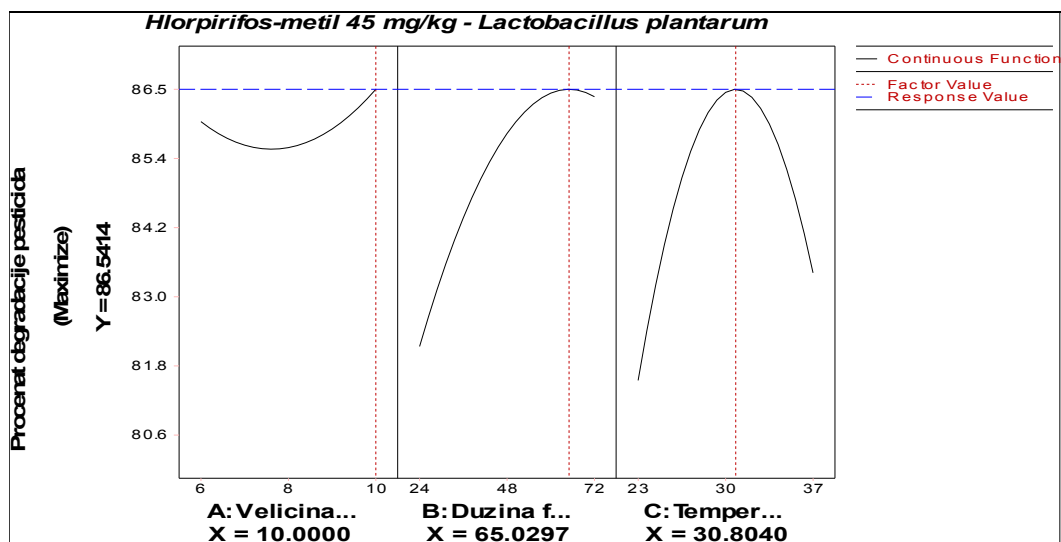
količina pesticida usled sterilizacije već redukovana na nivou od ~79 % – tabela 19.1.1.) uočava se da postignuta degradacija pesticida nije pri svim fermentacionim parametrima statistički značajno veća, a kada se uzme u obzir ova degradacija postignuta pre inokulacije, zaključak je da sâm *L. plantarum* prouzrokuje maksimum ~9 % redukcije hlorpirifos-metila aplikovanog na pšenicu u 15xMDK koncentraciji.

Značajnosti efekata pojedinačnih faktora i njihovih interakcija za degradaciju hlorpirifos-metila na ovom koncentracionom nivou (15xMDK) prikazane su na grafikonu 19.2.1.11..



Grafikon 19.2.1.11. Pareto grafikon značajnosti uticaja fermentacionih parametara na degradaciju hlorpirifos-metila (15xMDK) pri fermentaciji sa *L. plantarum*

Kao što rezultati pokazuju, variranje ni jednog od fermentacionih parametara u ispitivanom opsegu ne utiče na stepen degradacije hlorpirifos-metila aplikovanog u koncentraciji od 45 mg/kg, te se, statistički posmatrano može očekivati da će degradacija biti na sličnom nivou pri svim ispitivanim uslovima. Zbog razlika u značajnosti odstupanja nivoa degradacije pri nekim varijacijama fermentacionih parametara u odnosu na kontrolu, urađena je optimizacija ispitivanih fermentacionih parametara u pravcu postizanja najvećeg stepena degradacije hlorpirifos metila, a rezultati su prikazani na grafikonu 19.2.1.12..



Grafikon 19.2.1.12. Optimizacija mlečnokiselinske fermentacije u pravcu postizanja najvećeg stepena degradacije hlorthirifos-metila koncentracije 45 mg/kg (15xMDK)

Sa prikazanog grafikona može se videti da se, nakon aplikacije 45 mg hlorthirifos-metila po kg pšenice, dostiže maksimalna redukcija pesticida od 86,5 % nakon 65 sati fermentacije sa *L. plantarum* pri temperaturi od ~31 °C i uz inokulaciju na nivou od 10% (v/w). Procenat degradacije pri ovoj koncentraciji je neznatno niži u poređenju sa predhodnim, međutim optimalni fermentacioni parametri potrebni za postizanje maksimalne degradacije prilično se razlikuju.

Iz svega navedenog, može se zaključiti da *L. plantarum* utiče na redukciju hlorthirifos-metila u pšeničnom supstratu na niskom nivou, od svega 9-14 %, pri čemu je ovaj efekat izraženiji u slučaju najmanje koncentracije pesticida, tj. najmanji je u prisustvu najveće koncentracije, što je u korelaciji sa ranije prezentovanim rezultatima o postojanju inhibicije rasta *L. plantarum* pri većim kontaminacijama pesticidom (Tabela 16.1.2.). Imajući u vidu da je hlorthirifos-metil jedinjenje čija je hidrolitička degradacija umereno pH-zavisna, pri čemu se usporava sa smanjenjem pH, očigledno je da upravo povećavanje kiselosti sredine usled aktivnosti laktobacila donekle sprečava bržu hemijsku degradaciju ovog pesticida, a blaga redukcija količine rezidua u toku mlečnokiselinske fermentacije prouzrokovana je enzimatskom aktivnošću ove bakterije.

Dobijeni rezultati ispitivanja uticaja veličine inokuluma, dužine trajanja fermentacije i temperature inkubacije na degradaciju bifentrina koncentracije 0,5 mg/kg prikazani su u **tabeli 19.2.1.7.**

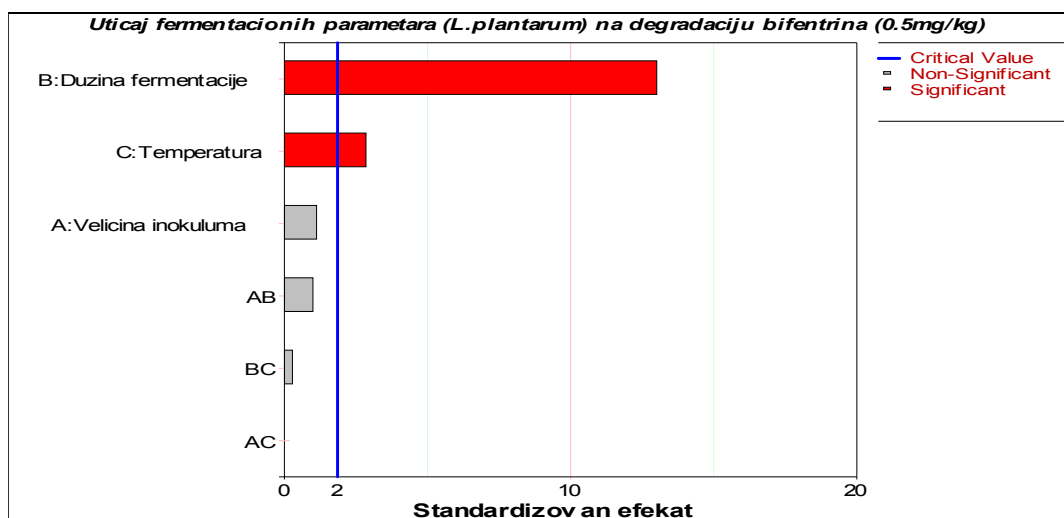
Tabela 19.2.1.7. Uticaj mlečnokiselinske fermentacije pšeničnog supstrata na degradaciju bifentrina aplikovanog u koncentraciji na nivou MDK

Početna Ca.m. * (mg/kg)	A	B	C	Preostala Ca.m. (mg/kg)	Stepen degradacije (%) [#]
0,52±0,00	6	0	-	0,42±0,01	19,1±1,0 ^d
0,53±0,00	8	0	-	0,42±0,00	20,0±0,0 ^e
0,53±0,00	10	0	-	0,43±0,01	18,7±0,9 ^f
0,53±0,00	10	72	30	0,36±0,01	30,8±1,1 ^F
0,53±0,00	10	24	30	0,22±0,01	58,7±1,0 ^F
0,53±0,00	6	72	30	0,41±0,01	21,7±0,7 ^d
0,53±0,00	6	24	30	0,23±0,01	57,0±1,0 ^D
0,53±0,00	10	48	37	0,29±0,01	45,2±1,2 ^F
0,53±0,00	10	48	23	0,27±0,00	49,5±0,0 ^F
0,53±0,00	6	48	37	0,29±0,01	44,6±1,4 ^D
0,53±0,00	6	48	23	0,27±0,01	49,2±0,7 ^D
0,53±0,00	8	72	37	0,39±0,01	26,1±1,5 ^E
0,53±0,00	8	72	23	0,35±0,01	34,2±1,1 ^E
0,53±0,00	8	24	37	0,24±0,00	54,4±0,0 ^E
0,53±0,00	8	24	23	0,18±0,01	65,2±1,2 ^E
0,53±0,00	8	48	30	0,28±0,01	46,5±1,1 ^E
0,53±0,00	8	48	30	0,28±0,01	46,4±1,2 ^E
0,53±0,00	8	48	30	0,30±0,00	43,1±0,0 ^E

A–veličina inokuluma (%); B–dužina fermentacije (h); C–temperatura (°C); *Ca.m.–koncentracija aktivne materije; [#]izražene vrednosti predstavljaju ukupnu degradaciju; vrednosti obeležene velikim slovima značajno se razlikuju od kontrole sa adekvatnom veličinom inokuluma (t test, p=0,05)

Rezultati ukazuju da degradacija pod uticajem fermentacije sa *L. plantarum* pri kontaminaciji na ovom nivou dostiže visok nivo od maksimum 65,2 % redukcije, pri čemu, kada se uzmu u obzir degradacija postignuta pre inokulacije (redukcija usled sterilizacije od ~18 % – *tabela 19.1.1.*), i spontana degradacija pri ovim eksperimentalnim uslovima od maksimum 3 % (*Tabela 19.1.4.*), uočava se da sâm *L. plantarum* prouzrokuje čak maksimum ~44 % redukcije aktivne materije. Kada se dobijeni rezultati uporede sa kontrolnim uzorcima pre inokulacije uočava se da postoji velika razlika u degradacijama postignutim pri različitim fermentacionim parametrima, pri čemu vrednosti nisu u svim slučajevima statistički značajno veće od kontrole. Ovo govori u prilog izraženijem uticaju variranja parametara fermentacije u ispitivanom opsegu.

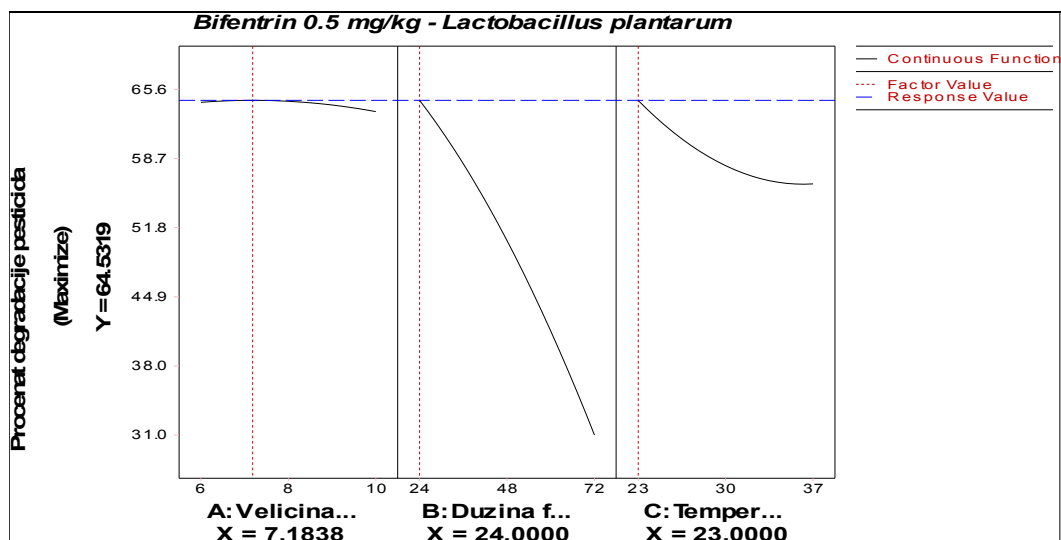
Značajnosti efekata pojedinačnih faktora i njihovih interakcija za degradaciju bifentrina (MDK) prikazane su na **grafikonu 19.2.1.13.**



Grafikon 19.2.1.13. Pareto grafikon značajnosti uticaja fermentacionih parametara na degradaciju bifentrina (MDK) pri fermentaciji sa *L. plantarum*

Podaci prezentovani na **grafikonu 19.2.1.13.** ukazuju na to da na stepen degradacije bifentrina aplikovanog u koncentraciji od 0,5 mg/kg, pri fermentaciji pšenice sa *L. plantarum*, značajno utiču i dužina trajanja mlečnokiselinske fermentacije i temperatura inkubacije dok veličina inokuluma nema efekta na ovaj odziv.

Rezultati optimizacije ispitivanih fermentacionih parametara u cilju određivanja njihovih optimalnih nivoa pri kojima se postiže maksimalni stepen degradacije bifentrina (MDK) prikazani su na **grafikonu 19.2.1.14.** Sa prikazanog grafikona može se videti da se maksimalna redukcija bifentrina od 64,5 % dostiže već nakon 24 sata fermentacije sa *L. plantarum* pri temperaturi od 23 °C i uz inokulaciju na nivou manjem od 8% (v/w). Procenat degradacije pri ovoj koncentraciji bifentrina je, dakle, impozantan, naročito imajući u vidu udeo uticaja samog laktobacila u ukupnoj redukciji, i činjenicu da se maksimum degradacije postiže već pri najmanjoj ispitivanoj temperaturi inkubacije i najkraćem vremenu fermentacije.



Grafikon 19.2.1.14. Optimizacija mlečnokiselinske fermentacije u pravcu postizanja najvećeg stepena degradacije bifentrina koncentracije 0,5 mg/kg (MDK)

Rezultati ispitivanja uticaja fermentacionih parametara na degradaciju bifentrina koncentracije 2,5 mg/kg prikazani su u **tabeli 19.2.1.8.**

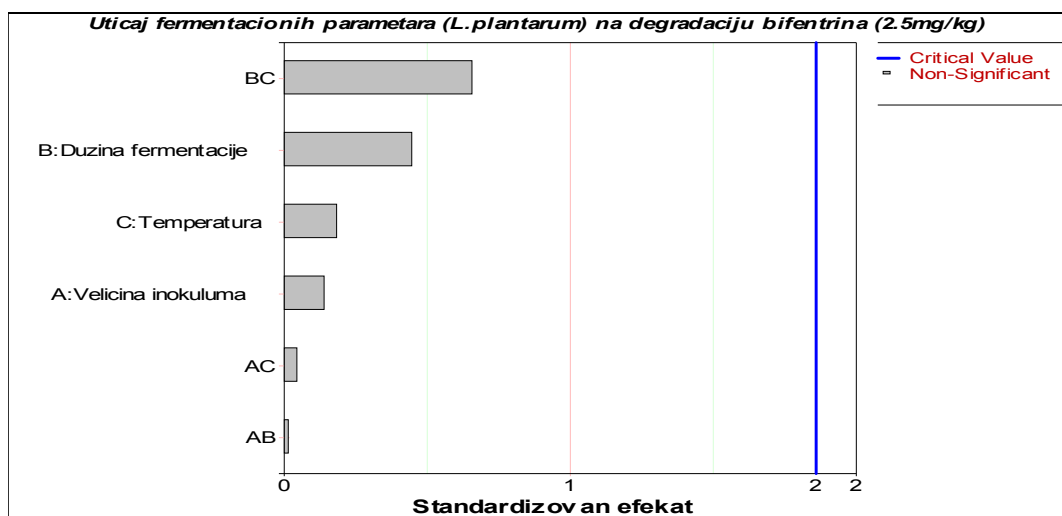
Tabela 19.2.1.8. Uticaj mlečnokiselinske fermentacije pšeničnog supstrata na degradaciju bifentrina aplikovanog u koncentraciji na nivou 5xMDK

Početa Ca.m. * (mg/kg)	A	B	C	Preostala Ca.m. (mg/kg)	Stepen degradacije (%) [#]
2,64±0,00	6	0	-	2,14±0,01	18,8±0,3 ^d
2,64±0,00	8	0	-	2,16±0,03	18,1±1,0 ^e
2,64±0,00	10	0	-	2,16±0,02	18,0±0,8 ^f
2,64±0,00	10	72	30	1,28±0,02	51,7±0,9 ^F
2,64±0,00	10	24	30	1,79±0,00	32,1±0,0 ^F
2,64±0,00	6	72	30	1,33±0,03	49,7±1,3 ^D
2,64±0,00	6	24	30	1,82±0,03	31,0±1,0 ^D
2,64±0,00	10	48	37	1,57±0,00	40,5±0,0 ^F
2,64±0,00	10	48	23	1,93±0,04	27,1±1,5 ^F
2,64±0,00	6	48	37	1,60±0,02	39,4±0,8 ^D
2,64±0,00	6	48	23	2,00±0,03	24,1±1,2 ^D
2,64±0,00	8	72	37	1,80±0,02	31,9±0,8 ^E
2,64±0,00	8	72	23	1,84±0,01	30,4±0,9 ^E
2,64±0,00	8	24	37	1,87±0,00	29,0±0,1 ^E
2,64±0,00	8	24	23	1,32±0,02	49,9±0,5 ^E
2,64±0,00	8	48	30	0,99±0,04	62,4±1,5 ^E
2,64±0,00	8	48	30	1,01±0,02	61,6±0,8 ^E
2,64±0,00	8	48	30	1,11±0,02	58,1±0,6 ^E

A–veličina inokuluma (%); B–dužina fermentacije (h); C–temperatura (°C); *Ca.m.–koncentracija aktivne materije; [#]izražene vrednosti predstavljaju ukupnu degradaciju; vrednosti obeležene velikim slovima značajno se razlikuju od kontrole sa adekvatnom veličinom inokuluma (t test, p=0,05)

Dobijeni rezultati ispitivanja uticaja veličine inokuluma, dužine trajanja fermentacije i temperature inkubacije na degradaciju bifentrina ukazuju da degradacija pod uticajem fermentacije sa *L. plantarum* pri kontaminaciji na ovom nivou dostiže visok nivo od maksimum 62,4 % redukcije. Kada se uzmu u obzir degradacija postignuta pre inokulacije (redukcija usled sterilizacije od ~18 % – tabela 19.1.1.), i spontana degradacija pri ovim eksperimentalnim uslovima od maksimum 3 % (Tabela 19.1.4.), uočava se da sâm *L. plantarum* prouzrokuje čak maksimum ~41 % redukcije aktivne materije.

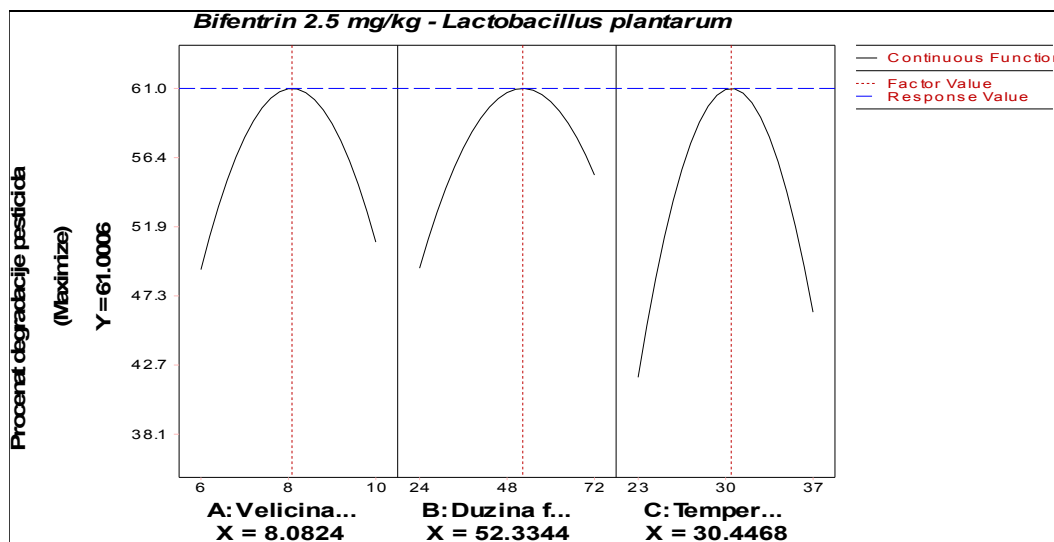
Poređenjem dobijenih rezultata sa kontrolnim uzorcima pre inokulacije uočava se da, u slučaju koncentracije od 2,5 mg/kg, ne postoji velika razlika u degradacijama postignutim pri različitim fermentacionim parametrima, a vrednosti su u svim slučajevima statistički značajno veće od kontrole. Ovo govori u prilog nepostojanju uticaja variranja parametara fermentacije u ispitivanom opsegu, a njihove značajnosti za degradaciju bifentrina prikazane su na **grafikonu 19.2.1.15.**



Grafikon 19.2.1.15. Pareto grafikon značajnosti uticaja fermentacionih parametara na degradaciju bifentrina (5xMDK) pri fermentaciji sa *L. plantarum*

Prezentovani podaci ukazuju na to da, pri fermentaciji pšenice sa *L. plantarum*, variranje ni jednog od fermentacionih parametara u ispitivanom opsegu ne utiče značajno na stepen degradacije bifentrina aplikovanog u koncentraciji od 2,5 mg/kg.

Rezultati optimizacije ispitivanih fermentacionih parametara u cilju određivanja njihovih optimalnih nivoa pri kojima se postiže maksimalni stepen degradacije bifentrina (5xMDK) prikazani su na **grafikonu 19.2.1.16.**



Grafikon 19.2.1.16. Optimizacija mlečnokiselinske fermentacije u pravcu postizanja najvećeg stepena degradacije bifentrina koncentracije 2,5 mg/kg (5xMDK)

Sa prikazanog grafikona može se videti da su optimalni uslovi za postizanje maksimalne redukcija bifentrina od 61 % temperatura od ~30 °C, dužina fermentacije sa *L. plantarum* od 52 sata uz inokulaciju na nivou od 8% (v/w). Dakle, iako je procenat degradacije, a naročito udeo uticaja samog laktobacila u ukupnoj redukciji, i pri ovoj koncentraciji bifentrina visok, u ovom slučaju se maksimum postiže pri većoj temperaturi inkubacije i nakon znatno dužeg vremena.

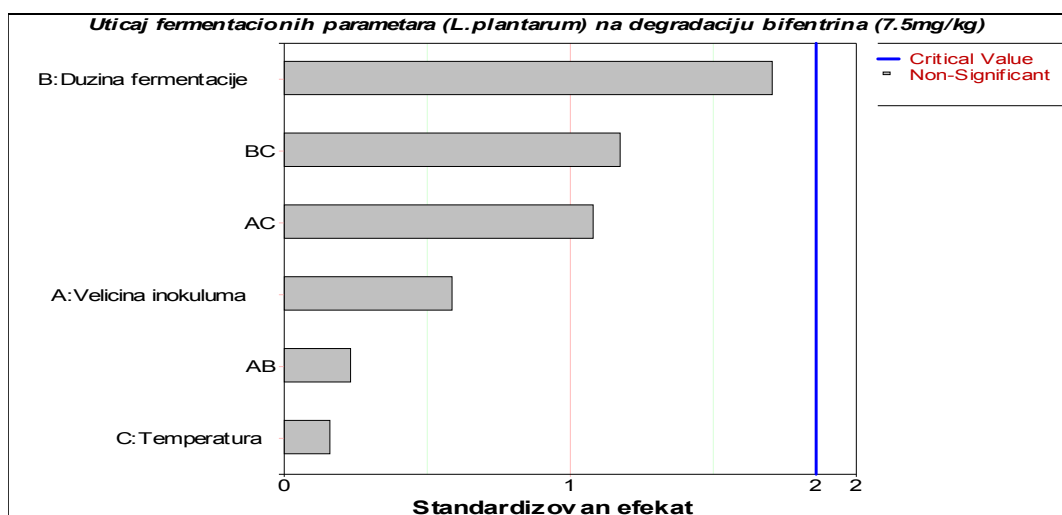
Rezultati ispitivanja uticaja fermentacionih parametara na degradaciju bifentrina koncentracije 7,5 mg/kg prikazani u **tabeli 19.2.1.9.** ukazuju da pri ovom nivou obogaćivanja bifentrinom, pod uticajem fermentacije sa *L. plantarum* dolazi do znatno manjeg nivoa degradacije od maksimum 34,9 % redukcije. Uzimajući u obzir degradaciju postignutu pre inokulacije (~17 % usled sterilizacije – *tabela 19.1.1.*), i spontanu degradaciju od maksimum 3 % (*Tabela 19.1.4.*), dobija se svega max ~15 % redukcije prouzrokovane samim laktobacilom. Poređenjem dobijenih rezultata sa kontrolnim uzorcima pre inokulacije uočava se da, u slučaju koncentracije od 7,5 mg/kg, postignuta degradacija pesticida nije pri svim fermentacionim parametrima statistički značajno veća.

Tabela 19.2.1.9. Uticaj mlečnokiselinske fermentacije pšeničnog supstrata na degradaciju bifentrina aplikovanog u koncentraciji na nivou 15xMDK

Početna Ca.m. * (mg/kg)	A	B	C	Preostala Ca.m. (mg/kg)	Stepen degradacije (%) [#]
7,77±0,00	6	0	-	6,51±0,10	16,2±1,3 ^d
7,77±0,01	8	0	-	6,42±0,09	17,3±1,1 ^e
7,77±0,01	10	0	-	6,46±0,07	16,9±0,9 ^f
7,77±0,00	10	72	30	5,88±0,06	24,3±0,8 ^F
7,77±0,00	10	24	30	6,26±0,11	19,4±1,4 ^f
7,76±0,00	6	72	30	5,91±0,09	23,2±1,2 ^D
7,76±0,00	6	24	30	6,14±0,11	20,9±1,4 ^d
7,77±0,00	10	48	37	6,47±0,05	16,8±0,7 ^f
7,76±0,00	10	48	23	6,14±0,05	20,8±0,7 ^F
7,77±0,00	6	48	37	5,68±0,06	26,9±0,8 ^D
7,76±0,01	6	48	23	6,26±0,05	19,3±0,7 ^d
7,77±0,00	8	72	37	5,79±0,12	25,5±1,5 ^E
7,77±0,00	8	72	23	5,06±0,12	34,9±1,5 ^E
7,77±0,00	8	24	37	6,02±0,03	22,5±0,4 ^E
7,76±0,00	8	24	23	6,26±0,11	19,3±1,4 ^e
7,77±0,00	8	48	30	5,27±0,08	32,3±1,0 ^E
7,76±0,01	8	48	30	5,66±0,07	27,1±0,9 ^E
7,76±0,01	8	48	30	5,37±0,11	30,9±1,4 ^E

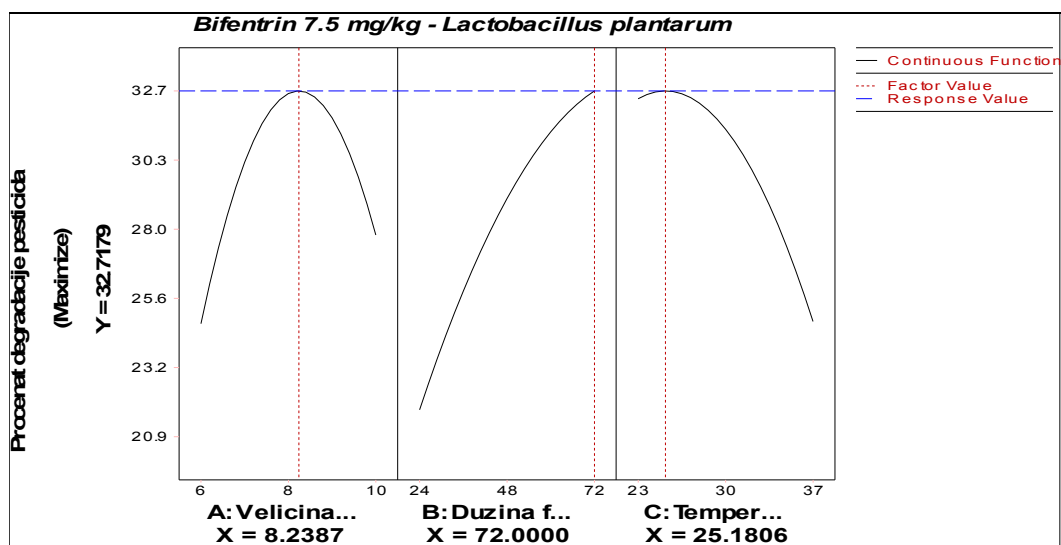
A–veličina inokuluma (%); B–dužina fermentacije (h); C–temperatura (°C); *Ca.m.–koncentracija aktivne materije; [#]izražene vrednosti predstavljaju ukupnu degradaciju; vrednosti obeležene velikim slovima značajno se razlikuju od kontrole sa adekvatnom veličinom inokuluma (t test, p=0,05)

Značajnosti efekata pojedinačnih faktora i njihovih interakcija za degradaciju bifentrina (15xMDK) prikazane su na **grafikonu 19.2.1.17.**



Grafikon 19.2.1.17. Pareto grafikon značajnosti fermentacionih parametara na degradaciju bifentrina (15xMDK) pri fermentaciji sa *L. plantarum*

Prezentovani podaci ukazuju na to da, pri fermentaciji pšenice sa *L. plantarum*, variranje ni jednog od fermentacionih parametara u ispitivanom opsegu ne utiče značajno na stepen degradacije bifentrina aplikovanog u koncentraciji od 7,5 mg/kg, što znači da se, statistički posmatrano, može očekivati da će degradacija biti na sličnom nivou pri svim ispitivanim uslovima. Međutim, zbog razlika u značajnosti odstupanja nivoa degradacije pri nekim varijacijama fermentacionih parametara u odnosu na kontrolu, urađena je optimizacija ispitivanih fermentacionih parametara u pravcu postizanja najvećeg stepena degradacije bifentrina (15xMDK). Rezultati optimizacije prikazani na **grafikonu 19.2.1.18.** pokazuju da se maksimalna redukcija bifentrina od svega 32,7 % postiže na temperaturi od 25 °C pri dužini fermentacije od 72 sata uz inokulaciju na nivou od ~8% (v/w). Dakle, maksimalni, ali mali procenat degradacije, sa malim udeom uticaja samog laktobacila u ukupnoj redukciji, postiže se tek nakon znatno dužeg trajanja fermentacije sa *L. plantarum*.



Grafikon 19.2.1.18. Optimizacija mlečnokiselinske fermentacije u pravcu postizanja najvećeg stepena degradacije bifentrina koncentracije 7,5 mg/kg (15xMDK)

Uopšteno posmatrano, može se zaključiti da *L. plantarum* u velikoj meri utiče na redukciju bifentrina u pšeničnom supstratu, međutim ovaj efekat je znatno izraženiji samo u slučaju koncentracije od 0,5 i 2,5 mg/kg pesticida i iznosi 41-44 %. U uzorcima obogaćenim sa 7,5 mg/kg, laktobacil u veoma maloj meri utiče na redukciju ostataka (~15 %). S obzirom da je poznato da do abiotičke hidrolize bifentrina ne dolazi ni u kiseljoj, ni u neutralnoj, ni baznoj sredini, očigledno je da

postojanje značajnog uticaja kontaminacije pesticidom na nivou 15xMDK na promenu pH vrednosti nema ulogu u ostvarenoj degradaciji, nego je redukcija količine rezidua u toku mlečnokiselinske fermentacije prouzrokovana isključivo enzimatskom aktivnošću ove bakterije. Uzimajući ovo u obzir, trend smanjenja stepena degradacije sa porastom koncentracije kontaminacije objašnjava se ranije prezentovanim rezultatima o postojanju inhibicije rasta *L. plantarum* pri većim kontaminacijama sa bifentrinom (Tabela 16.1.3.).

Sumirajući predhodno diskutovane rezultate može se utvrditi da fermentacija pšenice sa *Lactobacillus plantarum* dovodi do redukcije rezidua sva tri ispitivana pesticida. Kada se posmatra ukupna degradacija u toku fermentativnog procesa, hlörpirifos-metil je najpodložniji redukciji koja dostiže nivo od 88-93 %, nešto manja redukcija zabeležena je kod pirimifos-metila (71-82 %), a najmanja kod bifentrina (35-65 %), sa uniformnom pravilnošću u opadanju degradacije sa porastom koncentracije pesticida koja je najizraženija kod bifentrina. Međutim, ako bi se izdvojio uticaj isključivo aktivnosti *L. plantarum*, očigledno je da je redosled potpuno suprotan, pa tako *L. plantarum* u najvećoj meri degradira bifentrin (15-44 %), nešto manje pirimifos-metil (10-27 %), a najmanje hlörpirifos-metil (9-14 %). Boethling (1993) je još ranije konstatovao da je mikrobna degradacija pesticida, ako do nje dođe, najverovatnije prouzrokovana enzimatskom aktivnošću mikroorganizama koja se javlja ili odmah ili nakon određenog perioda adaptacije mikroba na hemijsko jedinjenje [206]. Sa druge strane, Ruediger i sar. (2005), pomenuli su da je možda verovatnije da do redukcije u koncentraciji pesticida dolazi zbog adsorpcije ovih jedinjenja na ćelijske zidove mikroorganizama, a ne usled njihove hemijske ili biološke degradacije [207]. S ozirom da u ovom eksperimentu, u toku ekstrakcije fermentisanih uzoraka kontaminiranih pesticidima, ćelije laktobacila ostaju u ekstrakcionom supstratu, ako bi se određena količina pesticida i adsorbovala na ćelijske zidove, ona bi svakako bila ekstrahovana sa ostatkom jedinjenja. Imajući ovo u vidu, verovatnije je da je redukcija količine pesticida u fermentisanim uzorcima posledica biološke degradacije tj. enzimatske aktivnosti *L. plantarum*. Ovoj teoriji u prilog ide i to što je veća degradacija svih ispitivanih pesticida po pravilu zabeležena pri manjim koncentracijama kontaminacije koje nisu uticale na rast laktobacila tj. u čijem prisustvu je dostignuta veća brojnost ćelija u supstratu,

naročito imajući u vidu da je najviše degradiran bifentrin imao od svih pesticida najmanje negativan efekat na rast *L. plantarum*. To što je procenat mikrobne degradacije pirimifos-metila dostignut u ovom eksperimentu veći od degradacije hlorpirifos-metila, iako je pirimifos-metil u većoj meri inhibirao rast ovog laktobacila, može da se obrazloži pH-zavisnom hemijskom degradacijom ovog jedinjenja, do koje je verovatno dodatno došlo zbog povećanja kiselosti supstrata usled aktivnosti laktobacila.

19.2.2. ISPITIVANJE UTICAJA FERMENTACIJE PŠENIČNOG SUPSTRATA SA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* NA DEGRADACIJU PESTICIDA

Rezultati ispitivanja uticaja fermentacionih parametara na degradaciju pirimifos-metila koncentracije 5 mg/kg prikazani su u tabeli 19.2.2.1.

Tabela 19.2.2.1. Uticaj kvasne fermentacije pšeničnog supstrata na degradaciju pirimifos-metila aplikovanog u koncentraciji na nivou MDK

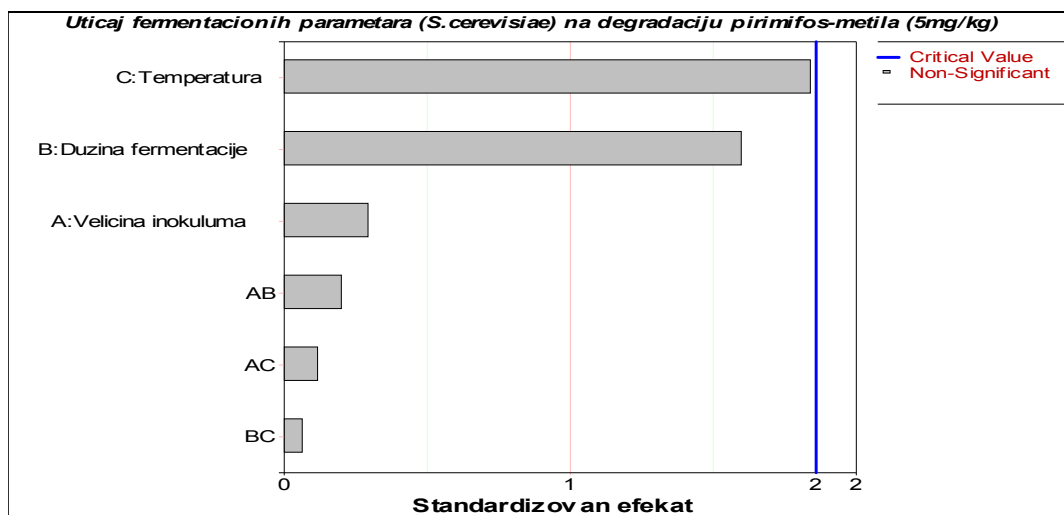
Početna Ca.m. * (mg/kg)	A	B	C	Preostala Ca.m. (mg/kg)	Stepen degradacije (%) [#]
5,05±0,06	6	0	-	2,87±0,03	43,2±0,6 ^d
5,01±0,00	8	0	-	2,86±0,04	42,8±0,8 ^e
5,01±0,00	10	0	-	2,88±0,06	42,6±1,1 ^f
5,01±0,00	10	72	30	1,60±0,07	68,2±1,3 ^F
5,01±0,00	10	24	30	2,08±0,04	58,4±0,8 ^F
5,01±0,00	6	72	30	1,77±0,07	64,8±1,3 ^D
5,01±0,00	6	24	30	2,11±0,06	57,8±1,2 ^D
5,01±0,00	10	48	37	1,56±0,05	68,9±0,9 ^F
5,01±0,00	10	48	23	2,02±0,06	59,8±1,2 ^F
5,01±0,00	6	48	37	1,56±0,06	68,9±1,2 ^D
5,01±0,00	6	48	23	2,10±0,06	58,1±1,1 ^D
5,01±0,01	8	72	37	1,42±0,08	71,7±1,5 ^E
5,01±0,00	8	72	23	1,76±0,06	64,9±1,2 ^E
5,01±0,00	8	24	37	1,72±0,06	65,6±1,1 ^E
5,01±0,00	8	24	23	2,11±0,03	57,8±0,6 ^E
5,01±0,00	8	48	30	1,32±0,05	73,7±0,9 ^E
5,01±0,00	8	48	30	1,25±0,05	75,1±0,9 ^E
5,01±0,00	8	48	30	1,15±0,06	77,1±1,1 ^E

A–veličina inokuluma (%); B–dužina fermentacije (h); C–temperatura (°C); *Ca.m.–koncentracija aktivne materije; [#]izražene vrednosti predstavljaju ukupnu degradaciju; vrednosti obeležene velikim slovima značajno se razlikuju od kontrole sa adekvatnom veličinom inokuluma (t test, p=0,05)

Prezentovani rezultati ukazuju da, u slučaju kontaminacije na nivou MDK, degradacija pirimifos-metila pod uticajem fermentacije sa *S. cerevisiae* dostiže nivo

redukcije od maksimum 77,1 %, pri čemu je degradacija pri svim fermentacionim parametrima statistički značajno veća od redukcije nakon sterilizacije (~37 % – *tabela 19.1.1.*) (tj. od kontrolnih uzoraka ispitivanih na degradaciju odmah nakon inokulacije). Uzimajući u obzir i spontanu degradaciju pri eksperimentalnim uslovima bez inokulacije (maksimum 10 % – *tabela 19.1.2.*), može se zaključiti da sâm *S. cerevisiae* prouzrokuje max ~30 % redukcije pirimifos-metila aplikovanog na pšenicu u koncentraciji od 5 mg/kg.

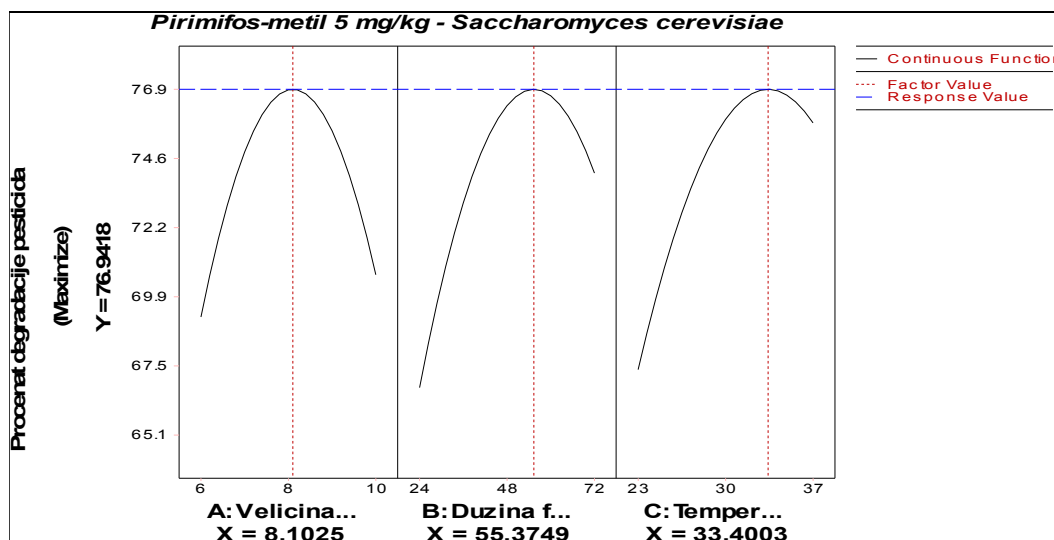
Značajnosti efekata pojedinačnih faktora i njihovih interakcija za degradaciju pirimifos-metila na ovom koncentracionom nivou (MDK) prikazane su na **grafikonu 19.2.2.1.**



Grafikon 19.2.2.1. Pareto grafikon značajnosti uticaja fermentacionih parametara na degradaciju pirimifos-metila (MDK) pri fermentaciji sa *S. cerevisiae*

Prezentovani rezultati ukazuju na to da, pri kvasnoj fermentaciji pšenice, variranje ni jednog od fermentacionih parametara u ispitivanom opsegu ne utiče značajno na stepen degradacije pirimifos-metila aplikovanog u koncentraciji od 5 mg/kg, iako se temperaturni faktor nalazi na samoj granici značajnosti, a dužina inkubacije blizu nje.

Rezultati optimizacije fermentacionih parametara kvasne fermentacije u cilju određivanja njihovih optimalnih nivoa pri kojima se dostiže maksimalan nivo degradacije pirimifos-metila (MDK), prikazani su na **grafikonu 19.2.2.2.**



Grafikon 19.2.2.2. Optimizacija kvasne fermentacije u pravcu postizanja najvećeg stepena degradacije pirimifos-metila koncentracije 5 mg/kg

Sa prikazanog grafikona može se videti da se, nakon aplikacije 5 mg pirimifos-metila po kg pšenice, maksimalna redukcija pesticida od 76,9 % dostiže nakon 55 sati fermentacije sa *S. cerevisiae* pri temperaturi od 33 °C i uz inokulaciju na nivou od 8% (v/w).

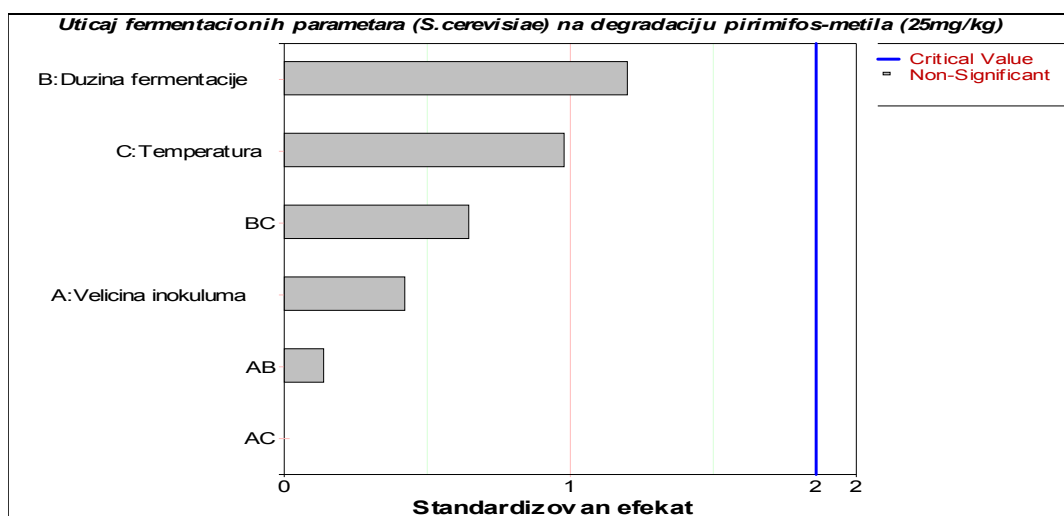
Rezultati ispitivanja uticaja fermentacionih parametara na degradaciju pirimifos-metila koncentracije 25 mg/kg prikazani u **tabeli 19.2.2.2.** ukazuju da, u slučaju kontaminacije na nivou 5xMDK, degradacija pirimifos-metila pod uticajem fermentacije sa *S. cerevisiae* dostiže nivo redukcije od maksimum 70,5 %, pri čemu je degradacija pri svim fermentacionim parametrima statistički značajno veća od redukcije nakon sterilizacije (~45 % – *tabela 19.1.1.*) (tj. od kontrolnih uzoraka ispitivanih na degradaciju odmah nakon inokulacije). Kada se dodatno u obzir uzme i spontana degradacija pri eksperimentalnim uslovima bez inokulacije (maksimum 10 % – *tabela 19.1.2.*), zaključak je da nakon aplikacije pirimifos-metila na pšenicu u koncentraciji od 25 mg/kg, sâm *S. cerevisiae* u još manjoj meri prouzrokuje degradaciju ovog pesticida, do svega max ~15 % redukcije.

Tabela 19.2.2.2. Uticaj kvasne fermentacije pšeničnog supstrata na degradaciju pirimifos-metila aplikovanog u koncentraciji na nivou 5xMDK

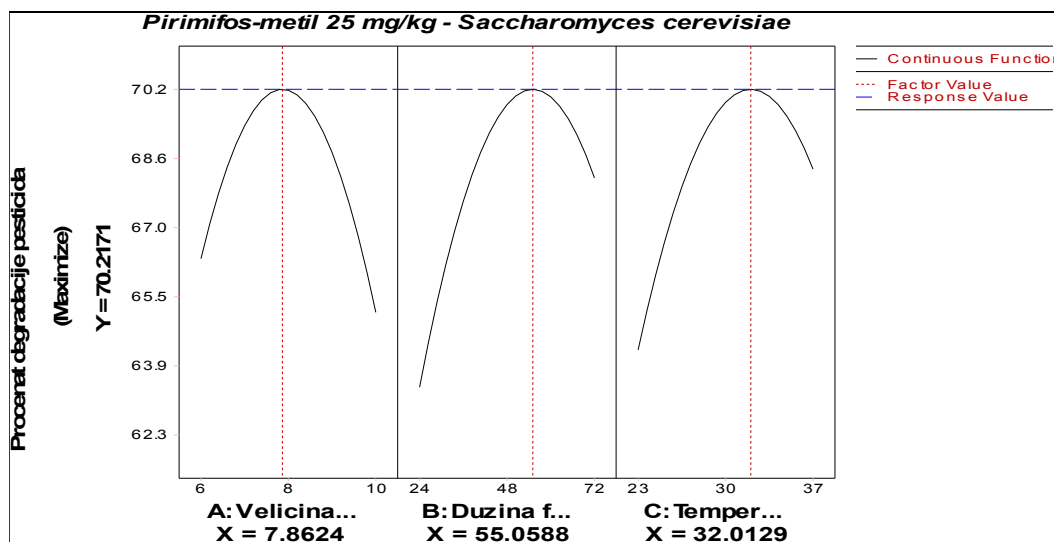
Početa Ca.m. * (mg/kg)	A	B	C	Preostala Ca.m. (mg/kg)	Stepen degradacije (%) [#]
25,11±0,01	6	0	-	14,25±0,20	43,3±0,8 ^d
25,13±0,02	8	0	-	14,13±0,18	43,8±0,7 ^e
25,12±0,00	10	0	-	14,53±0,20	42,2±0,8 ^f
25,12±0,01	10	72	30	9,44±0,21	62,4±0,8 ^F
25,12±0,01	10	24	30	10,60±0,15	57,8±0,6 ^F
25,11±0,02	6	72	30	9,10±0,33	63,7±1,3 ^D
25,13±0,00	6	24	30	9,93±0,18	60,5±0,7 ^D
25,11±0,02	10	48	37	9,64±0,20	61,6±0,8 ^F
25,11±0,03	10	48	23	9,87±0,23	60,7±0,9 ^F
25,13±0,02	6	48	37	9,43±0,38	62,5±1,5 ^D
25,11±0,03	6	48	23	9,66±0,38	61,5±1,5 ^D
25,11±0,03	8	72	37	7,96±0,25	68,3±1,0 ^E
25,11±0,01	8	72	23	10,12±0,28	59,7±1,1 ^E
25,11±0,01	8	24	37	9,74±0,28	61,2±1,1 ^E
25,13±0,01	8	24	23	10,38±0,29	58,7±0,9 ^E
25,11±0,01	8	48	30	7,76±0,38	69,1±1,5 ^E
25,11±0,01	8	48	30	7,41±0,20	70,5±0,8 ^E
25,13±0,00	8	48	30	7,70±0,18	69,4±0,7 ^E

A–veličina inokuluma (%); B–dužina fermentacije (h); C–temperatura (°C); *Ca.m.–koncentracija aktivne materije; [#]izražene vrednosti predstavljaju ukupnu degradaciju; vrednosti obeležene velikim slovima značajno se razlikuju od kontrole sa adekvatnom veličinom inokuluma (t test, p=0,05)

Značajnosti efekata pojedinačnih faktora i njihovih interakcija za degradaciju pirimifos-metila na ovom koncentracionom nivou (5xMDK) prikazane su na **grafikonu 19.2.2.3.**, a dodatni rezultati optimizacije na **grafikonu 19.2.2.4.**



Grafikon 19.2.2.3. Pareto grafikon značajnosti uticaja fermentacionih parametara na degradaciju pirimifos-metila (5xMDK) pri fermentaciji sa *S. cerevisiae*



Grafikon 19.2.2.4. Optimizacija kvasne fermentacije u pravcu postizanja najvećeg stepena degradacije pirimifos-metila koncentracije 25 mg/kg

Prezentovani rezultati pokazuju da, pri fermentaciji pšenice sa *S. cerevisiae*, variranje ni jednog od fermentacionih parametara u ispitivanom opsegu ne utiče značajno na stepen degradacije pirimifos-metila aplikovanog u koncentraciji od 25 mg/kg. Sa grafikona optimizacije vidi se da se maksimalna redukcija pesticida od 70,2 % dostiže nakon 55 sati fermentacije sa *S. cerevisiae* pri temperaturi od 32 °C i uz inokulaciju na nivou od ~8% (v/w). Procenat degradacije pri ovoj koncentraciji je neznatno niži u poređenju sa predhodnim, dok su optimalni fermentacioni parametri potrebni za postizanje maksimalne degradacije praktično na istim nivoima.

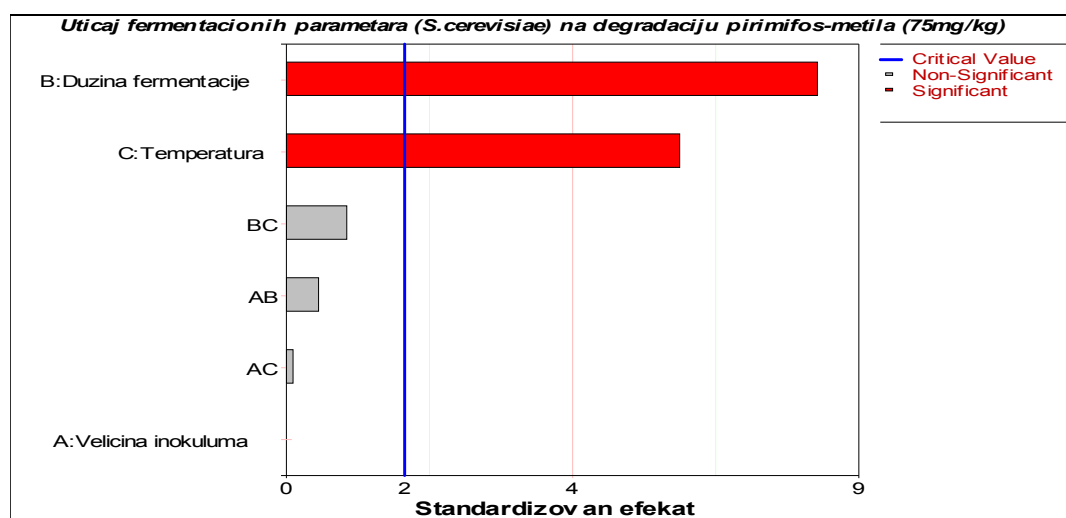
Iz prikazanih rezultata ispitivanja uticaja fermentacionih parametara na degradaciju pirimifos-metila koncentracije 75 mg/kg (Tabela 19.2.2.3.) uočava se da, u slučaju kontaminacije na nivou 15xMDK, degradacija pesticida pod uticajem fermentacije sa *S. cerevisiae* dostiže najmanji nivo redukcije od maksimum 63,1 %, dok je degradacija pri svim fermentacionim parametrima i u ovom slučaju statistički značajno veća od uzoraka ispitivanih na degradaciju odmah nakon inokulacije (kod kojih je koncentracija pesticida već redukovana ~50 % usled sterilizacije – *tabela 19.1.1.*). Uzimajući u obzir i spontanu degradaciju bez inokulacije (maksimum 10 % – *tabela 19.1.2.*), može se zaključiti da, nakon aplikacije pirimifos-metila na pšenicu u koncentraciji od 75 mg/kg, sâm *S. cerevisiae* u još manjoj meri prouzrokuje degradaciju ovog pesticida, do svega max ~3 % redukcije.

Tabela 19.2.2.3. Uticaj kvasne fermentacije pšeničnog supstrata na degradaciju pirimifos-metila aplikovanog u koncentraciji na nivou 15xMDK

Početna Ca.m. * (mg/kg)	A	B	C	Preostala Ca.m. (mg/kg)	Stepen degradacije (%) [#]
75,56±0,06	6	0	-	43,74±0,83	42,1±1,1 ^d
75,56±0,06	8	0	-	44,66±1,06	40,9±1,4 ^e
75,53±0,08	10	0	-	46,00±1,13	39,1±1,5 ^f
75,64±0,01	10	72	30	28,30±0,25	62,6±0,3 ^F
75,56±0,10	10	24	30	33,42±0,68	55,8±0,9 ^F
75,59±0,06	6	72	30	29,92±0,91	63,1±1,2 ^D
75,52±0,03	6	24	30	34,04±0,76	54,9±1,0 ^D
75,60±0,01	10	48	37	29,56±0,19	60,9±0,2 ^F
75,58±0,01	10	48	23	33,60±0,60	55,5±0,8 ^F
75,57±0,10	6	48	37	29,49±0,94	61,0±1,2 ^D
75,65±0,00	6	48	23	33,26±0,01	56,0±0,0 ^D
75,57±0,05	8	72	37	28,02±0,68	62,9±0,9 ^E
75,62±0,05	8	72	23	31,47±0,68	58,4±0,9 ^E
75,59±0,07	8	24	37	32,58±1,06	56,9±1,4 ^E
75,64±0,01	8	24	23	37,90±1,13	49,9±1,5 ^E
75,63±0,02	8	48	30	31,01±0,60	59,0±0,8 ^E
75,57±0,00	8	48	30	32,63±0,00	56,8±0,0 ^E
75,62±0,02	8	48	30	32,29±0,83	57,3±1,1 ^E

A–veličina inokuluma (%); B–dužina fermentacije (h); C–temperatura (°C); *Ca.m.–koncentracija aktivne materije; [#]izražene vrednosti predstavljaju ukupnu degradaciju; vrednosti obeležene velikim slovima značajno se razlikuju od kontrole sa adekvatnom veličinom inokuluma (t test, p=0,05)

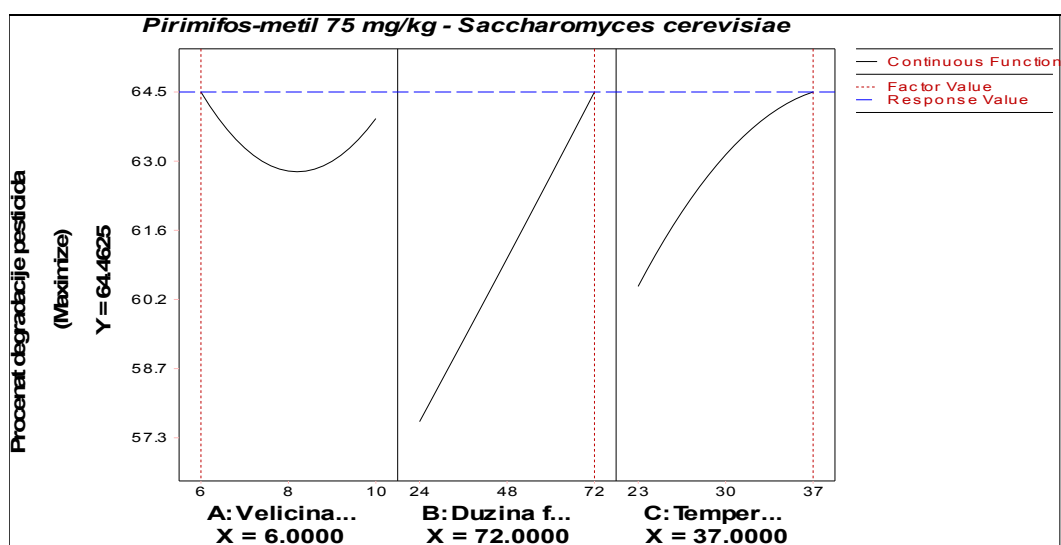
Značajnosti efekata pojedinačnih faktora i njihovih interakcija za degradaciju pirimifos-metila na ovom koncentracionom nivou (15xMDK) prikazane su na **grafikonu 19.2.2.5.**



Grafikon 19.2.2.5. Pareto grafikon značajnosti uticaja fermentacionih parametara na degradaciju pirimifos-metila (15xMDK) pri fermentaciji sa *S. cerevisiae*

Prezentovani podaci upućuju na to da na stepen degradacije pirimifos-metila aplikovanog u koncentraciji od 75 mg/kg, pri fermentaciji pšenice sa *S. cerevisiae*, značajno utiču i dužina trajanja kvasne fermentacije i temperatura dok veličina inokuluma, nema efekta na ovaj odziv.

Rezultati optimizacije ispitivanih fermentacionih parametara kvasne fermentacije u cilju određivanja njihovih optimalnih nivoa pri kojima se dostiže maksimalan nivo degradacije pirimifos-metila nakon aplikacije 75 mg pesticida po kg pšenice, prikazani su na **grafikonu 19.2.2.6.**



Grafikon 19.2.2.6. Optimizacija kvasne fermentacije u pravcu postizanja najvećeg stepena degradacije pirimifos-metila koncentracije 75 mg/kg

Prikazani rezultati pokazuju da su optimalni uslovi za postizanje maksimalne degradacije pirimifos-metila nakon aplikacije 75 mg/kg pšenice, fermentacija sa *S. cerevisiae* u trajanju od 72 h pri temperaturi od 37 °C i uz inokulaciju na nivou od 6% (v/w). Pri ovim uslovima degradacija pesticida dostiže 64,5 %. Dakle, procenat degradacije, a naročito udeo uticaja samog kvasca u ukupnoj redukciji, pri ovoj koncentraciji pirimifos-metila je dosta nizak, pri čemu se maksimum postiže pri najvećoj temperaturi inkubacije i nakon najduže fermentacije među ispitivanim vremenima.

Uopšteno posmatrano, *S. cerevisiae* utiče na redukciju pirimifos-metila u pšeničnom supstratu na nivou od svega 3-30 %, pri čemu je ovaj efekat najizraženiji u slučaju najmanje koncentracije pesticida, a veoma mali u prisustvu najveće

primenjene koncentracije, što je u korelaciji sa ranije dobijenim rezultatima o postojanju izrazito velike inhibicije rasta kvasca pri većim kontaminacijama sa ovim pesticidom (Tabela 16.2.1.). Neosporno je da je uticaj *S. cerevisiae* na degradaciju pirimifos-metila manji od uticaja *L. plantarum* na isti pesticid. Obrazloženje svakako leži u tome što pirimifos-metil pokazuje tendenciju da već u koncentraciji dva puta nižoj od propisane smanjuje brojnost populacije kvasca za skoro 50 %, čime se automatski smanjuje mogućnost njegove biološke degradacije pod dejstvom ovog mikroorganizma. Osim toga, kao što je ranije prikazano, kontaminacija ovim pesticidom na sva tri koncentraciona nivoa rezultira značajnim smanjenjem efikasnosti kvasne fermentacije pšenice što se odražava na pH vrednost supstrata (Grafikon 17.2.1.), pa, s obzirom da se pH pšeničnog supstrata ne spušta ispod 5, hemijska, pH-zavisna, hidrolitička degradacija ovog jedinjenja je usporena.

Rezultati ispitivanja uticaja fermentacionih parametara na degradaciju hlorpirifos-metila koncentracije 3 mg/kg prikazani su u tabeli 19.2.2.4.

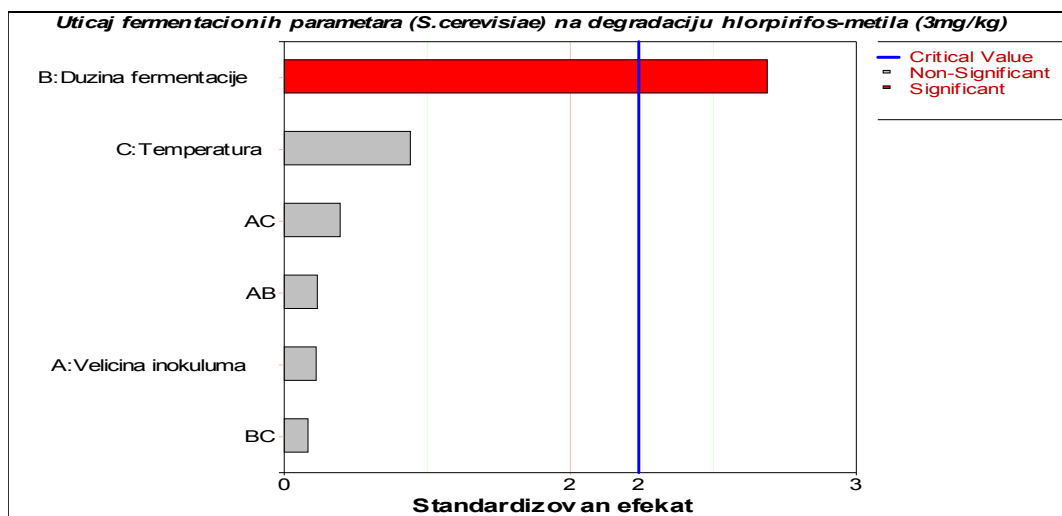
Tabela 19.2.2.4. Uticaj kvasne fermentacije pšeničnog supstrata na degradaciju hlorpirifos-metila aplikovanog u koncentraciji na nivou MDK

Početna Ca.m. * (mg/kg)	A	B	C	Preostala Ca.m. (mg/kg)	Stepen degradacije (%) [#]
3,02±0,00	6	0	-	0,68±0,02	77,7±0,7 ^d
3,02±0,00	8	0	-	0,65±0,04	78,4±1,4 ^e
3,02±0,00	10	0	-	0,63±0,05	79,3±1,6 ^f
3,10±0,00	10	72	30	0,22±0,03	93,1±1,0 ^F
3,10±0,00	10	24	30	0,49±0,03	84,3±0,8 ^f
3,10±0,00	6	72	30	0,23±0,01	92,6±0,3 ^D
3,10±0,00	6	24	30	0,55±0,02	82,2±0,7 ^D
3,02±0,00	10	48	37	0,43±0,02	85,8±0,8 ^F
3,03±0,00	10	48	23	0,48±0,00	84,3±0,0 ^F
3,02±0,00	6	48	37	0,38±0,03	87,3±1,0 ^D
3,02±0,00	6	48	23	0,51±0,04	83,2±1,2 ^D
3,02±0,00	8	72	37	0,34±0,02	88,6±0,8 ^E
3,03±0,00	8	72	23	0,40±0,05	86,8±1,6 ^E
3,02±0,00	8	24	37	0,53±0,03	82,6±1,0 ^e
3,03±0,00	8	24	23	0,54±0,04	82,0±1,3 ^e
3,10±0,00	8	48	30	0,24±0,02	92,4±0,8 ^E
3,10±0,00	8	48	30	0,21±0,00	93,3±0,1 ^E
3,10±0,00	8	48	30	0,25±0,05	92,1±1,5 ^E

A–veličina inokuluma (%); B–dužina fermentacije (h); C–temperatura (°C); *Ca.m.–koncentracija aktivne materije; [#]izražene vrednosti predstavljaju ukupnu degradaciju; vrednosti obeležene velikim slovima značajno se razlikuju od kontrole sa adekvatnom veličinom inokuluma (t test, p=0,05)

Dobijeni rezultati ispitivanja uticaja veličine inokuluma, dužine trajanja fermentacije i temperature inkubacije na promene u koncentraciji ostataka hlorspirifos-metila prezentovani u **tabeli 19.2.2.4.** ukazuju da degradacija ovog pesticida kao i pri mlečnokiselinskoj fermentaciji, tako i pod uticajem kvasne fermentacije sa *S. cerevisiae* dostiže veoma visok nivo od maksimum 93,3 % redukcije u slučaju kontaminacije na nivou MDK. Međutim degradacija nije pri svim fermentacionim parametrima statistički značajno veća od kontrolnih uzoraka pre fermentacije (kod kojih je koncentracija pesticida već redukovana usled sterilizacije (~79 % – *tabela 19.1.1.*). Kada se uzme u obzir ova degradacija pod dejstvom sterilizacije, s obzirom da do spontane degradacije praktično i ne dolazi (maksimum 1,5 % – *tabela 19.1.3.*), može se zaključiti da, nakon aplikacije hlorspirifos-metila na pšenicu u koncentraciji od 3 mg/kg, sâm *S. cerevisiae* prouzrokuje degradaciju ovog pesticida, do svega max ~14 % redukcije.

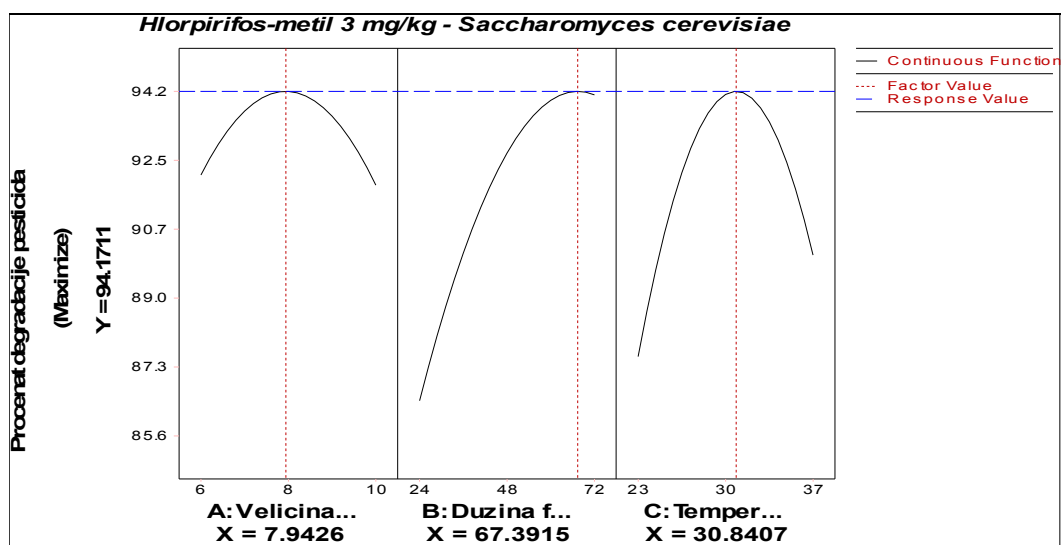
Značajnosti efekata faktora i njihovih interakcija za degradaciju hlorspirifos-metila na ovom koncentracionom nivou (MDK) prikazane su na **grafikonu 19.2.2.7.**



Grafikon 19.2.2.7. Pareto grafikon značajnosti uticaja fermentacionih parametara na degradaciju hlorspirifos-metila (MDK) pri fermentaciji sa *S. cerevisiae*

Prezentovani podaci upućuju na to da na stepen degradacije hlorspirifos-metila aplikovanog u koncentraciji od 3 mg/kg, pri fermentaciji pšenice sa *S. cerevisiae*, značajno utiče samo dužina trajanja kvasne fermentacije, dok temperatura i veličina inokuluma nemaju efekta na ovaj odziv.

Rezultati optimizacije fermentacionih parametara kvasne fermentacije u cilju određivanja njihovih optimalnih nivoa pri kojima se dostiže maksimalan nivo degradacije hlorspirifos-metila (MDK), prikazani na **grafikonu 19.2.2.8.**, pokazuju da su optimalni uslovi za postizanje maksimalne degradacije hlorspirifos-metila nakon aplikacije 3 mg/kg pšenice: fermentacija sa *S. cerevisiae* u trajanju od 67 h pri temperaturi od ~30 °C i uz inokulaciju na nivou od ~8% (v/w). Pri ovim uslovima degradacija pesticida dostiže 94,2 %.



Grafikon 19.2.2.8. Optimizacija kvasne fermentacije u pravcu postizanja najvećeg stepena degradacije hlorspirifos-metila koncentracije 3 mg/kg

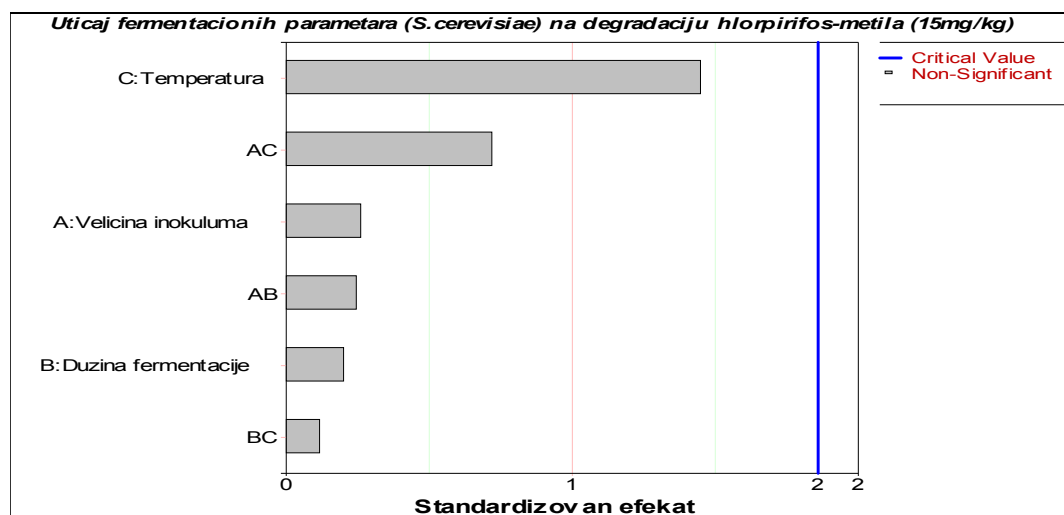
Rezultati ispitivanja uticaja fermentacionih parametara na degradaciju hlorspirifos-metila koncentracije 15 mg/kg prikazani u **tabeli 19.2.2.5.** ukazuju da pri ovom nivou koncentracije pesticida, pod uticajem fermentacije sa *S. cerevisiae* dolazi do još većeg nivoa degradacije od maksimum čak 98 % redukcije, odnosno max ~19 % redukcije prouzrokovane samim kvascem, kada se uzme u obzir degradacija postignuta pre inokulacije od ~79 % (usled sterilizacije – *tabela 19.1.1.*), s obzirom da do spontane degradacije praktično da i ne dolazi (maksimum 1,5 % – *tabela 19.1.3.*). Poređenjem dobijenih rezultata sa kontrolnim uzorcima pre inokulacije uočava se da je, u slučaju koncentracije od 15 mg/kg, postignuta degradacija pesticida pri svim fermentacionim parametrima statistički značajno veća.

Tabela 19.2.2.5. Uticaj kvasne fermentacije pšeničnog supstrata na degradaciju hlorspirifos-metila aplikovanog u koncentraciji na nivou 5xMDK

Početna Ca.m. * (mg/kg)	A	B	C	Preostala Ca.m. (mg/kg)	Stepen degradacije (%) [#]
14,99±0,01	6	0	-	3,38±0,11	77,5±0,7 ^d
15,00±0,01	8	0	-	3,39±0,15	77,4±1,0 ^e
14,99±0,00	10	0	-	3,37±0,22	77,6±1,5 ^f
14,99±0,01	10	72	30	0,55±0,19	96,4±1,3 ^F
14,99±0,01	10	24	30	0,67±0,03	95,5±0,2 ^F
14,98±0,01	6	72	30	0,68±0,03	95,5±0,2 ^D
15,00±0,00	6	24	30	0,73±0,10	95,2±0,7 ^D
14,99±0,01	10	48	37	0,64±0,03	95,7±0,2 ^F
14,99±0,02	10	48	23	0,45±0,13	97,0±0,9 ^F
15,00±0,01	6	48	37	0,75±0,02	95,0±0,1 ^D
14,99±0,02	6	48	23	0,29±0,19	98,0±1,3 ^D
14,99±0,02	8	72	37	0,45±0,05	97,0±0,3 ^E
14,99±0,01	8	72	23	0,39±0,11	97,4±0,7 ^E
14,99±0,01	8	24	37	0,39±0,06	97,4±0,4 ^E
15,00±0,01	8	24	23	0,38±0,02	97,5±0,1 ^E
14,99±0,01	8	48	30	0,64±0,00	95,7±0,0 ^E
14,99±0,01	8	48	30	0,65±0,03	95,7±0,2 ^E
15,00±0,00	8	48	30	0,75±0,05	95,0±0,3 ^E

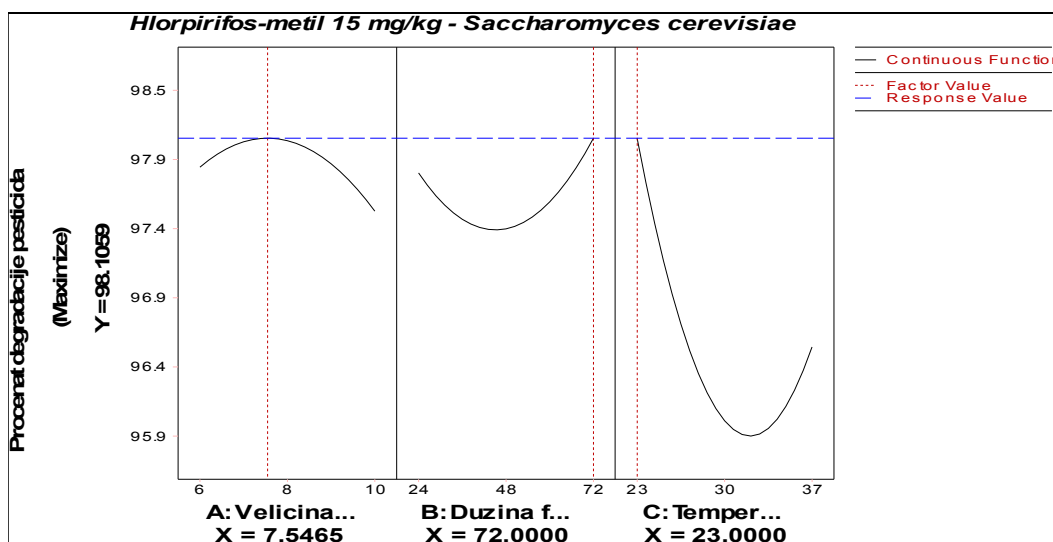
A–veličina inokuluma (%); B–dužina fermentacije (h); C–temperatura (°C); *Ca.m.–koncentracija aktivne materije; [#]izražene vrednosti predstavljaju ukupnu degradaciju; vrednosti obeležene velikim slovima značajno se razlikuju od kontrole sa adekvatnom veličinom inokuluma (t test, p=0,05)

Značajnosti efekata pojedinačnih faktora i njihovih interakcija za degradaciju hlorspirifos-metila na ovom koncentracionom nivou (5xMDK) prikazane su na **grafikonu 19.2.2.9.**



Grafikon 19.2.2.9. Pareto grafikon značajnosti uticaja fermentacionih parametara na degradaciju hlorspirifos-metila (5xMDK) pri fermentaciji sa *S. cerevisiae*

Pri fermentaciji pšenice sa kvascem, variranje ni jednog od fermentacionih parametara u ispitivanom opsegu ne utiče značajno na stepen degradacije hlorspirifos-metila aplikovanog u koncentraciji od 15 mg/kg, te se, statistički posmatrano, može očekivati da će degradacija biti na sličnom nivou pri svim ispitivanim uslovima. Rezultati optimizacije prikazani su na **grafikonu 19.2.2.10**.



Grafikon 19.2.2.10. Optimizacija kvasne fermentacije u pravcu postizanja najvećeg stepena degradacije hlorspirifos-metila koncentracije 15 mg/kg

Maksimalna redukcija bifentrina od 98,1 %, sa znatnim udelom uticaja samog kvasca, postiže se već pri najnižoj ispitivanoj temperaturi od 23 °C, ali tek nakon najdužeg trajanja fermentacije od 72 sata uz inokulaciju na nivou od ~8% (v/w).

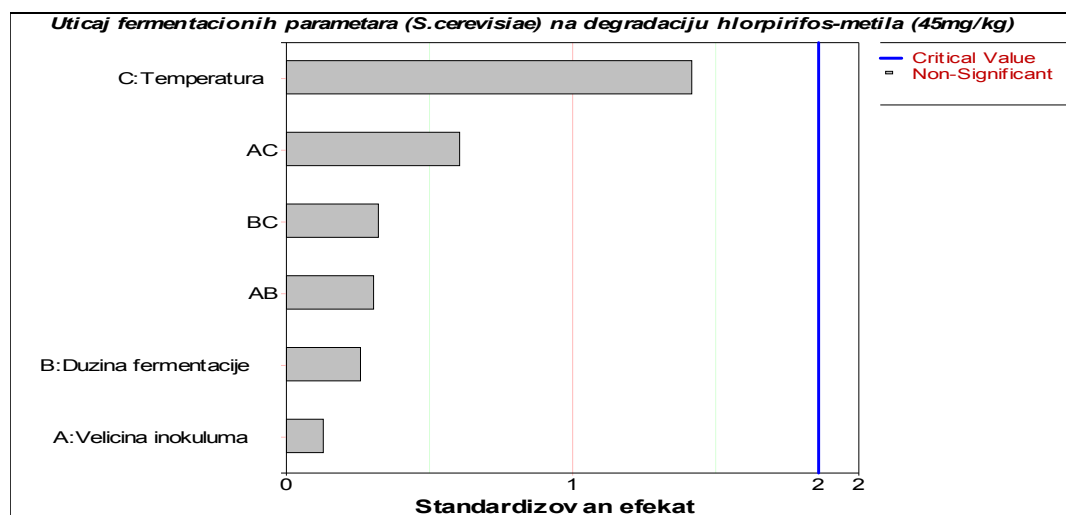
Rezultati ispitivanja uticaja fermentacionih parametara na degradaciju hlorspirifos-metila koncentracije 45 mg/kg prikazani u **tabeli 19.2.2.6**. ukazuju da, u slučaju kontaminacije na nivou 15xMDK, degradacija pesticida pod uticajem fermentacije sa *S. cerevisiae* dostiže nešto niži nivo redukcije od maksimum 97,4 %, pri čemu je degradacija pri svim fermentacionim parametrima statistički značajno veća od redukcije nakon sterilizacije (~79 % – *tabela 19.1.1.*) (tj. od uzoraka ispitivanih na degradaciju odmah nakon inokulacije). Ne uzimajući u obzir spontanu degradaciju bez inokulacije (od max 1,5 % – *tabela 19.1.3.*), zaključak je da nakon aplikacije hlorspirifos-metila na pšenicu u koncentraciji od 45 mg/kg, sâm *S. cerevisiae* u nešto manjoj meri prouzrokuje degradaciju pesticida, do max ~18 % redukcije.

Tabela 19.2.2.6. Uticaj kvasne fermentacije pšeničnog supstrata na degradaciju hlorspirifos-metila aplikovanog u koncentraciji na nivou 15xMDK

Početa Ca.m. * (mg/kg)	A	B	C	Preostala Ca.m. (mg/kg)	Stepen degradacije (%) [#]
45,23±0,03	6	0	-	8,90±0,72	80,3±1,6 ^d
45,23±0,04	8	0	-	9,67±0,72	78,6±1,6 ^e
45,21±0,05	10	0	-	8,97±0,45	80,2±1,0 ^f
45,28±0,01	10	72	30	3,77±0,22	91,7±0,5 ^f
45,23±0,06	10	24	30	4,98±0,27	89,0±0,6 ^f
45,25±0,03	6	72	30	3,87±0,08	91,5±0,2 ^D
45,21±0,02	6	24	30	4,20±0,45	90,7±1,0 ^D
45,25±0,01	10	48	37	2,25±0,22	95,0±0,5 ^F
45,24±0,01	10	48	23	1,40±0,41	96,9±0,9 ^F
45,23±0,06	6	48	37	3,71±0,39	91,8±0,9 ^D
45,28±0,00	6	48	23	1,19±0,69	97,4±1,5 ^D
45,23±0,03	8	72	37	2,96±0,00	93,5±0,0 ^E
45,27±0,03	8	72	23	2,35±0,63	94,8±1,4 ^E
45,25±0,04	8	24	37	3,13±0,54	93,1±1,2 ^E
45,27±0,01	8	24	23	1,64±0,93	96,4±0,3 ^E
45,27±0,00	8	48	30	3,54±0,00	92,2±0,0 ^E
45,23±0,00	8	48	30	4,53±0,05	90,0±0,1 ^E
45,26±0,01	8	48	30	4,31±0,40	90,5±0,9 ^E

A–veličina inokuluma (%); B–dužina fermentacije (h); C–temperatura (°C); *Ca.m.–koncentracija aktivne materije; [#]izražene vrednosti predstavljaju ukupnu degradaciju; vrednosti obeležene velikim slovima značajno se razlikuju od kontrole sa adekvatnom veličinom inokuluma (t test, p=0,05)

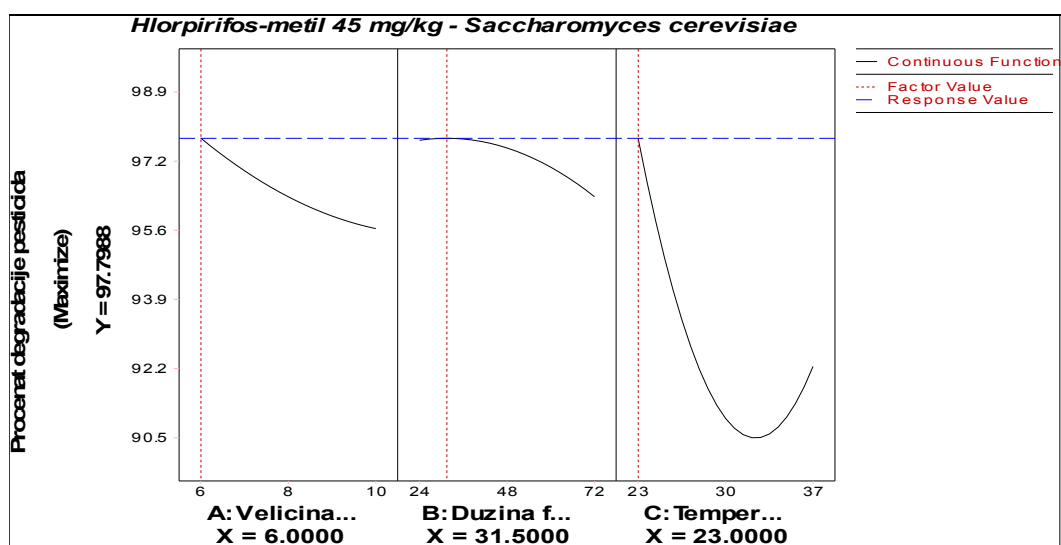
Značajnosti efekata faktora za degradaciju hlorspirifos-metila na ovom koncentracionom nivou (15xMDK) prikazane su na **grafikonu 19.2.2.11.**



Grafikon 19.2.2.11. Pareto grafikon značajnosti uticaja fermentacionih parametara na degradaciju hlorspirifos-metila (15xMDK) pri fermentaciji sa *S. cerevisiae*

Prezentovani podaci ukazuju na to da, pri fermentaciji pšenice sa *S. cerevisiae*, variranje ni jednog od fermentacionih parametara u ispitivanom opsegu ne utiče značajno na stepen degradacije hlorspirifos-metila aplikovanog u koncentraciji od 45 mg/kg, što znači da se, statistički posmatrano, može očekivati da će degradacija biti na sličnom nivou pri svim ispitivanim uslovima.

Rezultati optimizacije parametara kvasne fermentacije u cilju određivanja optimalnih nivoa pri kojima se dostiže maksimalan nivo degradacije hlorspirifos-metila (15xMDK), prikazani su na **grafikonu 19.2.2.12.**



Grafikon 19.2.2.12. Optimizacija kvasne fermentacije u pravcu postizanja najvećeg stepena degradacije hlorspirifos-metila koncentracije 45 mg/kg

Sa prikazanog grafikona može se videti da se veoma izražena maksimalna redukcija hlorspirifos-metila od 97,8 % dostiže već nakon kraće fermentacije sa *S. cerevisiae* (31 h) i pri najmanjoj ispitivanoj temperaturi od 23 °C uz inokulaciju na nivou od 6% (v/w).

Uopšteno posmatrano *S. cerevisiae* utiče na redukciju hlorspirifos-metila u pšeničnom supstratu na nešto nižem nivou, od svega 14-19 %, bez pravilnosti u odnosu na primenjenu koncentraciju pesticida. Predpostavka je da se, bez obzira na postojanje inhibicije rasta *S. cerevisiae* u hranjivoj podlozi (naročito pri većim kontaminacijama sa pesticidom – *Tabela 16.2.2.*), u pšeničnom supstratu dostiže brojnost populacije kvasca dovoljna za postizanje dobijene blage redukcije količine rezidua prouzrokovane enzimatskom aktivnošću ovog mikroorganizma. Dodatno,

bez obzira na to što prisustvo hlorspirifos-metila u većoj meri inhibira rast populacije kvasca u odnosu na populaciju laktobacila, uticaj *S. cerevisiae* na degradaciju hlorspirifos-metila nešto je veći od uticaja *L. plantarum* na isti pesticid. Obrazloženje je, svakako, u ranije prikazanim rezultatima uticaja ovog pesticida na smanjenje efikasnosti kvasne fermentacije pšenice izraženu kroz slabije snižavanje pH vrednost (Grafikon 17.2.2.). Naime, imajući u vidu da je hlorspirifos-metil jedinjenje čija je hidrolitička degradacija umereno pH-zavisna, pri čemu se ubrzava sa povećanjem pH, očigledno je da upravo manja kiselost sredine (pH se veoma često nije spuštala ispod 6 u uzorcima kontaminiranim hlorspirifos-metilom) donekle ubrzava hemijsku degradaciju ovog pesticida, što, uz mikrobiološku aktivnost, dodatno povećava nivo ukupne degradacije.

Rezultati ispitivanja uticaja fermentacionih parametara na degradaciju bifentrina koncentracije 0,5 mg/kg prikazani su u tabeli 19.2.2.7.

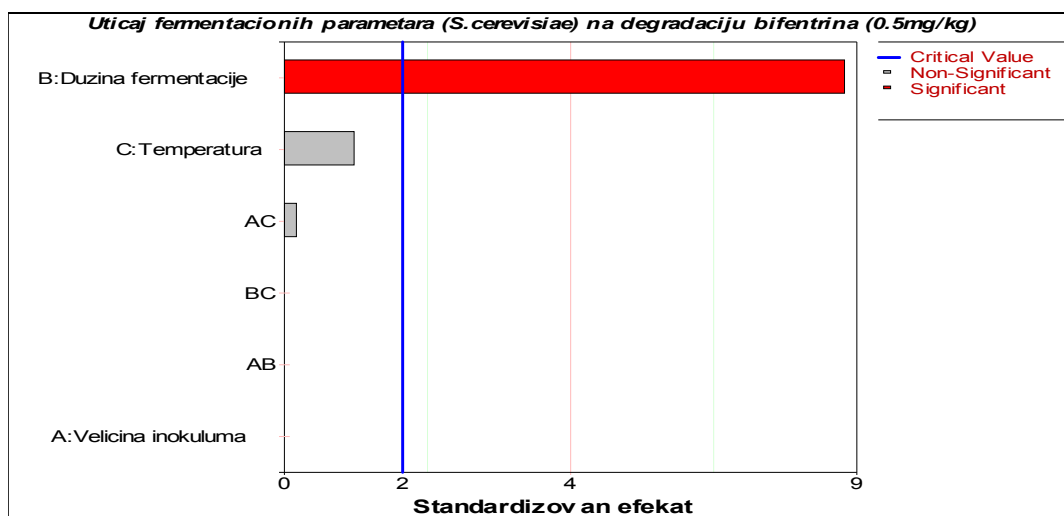
Tabela 19.2.2.7. Uticaj kvasne fermentacije pšeničnog supstrata na degradaciju bifentrina aplikovanog u koncentraciji na nivou MDK

Početna Ca.m. * (mg/kg)	A	B	C	Preostala Ca.m. (mg/kg)	Stepen degradacije (%) [#]
0,51±0,00	6	0	-	0,41±0,01	19,2±0,6 ^d
0,51±0,00	8	0	-	0,41±0,01	19,1±1,5 ^e
0,51±0,00	10	0	-	0,41±0,01	18,6±1,2 ^f
0,51±0,00	10	72	30	0,28±0,01	44,6±0,6 ^F
0,51±0,00	10	24	30	0,41±0,01	19,2±0,8 ^f
0,51±0,00	6	72	30	0,28±0,01	45,3±1,1 ^D
0,51±0,00	6	24	30	0,41±0,01	19,7±1,4 ^d
0,51±0,00	10	48	37	0,32±0,01	37,7±0,8 ^F
0,51±0,00	10	48	23	0,33±0,01	34,2±1,0 ^F
0,51±0,00	6	48	37	0,31±0,01	38,1±1,4 ^D
0,51±0,00	6	48	23	0,34±0,01	32,7±0,8 ^D
0,51±0,00	8	72	37	0,28±0,00	45,1±0,0 ^E
0,51±0,00	8	72	23	0,29±0,01	43,1±1,3 ^E
0,51±0,00	8	24	37	0,39±0,01	22,1±1,1 ^e
0,51±0,00	8	24	23	0,40±0,00	20,4±0,4 ^e
0,51±0,00	8	48	30	0,30±0,01	40,4±1,1 ^E
0,51±0,00	8	48	30	0,31±0,01	39,0±0,4 ^E
0,51±0,00	8	48	30	5,37±0,11	30,9±1,4 ^E

A–veličina inokuluma (%); B–dužina fermentacije (h); C–temperatura (°C); *Ca.m.–koncentracija aktivne materije; [#]izražene vrednosti predstavljaju ukupnu degradaciju; vrednosti obeležene velikim slovima značajno se razlikuju od kontrole sa adekvatnom veličinom inokuluma (t test, p=0,05)

Dobijeni rezultati ispitivanja uticaja veličine inokuluma, dužine trajanja fermentacije i temperature na degradaciju bifentrina ukazuju da degradacija pod uticajem fermentacije sa *S. cerevisiae* pri kontaminaciji na nivou MDK dostiže nivo od maksimum 45,3 % redukcije, pri čemu, kada se uzmu u obzir degradacija postignuta pre inokulacije (redukcija usled sterilizacije od ~18 % – *tabela 19.1.1.*), i spontana degradacija pri ovim eksperimentalnim uslovima od maksimum 3 % (*Tabela 19.1.4.*), uočava se da sâm *S. cerevisiae* prouzrokuje maksimum ~24 % redukcije aktivne materije. Kada se dobijeni rezultati uporede sa kontrolnim uzorcima pre inokulacije uočava se da postoji velika razlika u degradacijama postignutim pri različitim fermentacionim parametrima, pri čemu vrednosti nisu u svim slučajevima statistički značajno veće od kontrole. Ovo govori u prilog izraženijem uticaju variranja parametara fermentacije u ispitivanom opsegu.

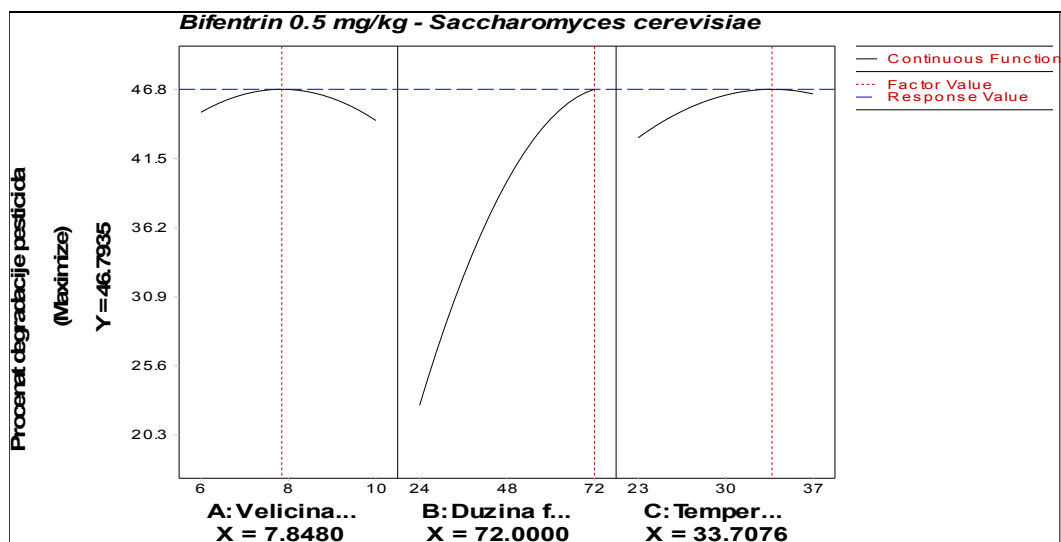
Značajnosti efekata pojedinačnih faktora i njihovih interakcija za degradaciju bifentrina (MDK) prikazane su na **grafikonu 19.2.2.13.**



Grafikon 19.2.2.13. Pareto grafikon značajnosti uticaja fermentacionih parametara na degradaciju bifentrina (MDK) pri fermentaciji sa *S. cerevisiae*

Podaci pokazuju da na stepen degradacije bifentrina (koncentracije 0,5 mg/kg), pri kvasnoj fermentaciji pšenice, značajno utiče samo dužina trajanja fermentacije, dok temperatura, a naročito veličina inokuluma, nemaju efekta.

Rezultati optimizacije ispitivanih fermentacionih parametara u cilju određivanja njihovih optimalnih nivoa pri kojima se postiže maksimalni stepen degradacije bifentrina (MDK) prikazani su na **grafikonu 19.2.2.14.**



Grafikon 19.2.2.14. Optimizacija kvasne fermentacije u pravcu postizanja najvećeg stepena degradacije bifentrina koncentracije 0,5 mg/kg (MDK)

Sa prikazanog grafikona može se videti da se maksimalna redukcija bifentrina od 46,8 % dostiže tek nakon 72 sata fermentacije sa *S. cerevisiae* pri temperaturi od 34 °C i uz inokulaciju na nivou manjem od 8% (v/w).

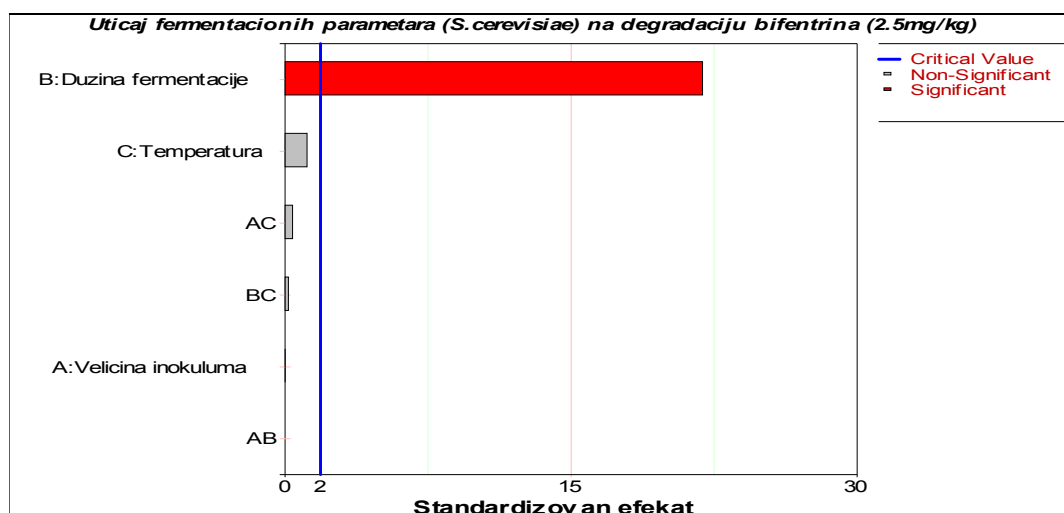
Dobijeni rezultati ispitivanja uticaja veličine inokuluma, dužine trajanja fermentacije i temperature inkubacije na degradaciju bifentrina koncentracije 2,5 mg/kg prikazani u **tabeli 19.2.2.8.** ukazuju da degradacija pod uticajem fermentacije sa *S. cerevisiae* pri kontaminaciji na ovom nivou dostiže nešto viši nivo od maksimum 48,7 % redukcije, pri čemu, kada se uzmu u obzir degradacija postignuta pre inokulacije (redukcija usled sterilizacije od ~18 % – *tabela 19.1.1.*), i spontana degradacija pri ovim eksperimentalnim uslovima od maksimum 3 % (*Tabela 19.1.4.*), sâm *S. cerevisiae* prouzrokuje maksimum ~28 % redukcije aktivne materije. Kada se dobijeni rezultati uporede sa kontrolnim uzorcima pre inokulacije uočava se da i na ovom koncentracionom nivou postoji velika razlika u degradacijama postignutim pri različitim fermentacionim parametrima, pri čemu vrednosti nisu u svim slučajevima statistički značajno veće od kontrole. Ovo govori u prilog izraženijem uticaju variranja parametara fermentacije u ispitivanom opsegu.

Tabela 19.2.2.8. Uticaj kvasne fermentacije pšeničnog supstrata na degradaciju bifentrina aplikovanog u koncentraciji na nivou 5xMDK

Početna Ca.m. * (mg/kg)	A	B	C	Preostala Ca.m. (mg/kg)	Stepen degradacije (%) [#]
2,53±0,00	6	0	-	2,02±0,04	20,0±1,5 ^d
2,53±0,00	8	0	-	2,04±0,02	19,6±0,7 ^e
2,53±0,00	10	0	-	2,03±0,04	19,8±1,5 ^f
2,53±0,00	10	72	30	1,33±0,03	47,7±1,3 ^F
2,53±0,00	10	24	30	2,04±0,02	19,4±0,9 ^f
2,53±0,00	6	72	30	1,35±0,01	46,9±0,4 ^D
2,53±0,00	6	24	30	2,05±0,03	19,1±1,2 ^d
2,53±0,00	10	48	37	1,74±0,00	31,4±0,0 ^F
2,53±0,00	10	48	23	1,77±0,01	30,2±0,4 ^F
2,53±0,00	6	48	37	1,69±0,02	33,5±0,8 ^D
2,53±0,00	6	48	23	1,77±0,03	30,2±1,2 ^D
2,53±0,00	8	72	37	1,30±0,03	48,7±1,1 ^E
2,53±0,00	8	72	23	1,34±0,00	46,9±0,1 ^E
2,53±0,00	8	24	37	2,01±0,03	20,4±1,3 ^e
2,53±0,00	8	24	23	2,03±0,02	19,9±0,9 ^e
2,53±0,00	8	48	30	1,69±0,03	33,1±1,2 ^E
2,53±0,00	8	48	30	1,63±0,02	35,5±0,8 ^E
2,53±0,00	8	48	30	1,66±0,01	34,5±0,4 ^E

A–veličina inokuluma (%); B–dužina fermentacije (h); C–temperatura (°C); *Ca.m.–koncentracija aktivne materije; [#]izražene vrednosti predstavljaju ukupnu degradaciju; vrednosti obeležene velikim slovima značajno se razlikuju od kontrole sa adekvatnom veličinom inokuluma (t test, p=0,05)

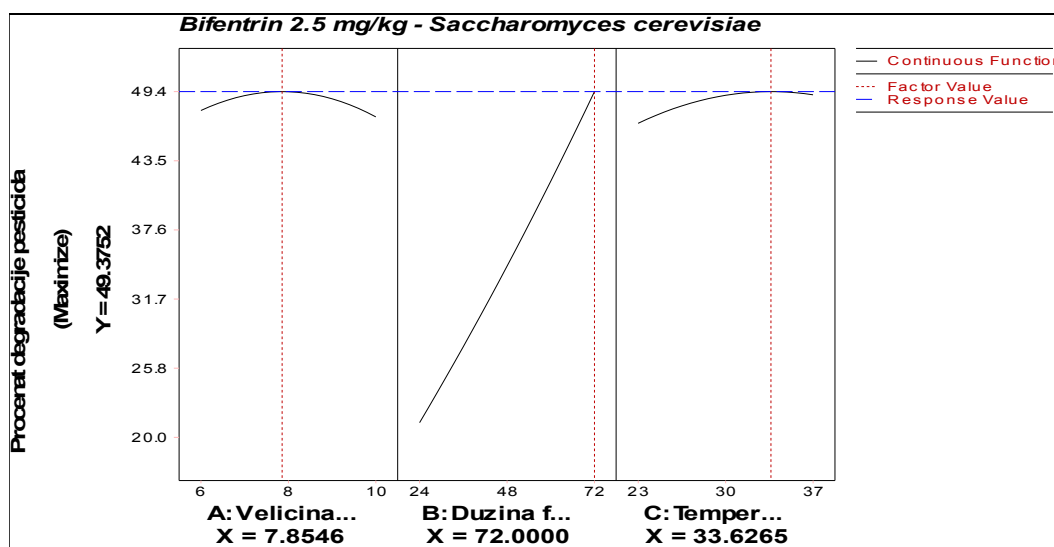
Značajnosti efekata pojedinačnih faktora i njihovih interakcija za degradaciju bifentrina (5xMDK) prikazane su na **grafikonu 19.2.2.15.**



Grafikon 19.2.2.15. Pareto grafikon značajnosti uticaja fermentacionih parametara na degradaciju bifentrina (5xMDK) pri fermentaciji sa *S. cerevisiae*

Podaci prezentovani na **grafikonu 19.2.2.15.** ukazuju na to da na stepen degradacije bifentrina u toku fermentacije sa *S. cerevisiae* i pri ovoj koncentraciji pesticida značajno utiče samo dužina trajanja kvasne fermentacije, dok temperatura inkubacije, a naročito veličina inokuluma, nemaju efekta na ovaj odziv.

Rezultati optimizacije ispitivanih fermentacionih parametara u cilju određivanja njihovih optimalnih nivoa pri kojima se postiže maksimalni stepen degradacije bifentrina (5xMDK) prikazani su na **grafikonu 19.2.2.16.**



Grafikon 19.2.2.16. Optimizacija kvasne fermentacije u pravcu postizanja najvećeg stepena degradacije bifentrina koncentracije 2,5 mg/kg (5xMDK)

Sa prikazanog grafikona može se videti da se maksimalna redukcija bifentrina od 49,4 % dostiže tek nakon 72 sata fermentacije sa *S. cerevisiae* pri temperaturi od 34 °C i uz inokulaciju na nivou manjem od 8% (v/w). Procent degradacije pri ovoj koncentraciji bifentrina je nešto veći u poređenju sa predhodnim, dok su optimalni fermentacioni parametri potrebni za postizanje maksimalne degradacije praktično na istim nivoima.

Rezultati ispitivanja uticaja fermentacionih parametara na degradaciju bifentrina koncentracije 7,5 mg/kg prikazani su u **tabeli 19.2.2.9.**

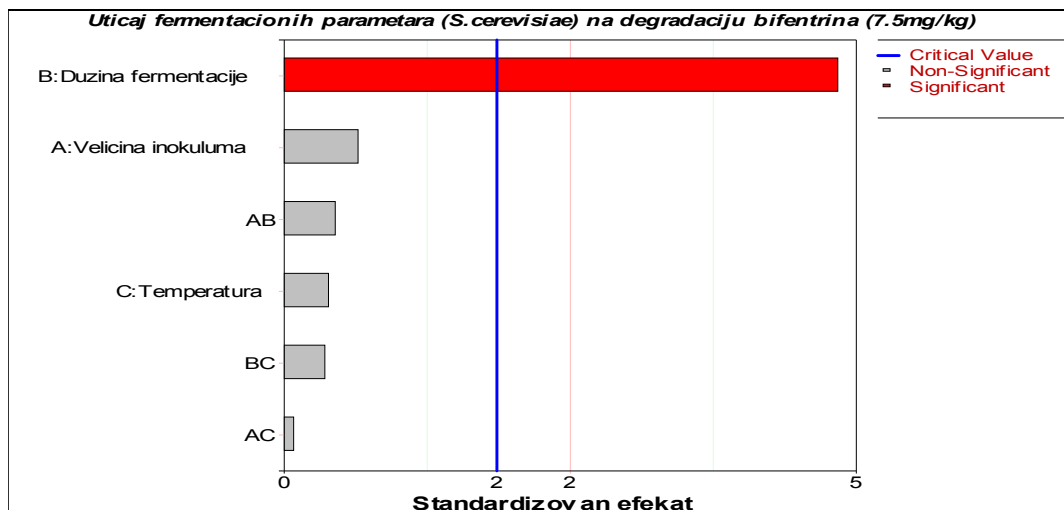
Tabela 19.2.2.9. Uticaj kvasne fermentacije pšeničnog supstrata na degradaciju bifentrina aplikovanog u koncentraciji na nivou 15xMDK

Početna Ca.m. * (mg/kg)	A	B	C	Preostala Ca.m. (mg/kg)	Stepen degradacije (%) [#]
7,61±0,01	6	0	-	5,98±0,13	21,4±1,7 ^d
7,61±0,01	8	0	-	6,0±0,08	21,2±1,1 ^e
7,61±0,01	10	0	-	6,07±0,07	20,1±0,9 ^f
7,62±0,00	10	72	30	5,36±0,05	29,7±0,6 ^F
7,61±0,01	10	24	30	5,72±0,05	24,8±0,6 ^F
7,61±0,01	6	72	30	5,11±0,07	32,9±0,8 ^D
7,60±0,00	6	24	30	5,64±0,05	25,9±0,7 ^D
7,61±0,00	10	48	37	5,11±0,00	32,8±0,0 ^F
7,61±0,00	10	48	23	5,22±0,09	31,4±1,1 ^F
7,60±0,00	6	48	37	5,13±0,00	32,5±0,0 ^D
7,62±0,00	6	48	23	5,21±0,00	31,6±0,0 ^D
7,61±0,01	8	72	37	4,93±0,05	35,2±0,6 ^E
7,61±0,00	8	72	23	4,88±0,09	35,9±1,2 ^E
7,61±0,00	8	24	37	5,56±0,00	26,9±0,0 ^E
7,62±0,00	8	24	23	5,65±0,11	25,9±1,4 ^E
7,61±0,00	8	48	30	5,25±0,00	31,1±0,0 ^E
7,61±0,00	8	48	30	5,31±0,05	30,2±0,7 ^E
7,61±0,00	8	48	30	5,33±0,08	30,0±1,1 ^E

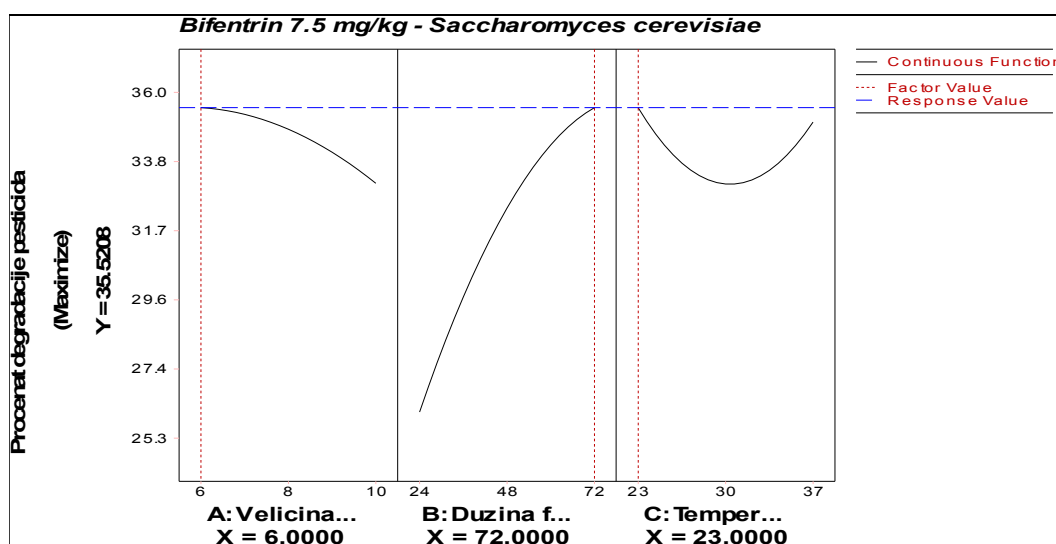
A–veličina inokuluma (%); B–dužina fermentacije (h); C–temperatura (°C); *Ca.m.–koncentracija aktivne materije; [#]izražene vrednosti predstavljaju ukupnu degradaciju; vrednosti obeležene velikim slovima značajno se razlikuju od kontrole sa adekvatnom veličinom inokuluma (t test, p=0,05)

Prezentovani rezultati ispitivanja ukazuju da pri ovom nivou obogaćivanja bifentrinom, pod uticajem fermentacije sa *S. cerevisiae* dolazi do znatno manjeg nivoa degradacije od maksimum 35,9 %, odnosno, uzimajući u obzir degradaciju postignutu pre inokulacije od ~17 % (usled sterilizacije – tabela 19.1.1.), i spontanu degradaciju pri od maksimum 3 % (Tabela 19.1.4.), svega max ~16 % redukcije prouzrokovane samim kvascem. Poređenjem dobijenih rezultata sa kontrolnim uzorcima pre inokulacije uočava se da je, u slučaju koncentracije od 7,5 mg/kg, postignuta degradacija pesticida pri svim fermentacionim parametrima statistički značajno veća.

Značajnosti efekata pojedinačnih faktora i njihovih interakcija za degradaciju bifentrina (15xMDK) prikazane su na **grafikonu 19.2.2.17.**, a dodatni rezultati optimizacije ispitivanih fermentacionih parametara u cilju određivanja njihovih optimalnih nivoa pri kojima se postiže maksimalni stepen degradacije bifentrina (15xMDK) prikazani su na **grafikonu 19.2.2.18.**



Grafikon 19.2.2.17. Pareto grafikon značajnosti uticaja fermentacionih parametara na degradaciju bifentrina (15xMDK) pri fermentaciji sa *S. cerevisiae*



Grafikon 19.2.2.18. Optimizacija kvasne fermentacije u pravcu postizanja najvećeg stepena degradacije bifentrina koncentracije 2,5 mg/kg (15xMDK)

I pri najvećoj ispitivanoj koncentraciji bifentrina, na stepen degradacije ovog pesticida u toku fermentacije sa *S. cerevisiae* značajno utiče samo dužina trajanja kvasne fermentacije, dok temperatura inkubacije, a naročito veličina inokuluma, nemaju efekta na ovaj odziv, što pokazuju podaci prezentovani na **grafikonu 19.2.2.17.**

Maksimalna redukcija bifentrina od 35,5 % dostiže se tek nakon 72 sata fermentacije sa *S. cerevisiae*, ali već na temperaturi od 23 °C i uz inokulaciju na

nivou od 6% (v/w), kao što može da se vidi na **grafikonu 19.2.2.18.** Dakle, maksimalni, ali mali procenat degradacije, sa malim udeom uticaja samog kvasca u ukupnoj redukciji, postiže se na nižoj temperaturi, ali tek nakon znatno dužeg trajanja fermentacije sa *S. cerevisiae*.

Uopšteno posmatrano, može se zaključiti da *S. cerevisiae* u velikoj meri utiče na redukciju bifentrina u pšeničnom supstratu, međutim ovaj efekat je znatno izraženiji samo u slučaju obogaćivanja sa 0,5 i 2,5 mg/kg pesticida i iznosi 24-28 %. U uzorcima obogaćenim sa 7,5 mg/kg, kvasac u veoma maloj meri utiče na redukciju ostataka (~16 %). S obzirom da je poznato da do abiotičke hidrolize bifentrina ne dolazi ni u kiseloj, ni u neutralnoj, ni baznoj sredini, očigledno je da je redukcija količine rezidua u toku kvasne fermentacije prouzrokovana isključivo enzimatskom aktivnošću ovog mikroorganizma. Kada se rezultati porede sa rezultatima degradacije bifentrina pod dejstvom laktobacila, može se konstatovati da kvasac u znatno manjoj meri ima sposobnost enzimatske razgradnje ovog pesticida, pri čemu se trend smanjenja stepena degradacije sa porastom koncentracije kontaminacije objašnjava ranije prezentovanim rezultatima o postojanju slabije inhibicije rasta *S. cerevisiae* pri većim kontaminacijama sa bifentrinom (*Tabela 16.2.3.*).

Sumirajući sve predhodne rezultate može se utvrditi da fermentacija pšenice sa *Saccharomyces cerevisiae* dovodi do redukcije rezidua sva tri ispitivana pesticida. Kada se posmatra ukupna degradacija u toku fermentativnog procesa, hlörpirifosmetil je najpodložniji redukciji koja dostiže nivo od 93-98 %, nešto manja redukcija zabeležena je kod pirimifos-metila (63-77 %), a najmanja kod bifentrina (36-49 %), sa manje-više uniformnom pravilnošću u opadanju degradacije sa porastom koncentracije. Međutim, ako bi se izdvojio uticaj isključivo aktivnosti kvasca, redosled je potpuno suprotan, pa tako *S. cerevisiae* u najvećoj meri degradira bifentrin (16-28 %), nešto manje pirimifosmetil (3-30 %), a najmanje hlörpirifosmetil (14-19 %). Sposobnost ćelija *S. cerevisiae* da adsorbuju neorganske i organske kontaminante kao što su pesticidi dokazana je u brojnim publikacijama [208-212], a vezuje se za polisaharide ćelijskog zida kvasca [213]. Ruediger i sar. (2005) su takođe pomenuli da je verovatno da do redukcije u koncentraciji pesticida dolazi zbog adsorpcije ovih jedinjenja na ćelijske zidove mikroorganizama, a ne usled njihove hemijske ili biološke degradacije [207]. Međutim, kako u ovom

eksperimentu, u toku ekstrakcije fermentisanih uzoraka obogaćenih pesticidima, ćelije kvasca ostaju u ekstrakcionom supstratu, ako bi se određena količina pesticida i adsorbovala na polisaharide ćelijskih zidova, ona bi svakako bila ekstrahovana sa ostacima, tako da je, kao što je Boethling (1993) još ranije konstatovao [206], redukcija količine pesticida u ispitivanim fermentisanim uzorcima očigledno posledica biološke degradacije tj. enzimatske aktivnosti koja se javlja ili odmah ili nakon određenog perioda adaptacije mikroba na hemijsko jedinjenje. Ovoj teoriji u prilog ide i to što je bifentrin, koji je najviše degradiran pod uticajem kvasca, imao od svih pesticida najmanje negativan efekat na njegov rast, kao i to što je veća degradacija svih ispitivanih pesticida uglavnom zabeležena pri manjim koncentracijama kontaminacije u čijem prisustvu je dostignuta veća brojnost ćelija u supstratu. Procenat kvasne degradacije pirimifos-metila (za razliku od mlečnokiselinske) dostignut u ovom eksperimentu je tek neznatno veći od degradacije hlorspirifos-metila, što može da se obrazloži pH-zavisnom hemijskom degradacijom ovih jedinjenja. Naime, s obzirom da pirimifos-metil više degradira u kiseljoj, a hlorspirifos-metil u baznoj sredini, a znajući da se pH pšeničnog supstrata pri kvasnoj fermentaciji često nije spuštala ispod 6, ne iznenađuje da je procenat degradacije dostignut za oba pesticida na približnom nivou.

Na kraju, dobijeni rezultati degradacije ispitivanih pesticida pod dejstvom mlečnokiselinske i kvasne fermentacije u saglasnosti su sa brojnim publikacijama koje jasno ukazuju na značajnu ulogu mikroorganizama u degradaciji pesticida u različitim prehrambenim proizvodima [64,68,101,108-110,112-114,117-119,189,202,203,207,214-216], a, sudeći po dobijenim rezultatima, procesi fermentacije pšenice sa *L. plantarum* i sa *S. cerevisiae* ispitivani u ovom eksperimentu mogu se efikasno koristiti kao sredstvo za redukciju potencijalne kontaminacije pšenice sa ispitivanim pesticidima iznad njihovih MDK vrednosti. Ovo je još jedna potvrda mogućnosti korišćenja ne samo tehnološko zahtevnijih nego i jednostavnijih procesa prerade hrane u svrhu smanjenja količine ostataka pesticida u prehrambenim proizvodima, što svakako nudi široku perspektivu za pronalazak rešavanja problema zdravstvene bezbednosti hrane.

ZAKLJUČCI

20. ZAKLJUČCI

U skladu sa ciljevima istraživanja, a na osnovu prikazanih rezultata, izvode se sledeći zaključci:

- Eksponecijalna faza rasta *L. plantarum* u MRS bujonu u datim laboratorijskim uslovima završava se nakon 24 h na 30 °C, dok se ekspancijalna faza rasta *S. cerevisiae* u YPD bujonu završava nakon 5 h na 30 °C.
- Optimizacijom fermentacija pšeničnog supstrata u laboratorijskim uslovima utvrđeno je da se maksimalna efikasnost fermentacije sa *L. plantarum* dostiže nakon 72 h pri 30 °C i uz inokulaciju od 6% (v/w), a maksimalna efikasnost fermentacije sa *S. cerevisiae* nakon 24 h pri od 37 °C i uz inokulaciju od 8% (v/w).
- I *L. plantarum* i *S. cerevisiae* slabo su osetljivi na prisustvo bifentrina u podlogama za rast, dok prisustvo organofosfata u velikoj meri negativno utiče na rast fermentativnih mikroorganizama u podlozi, pri čemu značajnije na kvasac. Pirimifos-metil za obe vrste mikroorganizama ima najveći negativan impakt na rast.
- Prisustvo pirimifos-metila i hlorspirifos-metila, iako negativno utiče na porast brojnosti *L. plantarum* u pšeničnom supstratu, ne odražava se negativno na mlečnokiselinsku fermentaciju pšenice izraženu kroz snižavanje pH vrednosti i produkciju mlečne kiseline, dok prisustvo bifentrina u manjoj meri utiče na oba pokazatelja efikasnosti fermentacije.
- Prisustvo sva tri ispitivana pesticida negativno utiče kako na porast brojnosti *S. cerevisiae* u pšeničnom supstratu, tako i na ukupnu kvasnu fermentaciju pšenice izraženu kroz snižavanje pH vrednosti i produkciju CO₂.
- Od tri testirane analitičke metode za pripremu uzoraka za određivanje ostataka ispitivanih pesticida u fermentisanim supstratima *Metoda 2*, odnosno kombinacija florisila i smeše etil-acetat:aceton=4:1, uz korišćenje 25 mL eluenta za ispiranje kolone, pokazala se kao najadekvatnija i odabrana je za praćenje degradacije ispitivanih pesticida u toku fermentacije. Dobijeni prinosi ove metode su 93,0-96,0 % za pirimifos-metil, 82,8-88,2 % za hlorspirifos-metil i 80,5-82,6 % za bifentrin sa relativnim standardnim devijacijama od 2,2-3,5 %; 2,5-4,6 % i 2,2-4,1 %, za ova tri pesticida.

- Sterilizacija pšenice obogaćene ispitivanim pesticidima u najvećoj meri dovodi do redukcije rezidua hlorthirifos-metila (max. ~79 %), znatno manje pirimifos-metila (max. ~50 %), dok na smanjenje koncentracije bifentrina skoro da i nema uticaja (max. 18 %).
- U toku inkubacije na 23, 30 i 37 °C nakon 24, 48 i 72 h (bez prisustva mikroorganizama) dolazi do spontane degradacije pirimifos-metila u proseku za max. 10 %, hlorthirifos-metila u proseku za max. 1,5 %, a bifentrina u proseku za max. 3 %.
- Fermentacija pšenice sa *Lactobacillus plantarum* dovodi do redukcije rezidua sva tri ispitivana pesticida, pri čemu je kada se posmatra ukupna degradacija u toku fermentativnog procesa, hlorthirifos-metil najpodložniji redukciji (88-93 %), nešto manja redukcija zabeležena je kod pirimifos-metila (71-82 %), a najmanja kod bifentrina (35-65 %).
- Kada se posmatra uticaj isključivo aktivnosti *L. plantarum*, on u najvećoj meri degradira bifentrin (15-44 %), nešto manje pirimifos-metil (10-27 %), a najmanje hlorthirifos-metil (9-14 %).
- Fermentacija pšenice sa *Saccharomyces cerevisiae* dovodi do redukcije rezidua sva tri ispitivana pesticida, pri čemu je kada se posmatra ukupna degradacija u toku fermentativnog procesa, hlorthirifos-metil najpodložniji redukciji (93-98 %), nešto manja redukcija zabeležena je kod pirimifos-metila (63-77 %), a najmanja kod bifentrina (36-49 %).
- Kada se posmatra uticaj isključivo aktivnosti *S. cerevisiae*, on u najvećoj meri degradira bifentrin (16-28 %), nešto manje pirimifos-metil (3-30 %), a najmanje hlorthirifos-metil (14-19 %).
- Degradacija pirimifos-metila i bifentrina veća je u toku mlečnokiselinske fermentacije, dok je degradacija hlorthirifos-metila veća u toku kvasne fermentacije pšenice.
- Procesi fermentacije pšenice sa *L. plantarum* i sa *S. cerevisiae* mogu se efikasno koristiti kao sredstvo za redukciju potencijalne kontaminacije pšenice sa pirimifos-metilom, hlorthirifos-metilom i bifentrinom iznad njihovih MDK vrednosti.

LITERATURA

- [1] <http://www.fao.org>
- [2] An X., Li Q., Yan Y., Xiao Y., Hsam S.L.K., Zeller F.J. (2005): Genetic diversity of European spelt wheat (*Triticum aestivum* ssp. *spelta* L. em. Thell.) revealed by glutenin subunit variations at the Glu-1 and Glu-3 loci. *Euphytica*, 146(3): 193–201.
- [3] Campbell K.G. (1997): Spelt: agronomy, genetic and breeding. In: J. Janick (ed) *Plant Breeding Reviews, Bulletins and Technical Reports*. 15: 187–213.
- [4] Bogнар A., Kellermann C. (1993): Vergleichende untersuchungen über den gehalt an vitaminen in dinkel, weizen und roggen. *Ernährungsforschung*, 38: 149–170.
- [5] Bojnanska T., Francakova H. (2002): The use of spelt wheat (*Triticum spelta* L.) for baking applications. *Rostlinna Vyroba*, 48(4): 141–147.
- [6] Abdel-Aal E.-S.M., Hucl P., Sosulski F.W. (1995): Compositional and nutritional characteristics of spring einkorn and spelt wheats. *Cereal Chemistry*, 72(6): 621–624.
- [7] Bonafaccia G., Galli V., Francisci R., Mair V., Skrabanja V., Kreft I. (2000): Characteristics of spelt wheat products and nutritional value of spelt wheatbased bread. *Food Chemistry*, 68(4): 437–441.
- [8] Rozenberg R., Ruibal-Mendieta N.L., Petitjean G., Cani P., Delacroix D.L., Delzenne N.M., Meurens M., Quetin-Leclercq J., Habib-Jiwan J.L. (2003): Phytosterol analysis and characterization in spelt (*Triticum aestivum* ssp. *spelta* L.) and wheat (*T. aestivum* L.) lipids by LC/APCI-MS. *Journal of Cereal Science*, 38(2): 189–197.
- [9] Abdel-Aal E.-S.M., Hucl P. (2005): Hairless canary seed: a potential food crop. In: E.-S.M. Abdel-Aal and P. Wood (eds), *Specialty Grains for Food and Feed*. American Association of Cereal Chemists, St Paul, MN, USA.
- [10] Živanovic V., (2002): Određivanje tragova aktivnih materija nekih pesticida kinetičkim metodama analize. Doktorska teza, PMF-Niš.
- [11] Pimentel D., Levitan L. (1986): Amounts applied and amounts reaching pests. *Bioscience*, 36(2): 86–91.
- [12] Van der Werf H.M.G. (1996): Evaluating the impact of pesticides on the environment. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 60(2-3): 81–96.

[13] Taylor E.L., Holley A.G., Kirk M. (2007): Pesticide development a brief look at the history, southern regional extension forestry. A Regional Peer Reviewed Publication.

[14] <http://www.epa.gov/pesticides>

[15] Srivastava S., Goyal P., Srivastava M.M. (2010): Pesticides: past, present and future. In: L.M.L. Nollet and H.S. Rathore (eds), Handbook of Pesticides: Methods of Pesticide Residues Analysis. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA, 47–65.

[16] EU document No.310.

[17] www.minpolj.gov.rs

[18] Meljnikov N.N. (1974): Himija i tehnologija pesticidov. Himia, Moskva.

[19] Kolojanova-Simeonova F. (1980): Pesticidi, toksiceskoe dejstvije i profilaktika. Medicina, Moskva.

[20] FAO/WHO Food Standards Codex Alimentarius. Current Official Standards No. CAC/MRL 1 (2008) Maximum residue limits (MRLs) for pesticides.

[21] Council Directive 91/414/EEC of 15 July 1991 concerning the placing of plant protection products on the market (1991) Off J Eur Un L 230: 1–154.

[22] Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 concerning the placing of plant protection products on market and repealing Council Directives 79/117/EEC and 91/414/EEC (2009) Off J Eur Un L 309: 1–50.

[23] Directive 2009/128/EC of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 establishing a framework for community action to achieve the sustainable use of pesticides (2009) Off J Eur Un L 309: 71–86.

[24] Službeni glasnik RS (2010) Pravilnik o maksimalno dozvoljenim količinama ostataka sredstava za zaštitu bilja u hrani i hrani za životinje za koju se utvrđuju maksimalno dozvoljene količine ostataka sredstava za zaštitu bilja. 25/10.

[25] Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues, JMPR.

[26] Janjić M., Mitrić S. (2004): Pesticidi u poljoprivredi i šumarstvu. Poljoprivredni fakultet, Banja Luka.

[27] Arthur F.H. (1996): Grain protectant: current status and prospects for the future. Journal of Stored Products Research, 32(4): 293–302.

[28] White N.D.G., Leesch J.G. (1996): Chemical control. In: B.H. Subramanyam and D.W.Hagstrum (eds.) *Integrated Management of Insects in Stored Products*, Marcel Dekker, NewYork-Basel-Hong Kong, 287–330.

[29] Daghilish G.J. (2006): Opportunities and barriers to the adoption of potential new grain protectants and fumigants. *Proceedings of the 9th International Working Conference on Stored Product Protection*, Campinas, Brazil, 209–216.

[30] Kljajić P. (2008): Suzbijanje štetnih insekta uskladištenog žita. U: P. Kljajić (urednik) *Zaštita uskladištenih biljnih proizvoda od štetnih organizama*. Institut za pesticide i zaštitu životne sredine, Beograd, 67–100.

[31] Fleurat-Lessard F., Chaurand M., Marchegay G., Abecassis J. (2007): Effects of processing on the distribution of pirimiphos-methyl residues in milling fractions of durum wheat. *Journal of Stored Products Research*, 43(4): 384–395.

[32] WHO specifications and evaluations of public health pesticides. Pirimiphos methyl.

http://www.who.int/whopes/quality/en/Pirimiphos_methyl_eval_may_06.pdf

[33] Službeni glasnik RS (2010) Pravilnik o klasifikaciji, pakovanju, obeležavanju i reklamiranju hemikalije i određenog proizvoda. 59/10.

[34] WHO recommended classification of pesticides by hazard (2009).

[35] Tomlin C.D.S. (2003): *The pesticide manual*. 13th edn. British Crop Protection Council, Alton.

[36] Rigterink R.H., Kenaga E.E. (1966): Synthesis and insecticidal activity of some O,O-dialkyl 0-3,5,6-trihalo-2-pyridyl phosphates and phosphorothioates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 14(3): 304–306.

[37] Wilkin D.R., Binns T., Haubruge E., Shires, S. (1994): The development of a grain protectant, containing the pyrethroid bifenthrin, which has the potential for lower terminal residues. In: E. Highley, E.J. Wright, H.J. Banks and B.R. Champ (eds.) *Stored Product Protection*. Wallingford CAB International, 863–866.

[38] Wilkin D.R., Fleurat-Lessard F., Haubruge E., Serrano B. (1999): Developing a new grain protectant—efficacy testing in Europe. In: Z. Jin, Q. Liang, Y. Liang, X. Tan and L. Guan (eds.) *Stored Product Protection*. *Proceedings of the Seventh International Working Conference on Storedproduct Protection*, Beijing,

China, 14–19 October 1998. Chengdu, Sichuan Publishing House of Science and Technology, 880–890.

[39] Doel H.J.H., Crossman A.R., Bourdouxhe L.A. (1984): Physical properties, toxicology and review of field studies. *Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen Rijksuniversiteit*, 49(3a): 929–934.

[40] Crossman A.R., Bourdouxhe L.A., Doel H.J.H. (1984): Field experiences in West Europe with FMC 54800 for the control of mites in orchards, vineyards and other crops. *Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen Rijksuniversiteit*, 49(3a): 939–945.

[41] Miller T.A., Salgado V.L. (1985): The mode of action of pyrethroids on insects. In: J.P. Leahy (ed.) *The Pyrethroid Insecticides*. Taylor & Francis, London, 43–97.

[42] Clark J.M., Matsumura F. (1982): Two different types of inhibitory effects of pyrethroids on nerve Ca- and Ca + Mg ATPase in the squid, *Loligo pealea*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 18(2): 180-190

[43] Mokrey L.E., Hoagland K.D. (1990): Acute toxicities of five synthetic pyrethroid insecticides to *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 9(8): 1045-1051.

[44] Liu H., Zhao M., Zhang C., Ma Y., Liu W. (2008): Enantioselective cytotoxicity of the insecticide bifenthrin on a human amnion epithelial (FL) cell line. *Toxicology*, 253(1–3): 89–96

[45] Stajkovic J., Amidžić B., Biočanin J. (2009): Pesticidi i izvori zagađenja u životnoj sredini i značaj remedijacije u sanaciji kontaminacije. 1st International Conference Ecological Safety in Post-Modern Environment 26-27. Jun 2009. Banja Luka, RS, BiH

[46] Chin H.B. (1997): The effect of processing on pesticide residues in processed fruits and vegetables. *Book of Abstracts, 213th ACS National Meeting, San Francisco, April 13–17, AGFD-189*. Washington, DC: American Chemical Society.

[47] Langlois B.E., Liska B.J., Hill D.L. (1964): The effects of processing and storage of dairy products on chlorinated insecticide residue DDT and lindane. *Journal of Milk and Food Technology*, 27(9): 264–267.

[48] Li C., Bradley R.L.Jr., Schultz L.H. (1970): Fate of organochlorine pesticides during processing of milk into dairy products. *Journal of the Association of Official Agricultural Chemists*, 53(1): 127–139.

[49] Abu-Elamayem M.M., Abdel-Aal A., Tantawy G.A., Marei A.S.M., (1979): Fate of leptophos in milk and wheat during the processing steps. *Alexandria Journal of Agricultural Research*, 27(3): 659–663.

[50] Askew J., Mitchell T.H., Thomson J., Wheals B.B. (1968): The gas chromatographic examination of organophosphorous pesticides. *Journal of Chromatography*, 32: 417–418.

[51] Elkins E.R., Farrow R.P., Kim E.S. (1972): The effect of heat processing and storage on pesticide residues in spinach and apricots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 20(2): 286–291.

[52] Marshall W.D. (1982): Preprocessing oxidative washes with alkaline hypochlorite to remove ethylenebis (dithiocarbamate) fungicide residues from tomatoes and green beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30(4): 649–652.

[53] Nath G., Agnihotri S. (1984): Removal of endosulfan from bitter gourds by home processings. *Pesticides*, 18(8): 13–15.

[54] Muahammad S., Kawar N.S. (1985): Behavior of parathion in tomatoes processed into juice and ketchup. *Journal of Environmental Science and Health Part B – Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes*, 20(5): 499–510.

[55] Lalah J.O., Wandiga S.O. (2002): The effect of boiling on the removal of persistent malathion residues from stored grains. *Journal of Stored Products Research*, 38(1): 1–10.

[56] de Castro M.F.P.M., Oliveira, J.J.do.V., Rodrigues, J., Loredó, I.S.D. (2002): A study on the persistence of trifluralin, chlorpyrifos, decamethrin, cypermethrin and dichlorvos in rice and beans after cooking in a commercial microwave oven. In P.F. Credland, D.M. Armitage, C.H. Bell, P.M. Cogan and E. Highley (eds.) *Advances in stored product protection. Proceedings of the 8th international working conference on stored product protection, York, UK, 22–26 July 2002*, 517–521.

[57] Abou-Arab A.A.K., Abou-Donia M.A. (2001): Pesticide residues in some Egyptian spices and medicinal plants as affected by processing. *Food Chemistry*, 72(4): 439–445.

[58] Habiba R.A., Ali H.M., Ismail S.M.M. (1992): Biochemical effects of profenofos residues in potatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(10): 1852–1855.

[59] Radwan M.A., Abu-Elamayem M.M., Shiboob M.H., Abdel-Aal A. (2005): Residual behavior of profenofos on some field-grown vegetables and its removal using various washing solutions and household processing. *Food and Chemical Toxicology*, 43(4): 553–557.

[60] Fahey J.E., Nelson P.E., Ballee D.L. (1970): Removal of Gardona from fruit by commercial preparative methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 18(5): 866–868.

[61] Krishnamurthy V.V., Sreeramulu U.S. (1982): Studies on rice bran and rice bran oil. VI. Pesticides accumulation in the rice bran. *Madras Agricultural Journal*, 69(12): 820–821.

[62] Cogburn R.R., Simonaitis R.A., Webb B.D. (1990): Fate of malathion and chlorpyrifos methyl in rough rice and milling fractions before and after parboiling and cooking. *Journal of Economic Entomology*, 83(4): 1636–1639.

[63] Ong K.C., Cash J.N., Zabik M.J., Saddiq M., Jones A.L. (1996): Chlorine and ozone washes for pesticide removal from apples and processed apple sauce. *Food Chemistry*, 55(2): 153–160.

[64] Abou-Arab A.A.K. (1999): Effects of processing and storage of dairy products on lindane residues and metabolites. *Food Chemistry*, 64(4): 467–473.

[65] Abou-Arab A.A.K. (1999a): Behavior of pesticides in tomatoes during commercial and home preparation. *Food Chemistry*, 65(4): 509–514.

[66] Kontou S., Tsipi D., Tzia C. (2004): Stability of the dithiocarbamate pesticide maneb in tomato homogenates during cold storage and thermal processing. *Food Additives and Contaminants*, 21(11): 1083–1089.

[67] Holland P.T., Hamilton D., Ohlin B., Skidmore M.W. (1994): Effects of storage and processing on pesticide residues in plant products. *IUPAC Reports on Pesticides (31)*. *Pure and Applied Chemistry*, 66(2): 335–356.

[68] Sharma J., Satya S., Kumar V., Tewary D.K. (2005): Dissipation of pesticides during bread making. *Journal of Chemical Health and Food Safety*, 17–22.

[69] Hegazy M.E.A., Abdel-Razik M., Diab M.M., Abu-Zahw M.M. (1988): Sumithion residues on and in potato tubers. *Annals of Agricultural Science – Cairo*, 33(2): 1291–1298.

[70] Awasthi M.D. (1993): Decontamination of insecticide residues on mango by washing and peeling. *Journal of Food Science Technology*, 30(2): 132–133.

[71] Miyahara M., Saito Y. (1994): Effects of the processing steps in tofu production on pesticide residues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(2): 369–373.

[72] Mergnat T., Fritsch P., Saint-Joly C., Truchot E., Saint-Blanquat G. (1995): Reduction in phosalone residue levels during industrial dehydration of apples. *Food Additives and Contaminants*, 12(6): 759–767.

[73] Cabras P., Angioni A., Garau V.L., Melis M., Pirisi F.M., Cabitza F., Cubeddu M. (1998): Pesticide residues on field-sprayed apricots and in apricot drying processes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(6): 2306–2308.

[74] Cabras P., Angioni A., Garau V.L., Melis M., Pirisi F.M., Cabitza F., Pala M. (1998): Pesticide residues in raisin processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(6): 2309–2311.

[75] Athanasopoulos P.E., Pappas C., Kyriakidis N.V., Thanos A. (2005): Degradation of methamidophos on sultana grapes on the vines and during refrigerated storage. *Food Chemistry*, 91(2): 235–240.

[76] Lentza-Rizos C., Balokas A. (2001): Residue levels of chlorpropham in individual tubers and composite samples of postharvest-treated potatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2): 710–714.

[77] Cengiz M.F., Certel M., Karakas B., Gocmen H. (2006): Residue contents of DDVP (dichlorvos) and diazinon applied on cucumbers grown in greenhouses and their reduction by duration of a pre-harvest interval and post-harvest culinary applications. *Food Chemistry*, 98(1): 127–135.

[78] Uygun U., Ozkara R., Ozbey A., Koksel H. (2007): Residue levels of malathion and fenitrothion and their metabolites in post-harvest treated barley during storage and malting. *Food Chemistry*, 100(3): 1165–1169.

[79] Snelson J.T. (1987): Grain protectants. ACIAR monograph series (Australia), 3: 448. Canberra, Australia: Australian Centre for International Agricultural Research.

[80] Wilkin D.R., Fishwick F.B. (1981): Residues of organophosphorous pesticides in wholemeal flour and bread produced from treated wheat. In British crop protection conference – pests and diseases, proceedings, 11th, 1: 183–187.

[81] Rowlands D.G. (1975): Metabolism of insecticides on gains. Residue Reviews, 58: 113–155.

[82] Alnaji L.K., Kadoum A.M. (1979): Residues on methyl phoxim in wheat and milling fractions. Journal of Agricultural Food Chemistry, 27(3): 583–584.

[83] Marei A.E., Khattab M.M., Mansee A.H., Youssef M.M., Montasser M.R. (1995): Analysis and dissipation of deltamethrin in stored wheat and milled fractions. Alexandria Journal of Agricultural Research, 16(2): 275–291.

[84] Uygun U., Koksel H., Atli, A. (2005): Residue levels of malathion and its metabolites and fenitrothion in post-harvest treated wheat during storage, milling and baking. Food Chemistry, 92(4): 643–647.

[85] Pardez-Lopez O., Gonzales-Casteneda J., Carabenz-Trejo A.J. (1991): Influence of solid substrate fermentation on the chemical composition. Journal of Fermentation and Bioengineering, 71(1): 58–62.

[86] Friend B.A., Shahani K.M. (1984): Nutritional and therapeutic aspects of lactobacilli. Journal of Applied Nutrition, 36(2): 125-153.

[87] Sindhu S.C., Khetarpaul N. (2005): Development, acceptability and nutritional evaluation of an indigenous food blend fermented with probiotic organisms. Nutrition and Food Science, 35(1): 20–27.

[88] Barker P.S., Morrison F.O., Whitaker R.S. (1965): Conversion of DDT to DDD by proteus vulgaris, a bacterium isolated from the intestinal flora of a mouse. Nature 205(4971): 621.

[89] Chacko C.I., Lackwood J.L., Zabik M. (1966): Chlorinated hydrocarbon pesticides degradation by microbes. Science, 154(3751): 893–895.

[90] Mendel J.L., Walton M.S. (1966): Conversion of pp-DDT to pp-DDD by the intestinal flora of the rat. Science, 151(3717): 1527–1528.

- [91] Wedemeyer G. (1966): Dechlorination of DDT by aerobacter aerogenes. *Science*, 152(3722): 647.
- [92] Wedemeyer G. (1968): Partial hydrolysis of dieldrin by aerobacter aerogenes. *Journal of Applied Microbiology*, 16(4): 661-662.
- [93] Langlois B.E., Collins J.A., Sides K.G. (1970): Some factors affecting degradation of organochlorine pesticides by bacteria. *Journal of Dairy Science*, 53(12): 1671-1675.
- [94] Quensen-III J.F., Boyd S.A., Tiedje J.T. (1990): Dechlorination of four commercial polychlorinated biphenyl mixture (Aroclors) by anaerobic microorganisms from sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(8): 2360–2369.
- [95] Sahu S.K., Patnaik K.K., Sharmila M., Sethunathan N. (1990): Degradation of alpha-, beta-, and gamma-hexachlorocyclohexane by a soil bacterium under aerobic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(11): 3620–3622.
- [96] Sahu S.K., Patnaik K.K., Sethunathan N. (1992): De-hydrochlorination of d-isomer of hexachlorocyclohexane by a soil bacterium *Pseudomonas* sp. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 48(2): 265–268.
- [97] Faller J., Huhnerfuss H., König W.A., Krebber R., Ludwig P. (1991): Do marine bacteria degrade hexachlorocyclohexane stereoselectively? *Environmental Science and Technology*, 25(4): 676–678.
- [98] Hugunin A.G., Bradley Jr. R.L. (1971): Distribution of organochlorine pesticides among some milk components. *Journal of Dairy Science*, 54(3): 355.
- [99] Rachev R., Lotov I., Sergeeva D. (1974): Attempts to reduce contents of chlorinated pesticides in milk and milk products. *Veterinarnomeditsinski Nauki* 11(5): 87–92.
- [100] Niewiadowska A., Semeniuk S., Zmudzki J. (1996): Residues of chlorinated hydrocarbons in cheeses [Pozostałości chlorowanych węglowodorów aromatycznych w serach.]. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*, 47(4): 371–376.
- [101] Abou-Arab A.A.K. (1997): Effect of Ras cheese manufacturing on the stability of DDT and its metabolites. *Food Chemistry*, 59(1): 115–119.

[102] Rajashekar K., Kondal Reddy K., Narasimha Reddy K., Sudhakar Reddy K. (2007): Effect of processing of milk into products on the residue levels of certain pesticides. *Journal of Food Science and Technology*, 44(5): 551–552.

[103] Bo L.-Y., Zhao X.-H. (2010): Preliminary study on the degradation of seven organophosphorus pesticides in bovine milk during lactic acid fermentation or heat treatment. *African Journal of Microbiology Research*, 4(11): 1171–1179.

[104] Lemperle E. (1975): Residus de pesticides dans les mouts et les vins. Presented at the 4th Symposium d'Oenologie International, Valencia, Spain, May 26-29: 453.

[105] Cabras P., Meloni M., Pirisi F.M. (1987): Pesticide fate from vine to wine. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 99(1): 83–117.

[106] Zironi R., Farris G.A., Cabras P., Fatichenti F. (1991): Pesticide residues from vine to wine. *Proceedings of the Accademia Italiana della Vite e del Vino*, 43(3): 351–369.

[107] Farris G.A., Cabras P., Spanedda L. (1992): Pesticide residues in food processing. *Italian Journal of Food Science*, 3(2): 149–169.

[108] Sala C., Fort F., Busto O., Zamora F., Arola L., Guasch J. (1996): Fate of Some Common Pesticides during Vinification Process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(11): 3668–3671.

[109] Cabras P., Angioni A., Garau V.L., Pirisi F.M., Cabitza F., Pala M., Farris G.A. (2000): Fate of quinoxifen residues in grapes, wine, and their processing products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(12): 6128–6131.

[110] Fernández M.J., Oliva J., Barba A., Cámara M.A. (2005): Fungicide dissipation curves in winemaking processes with and without maceration step. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(3): 804–811.

[111] de Melo Abreu S., Caboni P., Pirisi F.M., Cabras P., Alves A., Garau V.L. (2006): Residues of the fungicide famoxadone in grapes and its fate during wine production. *Food Additives and Contaminants*, 23(3): 289–294.

[112] Garau V.L., De Abreu S.M., Caboni P., Angioni A., Alves A., Cabras P. (2009): Residue-free wines: Fate of some quinone outside inhibitor (Qol) fungicides in the winemaking process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(6): 2329–2333.

[113] Čuš F., Česnik H.B., Bolta Š.V., Gregorčič A. (2010): Pesticide residues in grapes and during vinification process. *Food Control*, 21(11): 1512–1518.

[114] Abou-Arab A.A.K. (2002): Degradation of organochlorine pesticides by meat starter in liquid media and fermented sausage. *Food and Chemical Toxicology*, 40(1): 33–41.

[115] Banna A.A., Kawar N.S. (1982): Behavior of parathion in apple juice processed into cider and vinegar. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 17 (5): 505–514.

[116] Azizi A. , Homayouni A. (2009): Bacterial-degradation of pesticides residue in vegetables during fermentation. *Asian Journal of Chemistry*, 21(8): 6255–6264.

[117] Cho K.M., Math R.K., Islam S.M., Lim W.J., Hong S.Y., Kim J.M., Yun M.G., Cho J.J., Yun H.D. (2009): Biodegradation of Chlorpyrifos by Lactic Acid Bacteria during Kimchi Fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(5): 1882–1889.

[118] Gupta M., Shanker A. (2009): Fate of imidacloprid and acetamiprid residues during black tea manufacture and transfer into tea infusion. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 26(2): 157–163.

[119] Jung J.-K., Park S.-Y., Kim S.-H., Kang J.-M., Yang J.-Y., Kang S.-A., Chun H.-K., Park K.-Y. (2009): Removal Effects of Bifenthrin and Metalaxyl Pesticides during Preparation and fermentation of Baechu Kimchi. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 38(9): 1258–1264.

[120] Navarro S., Pérez G., Navarro G., Mena L., Vela N. (2006): Decay of dinitroaniline herbicides and organophosphorus insecticides during brewing of lager beer. *Journal of Food Protection*, 69(7): 1699–1706.

[121] Navarro S., Pérez, G. Navarro G., Vela N. (2007): Decline of pesticide residues from barley to malt. *Food Additives and Contaminants*, 24(8): 851–859.

[122] Rivera-Espinoza Y., Gallardo-Navarro Y. (2010): Non-dairy probiotic products. *Food Microbiology*, 27(1): 1–11.

[123] Hidvégi M., Rásó E., Tömösközi-Farkas R., Szende B., Paku S., Prónai L., Bócsi J., Lapis K. (1999): MSC, a new benzoquinone- containing natural product

with antimetastatic effect. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 14(3): 277–289.

[124] Leroy F., De Vuyst L. (2004): Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food industry. *Trends in Food Science and Technology* 15(2): 67–78.

[125] Kandler O. (1983): Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria, *Antonie van Leeuwenhoek*, 49(3): 209–224.

[126] Salminen S., von Wright A., Morelli L., Marteau P., Brassart D., de Vos W.M., Fondén R., Saxelin M., Collins K., Mogensen G., Birkeland S.E., Mattila-Sandholm T. (1998): Demonstration of safety of probiotics- a review. *International Journal of Food Microbiology*, 44(1-2): 93–106.

[127] Borriello S.P., Hammes W.P., Holzapfel W., Marteau P., Schrezenmeir J., Vaara M, Valtonen V. (2003): Safety of probiotics that contain lactobacilli or bifidobacteria. *Clinical Infectious Diseases*, 36(6): 775–780.

[128] Kandler O., Weiss N. (1986): Regular, non-sporing gram-positive rods. In: P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe, J.G. Holt (eds), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 2. Williams & Wilkins, Baltimore/London/Los Angeles/Sydney, pp. 1208–1234.

[129] Hofvendahl K., Hahn-Hägerdal B. (2000): Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme and Microbial Technology*, 26(2-4):87–107.

[130] Axelsson L. (2004): Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: S. Salminen, A. von Wright, A. Ouwehand (eds), *Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects*, 3rd ed. Marcel Dekker Inc., New York, Basel.

[131] Klein G., Pack A., Bonaparte C., Reuter G. (1998): Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 41(2): 103–125.

[132] Holzapfel W.H. (2002): Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *International Journal of Food Microbiology*, 75(3): 197–212.

[133] Bernardeau M., Vernoux J.P., Henri-Dubernet S., Gueguen M. (2008): Safety assessment of dairy microorganisms: the *Lactobacillus* genus. *International Journal of Food Microbiology*, 126(3): 278–285.

[134] Claesson M.J., van Sinderen D., O'Toole P.W. (2008): *Lactobacillus* phylogenomics – towards reclassification of the genus. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(12): 2945–2954.

[135] Makarova K., Slesarev A., Wolf Y., Sorokin A., Mirkin B., Koonin E., Pavlov A., Pavlova N., Karamychev V., Polouchine N., Shakhova V., Grigoriev I., Lou Y., Rohksar D., Lucas S., Huang K., Goodstein D.M., Hawkins T., Plengvidhya V., Welker D., Hughes J., Goh Y., Benson A., Baldwin K., Lee J.H., Diaz-Muniz I., Dosti B., Smeianov V., Wechter W., Barabote R., Lorca G., Altermann E., Barrangou R., Ganesan B., Xie Y., Rawsthorne H., Tamir D., Parker C., Breidt F., Broadbent J., Hutkins R., O'Sullivan D., Steele J., Unlu G., Saier M., Klaenhammer T., Richardson P., Kozyavkin S., Weimer B., Mills D. (2006): Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(42): 15611–15616.

[136] Felis G.E., Dellaglio F. (2007): Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 8(2): 44–61.

[137] Panesar S.P., Kennedy J.F., Gandhi D.N., Bunko K. (2007): Bioutilization of whey for lactic acid production. *Food Chemistry*, 105(1): 1–14.

[138] De Vries M.C., Vaughan E.E., Kleerebezem M., Vos W.M (2006): *Lactobacillus plantarum*- survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *International Dairy Journal*, 16(9): 1018–1028.

[139] Leal M.V., Baras M., Ruiz-Barba J.L., Floriano B., Jimenez-Diaz R. (1998): Bacteriocin production and competitiveness of *Lactobacillus plantarum* LPCO10 in olive juice broth, a culture medium obtained from olives. *International Journal of Food Microbiology*, 43(1-2): 129–134.

[140] Arthur H., Watson K. (1976): Thermal adaptation in yeast: growth temperatures, membrane lipid, and cytochrome composition of psychrophilic, mesophilic, and thermophilic yeasts. *Journal of Bacteriology*, 128(1): 56–68.

[141] Walker G. (1998): *Yeast - Physiology and Biotechnology*. John Wiley&Sons, Chichester-New York-Weinheim-Brisbane-Singapore-Toronto.

- [142] Weusthuis R.A. (1994): Disaccharide fermentation by yeasts. Proefschrift, Technische Universiteit Delft, Delft.
- [143] Barnett J.A. (1976): The Utilization of Sugars by Yeasts. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 32(2): 125–234.
- [144] Fugelsang K.C., Edwards C.G. (2007): Wine microbiology; Practical Application and Procedures. Springer, p.138.
- [145] Van der Walt J.P., Yarrow D. (1984): Methods for the isolation, maintenance, classification and identification of yeasts. In: N.J.W. Kreger van Rij (ed), *The yeasts, a taxonomic study*. Groningen, The Netherlands, pp.45–103.
- [146] Barnett J.A., Payne R.W., Yarrow D. (2000): *Yeasts: Characteristics and identification*. Cambridge university press, Cambridge, pp.7–29.
- [147] Barnett J.A. (2004): Review: A history of research on yeasts 8: taxonomy. *Yeast*, 21(14): 1141–1193.
- [148] Lampen J.O. (1968): External Enzymes of Yeast: Their Nature and Formation. *Antonie van Leeuwenhoek*, 34(1): 1–18.
- [149] Gobbetti M. (1998): The sourdough microflora: Interactions of lactic acid bacteria and yeasts. *Trends in Food Science and Technology* 9(7): 267–274.
- [150] Simonson L., Salovaara H., Korhola M. (2003): Response of wheat sourdough parameters to temperature, NaCl and sucrose variations. *Food Microbiology*, 20(2): 193–199.
- [151] Rouzaud O., Martinez-Anaya A. (1997): Relationship between biochemical and quality related characteristics of breads, resulting from the interaction of flour, microbial starter and the type of process. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 204(5): 321–326.
- [152] Mestres R., Atmawijaya S., Chevallier C. (1979): Method of research and dosage of pesticide residues in cereal products. 1-organo-chlorine, organophosphorous, pyrethrins and pyrethrinoids (insecticides). *Annales des Falsifications et de l'Expertise Chimique*, 72(780): 577–589.
- [153] Bottomley P., Baker P.G. (1984): Multi-residue determination of pesticides in grain by gas-liquid and high performance liquid chromatography. *Analyst*, 109(1): 85–90.

[154] Nakamura Y., Tonogai Y., Tsumura Y., Ito Y. (1993): Determination of pyrethroid residues in vegetables, fruits, grains, beans, and green tea leaves: applications to pyrethroid residue monitoring studies. *Journal of AOAC International*, 76(6): 1348–1361.

[155] Pang G.F., Chao Y.Z., Fan C.L., Zhang J.J., Li X.M., Zhao T.S. (1995): Modification of AOAC multiresidue method for determination of synthetic pyrethroid residues in fruits, vegetables, and grains. Part I: Acetonitrile extraction system and optimization of florisil cleanup and gas chromatography. *Journal of AOAC International*, 78(6): 1481–1488.

[156] Pang G.F., Chao Y.Z., Fan C.L., Zhang J.J., Li X.M., Liu Y.M., Zhao T.S. (1995): Modification of AOAC multiresidue method for determination of synthetic pyrethroid residues in fruits, vegetables, and grains. Part II: Acetone extraction system. *Journal of AOAC International*, 78(6): 1489–1496.

[157] Pang G.F., Chao Y.Z., Fan C.L., Zhang J.J., Li X.M. (1997): Modification of AOAC Multiresidue Method for Determining Synthetic Pyrethroid Residues in Fruits, Vegetables, and Grains. Part III: Studies of Analyte Stability and Method Ruggedness. *Journal of AOAC International*, 80(1): 63–73.

[158] Pang G.F., Cao Y.Z., Fan C.L., Zhang J.J., Li X.M. (1999): Multiresidue gas chromatographic method for determining synthetic pyrethroid pesticides in agricultural products: Collaborative study. *Journal of AOAC International*, 82(1): 186–196.

[159] Kaushik N., Handa S.K. (1997): New clean-up method for gas chromatographic analysis of pyrethroid residues. *Chromatographia*, 46(3-4): 209–212.

[160] Kocourek V., Hajšlová J., Holadová K., Poustka J. (1998): Stability of pesticides in plant extracts used as calibrants in the gas chromatographic analysis of residues *Journal of Chromatography A*, 800(2): 297–304.

[161] Khan I.A.T., Riazuddin, Parveen Z., Ahmed M. (2007): Multi-residue determination of synthetic pyrethroids and organophosphorus pesticides in whole wheat flour using gas chromatography. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 79(4): 454–458.

[162] Uygun U., Senoz B., Koksel H. (2008): Dissipation of organophosphorus pesticides in wheat during pasta processing. *Food Chemistry* 109(2): 355–360.

[163] Uygun U., Senoz B., Ozturk S., Koksel H. (2009): Degradation of organophosphorus pesticides in wheat during cookie processing. *Food Chemistry* 117(2): 261–264.

[164] Pang G.-F., Liu Y.-M., Fan C.-L., Zhang J.-J., Cao Y.-Z., Li X.-M., Li Z.-Y., Wu Y.-P., Guo T.-T. (2006): Simultaneous determination of 405 pesticide residues in grain by accelerated solvent extraction then gas chromatography-mass spectrometry or liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 384(6): 1366–1408.

[165] Balinova A., Mladenova R., Shtereva D. (2007): Solid-phase extraction on sorbents of different retention mechanisms followed by determination by gas chromatography–mass spectrometric and gas chromatography–electron capture detection of pesticide residues in crops. *Journal of Chromatography A*, 1150(1-2): 136–144.

[166] Payá P., Anastassiades M., Mack D., Sigalova I., Tasdelen B., Oliva J., Barba A. (2007): Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389(6): 1697–1714.

[167] Walorczyk S. (2008): Development of a multi-residue method for the determination of pesticides in cereals and dry animal feed using gas chromatography–tandem quadrupole mass spectrometry II. Improvement and extension to new analytes. *Journal of Chromatography A*, 1208(1-2): 202–214.

[168] Walorczyk S. (2007): Development of a multi-residue screening method for the determination of pesticides in cereals and dry animal feed using gas chromatography–triple quadrupole tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1165(1-2): 200–212.

[169] Kolberg D.I., Prestes O.D., Adaime M.B., Zanella R. (2011): Development of a fast multiresidue method for the determination of pesticides in dry samples (wheat grains, flour and bran) using QuEChERS based method and GC–MS. *Food Chemistry* 125(4): 1436–1442.

[170] Kolberg D.I., Prestes O.D., Adaime M.B., Zanella R. (2010): A New Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC-MS) Method for the Multiresidue Analysis of Pesticides in Bread. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 21(6): 1065–1070.

[171] Koesukwiwat U., Lehotay S.J., Mastovska K., Dorweiler K.J., Leepipatpiboon N. (2010): Extension of the QuEChERS Method for Pesticide Residues in Cereals to Flaxseeds, Peanuts, and Doughs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(10): 5950–5958.

[172] Romagnoli M., Gualtieri M.L. (2009): Advantages in Using Design of experiments and artificial Neural Networks in the Study and Optimization of Ceramic Systems, Tile and Brick. *International Manual*.

[173] Ozdemir M., Ozen Banu F., Dock Lisa L., Floros John D. (2008): Optimization of osmotic dehydration of diced green peppers by response surface methodology. *LWT-Food Science and Technology*, 68(1): 1–7.

[174] Lazić Z.R. (2004): *Design of Experiments in Chemical Engineering: A Practical Guide*. Wiley–VCH, Weinheim.

[175] Jokić A. (2010): Modelovanje "cross-flow" mikrofiltracije suspenzija kvasca primenom koncepta neuronskih mreža i postupka odzivne površine. *Doktorska teza*, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.

[176] Myers R.H., Montgomery C.M. (1995): *Response surfaces methodology: process and product optimization using designed experiments*. Wiley, New York.

[177] Allen T.T. (2006): *Introduction to engineering statistics and six sigma: statistical quality control and design of experiments and systems*. Springer, London.

[178] Brereton R.G. (2003): *Applied chemometrics for scientists*. John Wiley & Sons Ltd., London.

[179] Đurović R., Đorđević, T. (2010): Metoda tečno-čvrste ekstrakcije u određivanju pesticida u uzorcima zemljišta. *Zbornik rezimea X savetovanja o zaštiti bilja*, Zlatibor, str. 135–136.

[180] Georgieva R., Koleva P., Nikolova D., Yankov D., Danova S. (2009): Growth parameters of probiotic strain *Lactobacillus plantarum*, isolated from traditional white cheese. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, XI Anniversary Scientific Conference Special Edition/On-Line, 23(SE): 861–865.

- [181] Herskowitz I. (1988): Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews*, 52(4): 536–553.
- [182] Abou Ayana I.A.A., Gamal El Deen A.A., El-Metwally M.A. (2011): Behavior of certain lactic acid bacteria in the presence of pesticides residues. *International Journal of Dairy Science* 6(1): 44–57.
- [183] Clair E., Linn L., Travert C., Amiel C., Se´ralini G.-E., Panof J.-M. (2012): Effects of Roundup and Glyphosate on Three Food Microorganisms: *Geotrichum candidum*, *Lactococcus lactis subsp. cremoris* and *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*. *Current Microbiology* 64(5): 486-491.
- [184] Fleet G.H. (2003): Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1-2): 11–22.
- [185] Shin J.-H., Kim Y.-M., Park J.-W., Kim J.-E., Rhee I.-K.(2003): Resistance of *Saccharomyces cerevisiae* to Fungicide Chlorothalonil. *The Journal of Microbiology*, 41(3): 219-22.
- [186] Čuš F. Raspor P. (2008): The effect of pyrimethanil on the growth of wine yeasts. *Letters in Applied Microbiology*, 47(1): 54–59.
- [187] Bi Fai P., Grant A. (2009): A comparative study of *Saccharomyces cerevisiae* sensitivity against eight yeast species sensitivities to a range of toxicants. *Chemosphere*, 75(3): 289–296.
- [188] Santos P.M., Simões T. Sá-Correia I. (2009): Insights into yeast adaptive response to the agricultural fungicide mancozeb: A toxicoproteomics approach. *Proteomics*, 9(3): 657–670.
- [189] Cabras P., Angioni A., Garau V.L., Pirisi F.M., Farris G.A., Madau G., Emonti G. (1999): Pesticides in Fermentative Processes of Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(9): 3854-3857.
- [190] Chaves López C., Boselli E., Piva A., Ndaghijimana M., Paparell A., Suzzi G., Mastrocola D. (2004): Influence of Quinoxifen Residues on *Saccharomyces cerevisiae* Fermentation of Grape Musts *Food Technol. Biotechnology* 42(2): 89–97.
- [191] Jawich D., Lteif R., Pfohl-Leszkowicz A., Strehaiano P. (2006): Effects of penconazole on two yeast strains: Growth kinetics and molecular studies. *Molecular Nutrition and Food Research*, 50(6): 552–556.

[192] Braconi D., Sotgiu M., Millucci L., Paffetti A., Tasso F., Alisi C., Martini S., Rappuoli R., Lusini P., Sprocati A. R., Rossi C., Santucci A. (2006): Comparative Analysis of the Effects of Locally Used Herbicides and Their Active Ingredients on a Wild-Type Wine *Saccharomyces cerevisiae* Strain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(8): 3163-3172.

[193] Braconi D., Possenti S., Laschi M., Geminiani M. Lusini, P., Bernardini G., Santucci A. (2008): Oxidative Damage Mediated by Herbicides on Yeast Cells. . *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(10): 3836–3845.

[194] Currie L.A. (1999): Detection and quantification limits: origins and historical overview. *Analytica Chimica Acta*, 391(2): 127–134.

[195] [Bengtson M., Connel M., Desmarchelier J., Philips M., Snelson J., Sticka R. (1975): Evaluation of four new grain protectants. Report to the Australian Wheat Board.

[196] Desmarchelier J.M., Bengston M., Connel M., Minnett W., Moore B., Phillips M., Snelson J., Sticka R., Tucker K. (1980): A collaborative study of residues of wheat of methacriphos, chlorpyrifos-methyl, fenitrothion, malathion and pirimiphos-methyl. II Rates of decay CSIRO Australia, Division of Entomology 20(1): 1–21.

[197] Balinova A, Mladenova R., Obretenchev D. (2006): Effect of grain storage and processing on chlorpyrifos-methyl and pirimiphos-methyl residues in post-harvest-treated wheat with regard to baby food safety requirements. *Food Additives and Contaminants*, 23(4): 391– 397

[198] Fleurat-Lessard F., Vidal M.-L., Budzinski H. (1998): Modelling Biological Efficacy Decrease and Rate of Degradation of Chlorpyrifos-methyl on Wheat Stored under Controlled Conditions. *Journal of Stored Products Research*, 34(4): 341–354.

[199] Roland L., Marien L., Sprangers O. (1995): Residues of bifenthrin and malathion in grains of wheat - flour, bran and bread. (Wheat treated with Prostore grain protectant - 1995). Report CRP/95/1363. Study BEAGX 5/1995/1148. B.E.A.Gx, Centre de Recherches de Phytopharmacie, Belgium.

[200] Kim S.C., Harmon L.G. (1968): Effect of insecticides residues on growth fermentation ability of lactic culture organisms. *Journal of Milk and Food Technology*, 31(1): 97–97.

[201] Zidan Z.A., Fayed A.E., El-Shenawy M.A., Abpu-Arab A.A.K. (1990): Susceptibility of some lactic acid bacteria to different insecticides. *Egyptian Journal of Dairy Science*, 18(1): 11–22.

[202] Angioni A., Garau A., Caboni P., Russo M.T., Farris G.A., Zara S., Cabras P. (2005): Gas chromatographic ion trap mass spectrometry determination of zoxamide residues in grape, grape processing, and in the fermentation process *Journal of Chromatography A*, 1097(1-2): 165–170.

[203] González-Rodríguez R.M., Cancho-Grande B., Torrado-Agrasar A., Simal-Gándara J., Mazaira-Pérez (2009): Evolution of tebuconazole residues through the winemaking process of Mencía grapes. *Food Chemistry*, 117(3): 529–537

[204] Ochiai N., Fujimura M., Oshima M., Motoyama T., Ichiishi A., Yamada-Okabe H. (2002): Effects of iprodione and fludioxonil on glycerol synthesis and hyphal development in *Candida albicans*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 66(10): 2209–2215.

[205] Cabras P., Angioni A., Garau V.L., Pirisi F.M., Cabitza F., Pala M. (2001): Fenhexamid residues in grapes and wine. *Food Additives and Contaminants*, 18(7): 625–629.

[206] Boethling R.S. (1993): Biodegradation of xenobiotic chemicals. In: M. Corn (ed) *Handbook of Hazardous Materials*. Academic Press, New York, pp 55–67.

[207] Ruediger G.A., Pardon K.H., Sas A.N., Godden P.W., Pollnitz A.P. (2005): Fate of pesticides during the winemaking process in relation to malolactic fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(8): 3023–3026.

[208] Aksu Z., Dönmez G. (2003): A comparative study on the biosorption of some yeasts for Remazol Blue reactive dye. *Chemosphere*, 50(8): 1075–1083.

[209] Gomes D.S., Frago L.C., Riger C.J., Panek A.D., Eleutherio E.C.A. (2002): Regulation of cadmium uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta–General Subjects*, 1573(1): 21–25.

[210] Goyal N., Jain S.C., Banerjee U.C. (2003): Comparative studies on the microbial adsorption of heavy metals. *Advances in Environmental Research*, 7(2): 311–319.

[211] Martín-Esteban A., Fernández P., Cámara C. (1997): Baker's yeast biomass (*Saccharomyces cerevisiae*) for selective on-line trace enrichment and liquid chromatography of polar pesticide in water. *Analytical Chemistry*, 69(16): 3267–3271.

[212] Razmkhab S., López-Toledano A., Ortega J.M., Mayen M., Merida J., Medina M. (2002): Adsorption of phenolic compounds and browning products in white wines by yeasts and their cell walls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(25): 7432–7437.

[213] Ballou C.E. (1988): Organization of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. In D. E. Varner (Ed.), *Self-assembling architecture*. New York: Liss, pp. 115–117.

[214] Zhao X.-H., Wang J. (2012): A brief study on the degradation kinetics of seven organophosphorus pesticides in skimmed milk cultured with *Lactobacillus spp.* at 42 °C. *Food Chemistry* 131(1): 300–304.

[215] Navarro S., Pérez G., Vela N., Mena L., Navarro G. (2005): Behavior of Myclobutanil, Propiconazole, and Nuarimol Residues during Lager Beer Brewing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(22): 8572-8579.

[216] Bo L.-Y., Zhang Y.-H., Zhao X.-H. (2011): Degradation kinetics of seven organophosphorus pesticides in milk during yoghurt processing *Journal of Serbian Chemical Society*, 76(3): 353–362.

PRILOG

Prilog 1. Dinamika rasta ćelija *Lactobacillus plantarum* u MRS bujonu praćena merenjem promena absorbanci optičke gustine (O.D._{620nm}) i brojnosti kolonija na MRS agaru (CFU parametar)

Vreme (h)	CFU/mL	log ₁₀ CFU/mL	O.D. 620nm
0,0	327 x 10 ⁵	7,515	0,099
0,5	489 x 10 ⁵	7,689	0,104
1	499 x 10 ⁵	7,698	0,110
1,5	526 x 10 ⁵	7,721	0,118
2	535 x 10 ⁵	7,728	0,132
2,5	626 x 10 ⁵	7,797	0,157
3	655 x 10 ⁵	7,816	0,186
3,5	712 x 10 ⁵	7,852	0,229
4	818 x 10 ⁵	7,913	0,274
4,5	104 x 10 ⁶	8,016	0,326
5	115 x 10 ⁶	8,061	0,397
5,5	163 x 10 ⁶	8,213	0,474
6	206 x 10 ⁶	8,314	0,597
6,5	250 x 10 ⁶	8,398	0,714
7	342 x 10 ⁶	8,534	0,901
7,5	616 x 10 ⁶	8,790	0,961
8	736 x 10 ⁶	8,867	1,089
8,5	895 x 10 ⁶	8,952	1,182
9	948 x 10 ⁶	8,977	1,252
9,5	127 x 10 ⁷	9,105	2,500
10	101 x 10 ⁷	9,006	2,550
10,5	104 x 10 ⁷	9,018	2,680
11	128 x 10 ⁷	9,109	2,940
11,5	132 x 10 ⁷	9,120	2,930
12	146 x 10 ⁷	9,165	3,020
18	208 x 10 ⁷	9,318	3,760
24	234 x 10 ⁷	9,369	4,940
25	254 x 10 ⁷	9,404	5,210
26	265 x 10 ⁷	9,423	5,210
27	272 x 10 ⁷	9,435	5,240
28	282 x 10 ⁷	9,450	5,240
29	254 x 10 ⁷	9,405	5,280
30	248 x 10 ⁷	9,394	5,330
31	238 x 10 ⁷	9,376	5,350
32	230 x 10 ⁷	9,361	5,390
48	131 x 10 ⁷	9,117	5,380
50	105 x 10 ⁷	9,021	5,350
52	589 x 10 ⁶	8,770	5,300
54	422 x 10 ⁶	8,625	5,270

Prilog 2. Dinamika rasta ćelija *Saccharomyces cerevisiae* u YPD bujonu praćena merenjem promena absorbanci optičke gustine (O.D._{620nm}) i brojnosti kolonija na YPD agaru (CFU parametar)

Vreme (h)	CFU/mL	log ₁₀ CFU/mL	O.D. 620nm
0,0	395x10 ⁴	6,597	0,030
0,5	330x10 ⁴	6,518	0,028
1	795x10 ⁴	6,900	0,034
1,5	130x10 ⁵	7,114	0,044
2	200x10 ⁵	7,301	0,060
2,5	312x10 ⁵	7,494	0,083
3	625x10 ⁵	7,796	0,135
3,5	275x10 ⁶	8,439	0,219
4	275x10 ⁶	8,439	0,338
4,5	470x10 ⁶	8,672	0,484
5	725x10 ⁶	8,860	0,693
5,5	740x10 ⁶	8,869	0,840
6	775x10 ⁶	8,889	0,913
6,5	780x10 ⁶	8,892	0,952
7	775x10 ⁶	8,889	0,999
7,5	772x10 ⁶	8,888	1,037
8	765x10 ⁶	8,884	1,064
8,5	753x10 ⁶	8,877	1,112
9	750x10 ⁶	8,875	1,161
9,5	710x10 ⁶	8,851	1,208
10	665x10 ⁶	8,823	1,275
10,5	620x10 ⁶	8,792	1,326
11	930x10 ⁷	8,868	1,399
11,5	801x10 ⁷	8,903	1,469
12	702x10 ⁷	8,845	1,519
18	651x10 ⁷	8,813	1,634
24	403x10 ⁶	8,602	1,696
25	292x10 ⁶	8,465	1,842
26	107x10 ⁶	8,029	1,683
27	55x10 ⁶	7,740	1,668
28	42x10 ⁶	7,623	1,665
29	35x10 ⁶	7,544	1,664
30	25x10 ⁶	7,398	1,659
31	25x10 ⁶	7,398	1,653
32	25x10 ⁶	7,398	1,658
48	11x10 ⁶	7,041	1,645
50	10x10 ⁷	7,000	1,637
52	0	0	1,630
54	0	0	1,627

BIOGRAFIJA AUTORA

Tijana Đorđević je rođena 16. jula 1980. godine u Somboru, Republika Srbija gde je završila osnovnu i srednju školu. Studije na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Novom Sadu, departman za biologiju i ekologiju, smer profesor biologije, upisala je školske 1999/2000. godine. Fakultetsku diplomu stekla je 04. oktobra 2004. godine odbranom diplomskog rada pod naslovom "Selekcija mikroorganizama za dobijanje proizvodnih sojeva".

Magistarske studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija, upisala je školske 2004/05. godine. Magistarsku tezu pod nazivom "Ispitivanje antioksidativne aktivnosti fermentisanih biljnih proizvoda" odbranila je 18. jula 2008. godine.

Na početku magistarskih studija bila je stipendista Republičke fondacije za razvoj naučnog i umetničkog podmlatka, a od januara 2005. pa do završetka magistrature stipendista Ministarstva nauke i zaštite životne sredine Republike Srbije. Od 01. februara 2005. do 31. jula 2008. godine kao stipendista Ministarstva nauke i zaštite životne sredine Republike Srbije bila je angažovana na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu, i tokom tog trogodišnjeg istraživačkog rada učestvovala je na dva projekta Ministarstva: TR 6713 – „Razvoj biomedicinskog tekstilnog materijala i proizvoda programiranih svojstava“ (2005-2007) и BTN-3710086 – „Program novih tehnologija u prehrambenoj industriji. Dodaci hrani dobijeni biotehnoškim putem“ (2005-2007).

Od 01. januara 2009. godine zaposlena je kao istraživač pripravnik u Laboratoriji za hemiju Instituta za pesticide i zaštitu životne sredine u Beogradu. U zvanje istraživač saradnik izabrana je 24. aprila 2009. godine. Tokom dosadašnjeg istraživačkog rada na Institutu za pesticide i zaštitu životne sredine učestvovala je na projektu Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije TR20036 – „Razvoj i unapređenje bioracionalnih metoda zaštite bilja od bolesti i štetočina“ (2008-2011), a u novom projektnom ciklusu Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije angažovana je na projektu TR 31043 – „Proučavanje biljnih patogena, artropoda, korova i pesticida u cilju razvoja metoda bioracionalne zaštite bilja i proizvodnje bezbedne hrane“ (2011-2014).

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Ђорђевић Тијана
број индекса _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом
Утицај ферментације на деградацију остатака пестицида у ферментисаним
производима од жита

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

У Београду, 25.10.2013.

Потпис докторанда

Ђорђевић Тијана

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Тијана Ђорђевић

Број индекса _____

Студијски програм Биохемијско инжењерство и биотехнологија

Наслов рада Утицај ферментације на деградацију остатака пестицида у ферментисаним производима од жита

Ментор проф Др Славица Шилер-Маринковић

Потписани/а Тијана Ђорђевић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 25.10.2013.

Doedenic' Tijana

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Утицај ферментације на деградацију остатака пестицида у ферментисаним производима од жита

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство – некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 25.10.2013.

Boerdenc' Djana