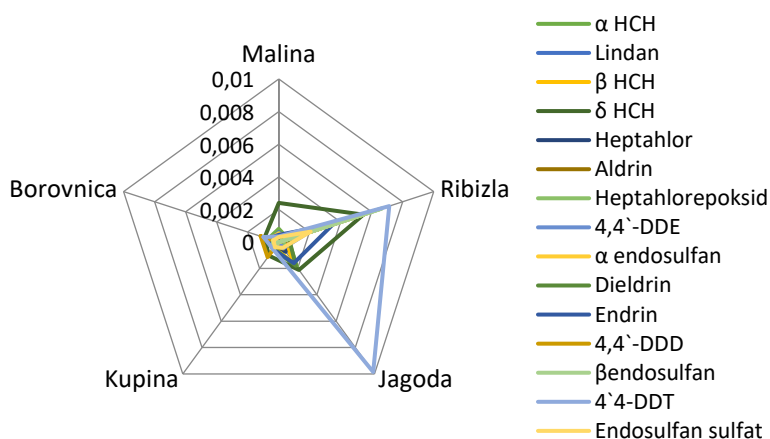


UNIVERZITET U SARAJEVU
POLJOPRIVREDNO-PREHRAMBENI FAKULTET

Dr Nermina Đulančić
Dr Mersiha Alkić-Subašić

REZIDUE I KONTAMINANTI U HRANI



Sarajevo, 2025.

UNIVERZITET U SARAJEVU
POLJOPRIVREDNO-PREHRAMBENI FAKULTET



Dr Nermina Đulančić

Dr Mersiha Alkić-Subašić

REZIDUE I KONTAMINANTI U
HRANI

Sarajevo, 2025.

AUTORI:

Dr Nermina Đulančić, Univerzitet u Sarajevu, Poljoprivredno-prehrambeni fakultet, Sarajevo.

Dr Mersiha Alkić-Subašić, Univerzitet u Sarajevu, Poljoprivredno-prehrambeni fakultet, Sarajevo

IZDAVAČ:

Univerzitet u Sarajevu Poljoprivredno-prehrambeni fakultet

ZA IZDAVAČA: Prof. dr Muhamed Brka

RECENZENTI: Prof. dr Jasmina Đedićbegović, Farmaceutski fakultet,
Univerzitet u Sarajevu

Prof. dr Enisa Omanović-Miklićanin,
Poljoprivredno-prehrambeni fakultet Univerzitet u
Sarajevu

TEHNIČKI UREDNIK: Nermina Đulančić

ISBN 978-9958-597-88-6

CIP zapis dostupan u COBISS sistemu Nacionalne i univerzitetske biblioteke
BiH pod

ID brojem 64021254

PREDGOVOR

Dokazivanje prisustva rezidua i kontaminanata u hrani je važno sa aspekta zdravstvene sigurnosti hrane u svim fazama proizvodnje, prerade i distribucije hrane. U tu svrhu je neophodno primijeniti multidisciplinarni pristup izučavanju kontaminanata koji se nalaze u pojedinim životnim sredinama (tlu, vodi, zraku). Hemijski, biohemijski i mikrobiološki procesi u hrani tokom prerade, od njive do trpeze, u izuzetnim slučajevima mogu doprinijeti pretvaranju određenih biomolekula u toksične rezidualne komponente hrane.

U drugom poglavlju udžbenika su detaljno predstavljene kontaminanti koji u namirnice biljnog i životinjskog porijekla dopijevaju iz životne sredine: dioksini, polihlorirani bifenili (PCBs), policiklični aromatski ugljikovodici, toksični teški metali te radioaktivni elementi. U ovom poglavlju je za specifične kontaminante predstavljena rasprostranjenost u okolišu uz najčešće izvore zagađenja, toksičnost sa posebnim osvrtom na minimalno dozvoljene koncentracije (MDK) u skladu sa važećom zakonskom regulativom, zdravstveni rizici do kojih dolazi u slučaju unosa ili kumulativnog djelovanja, specifični načini transfera u lanac ishrane uz preventivne mjere za smanjenje količine pojedinačnih kontaminanata.

Treće poglavlje obrađuje rezidue pesticida i veterinarskih lijekova u lancu ishrane. Pesticidi su detaljno klasificirani prema namjeni, hemijskoj strukturi i fizikalnim svojstvima uz neizostavnu rasprostranjenost u okolišu, načine kontaminacije lanca ishrane, zdravstvene rizike sa MDK koji su usklađeni sa važećom zakonskom regulativom i preventivne mjere (mehaničke, fizikalne, biološke, hemijske). U okviru rezidua veterinarskih lijekova je posebna pažnja pripala antibioticima, koji su predstavljeni prema hemijskoj klasifikaciji, mehanizmu djelovanja te distribuciji i eventualnoj rezistenciji u lancu ishrane.

U četvrtom poglavlju ovog udžbenika su detaljno obrađeni biološki toksini koji obuhvataju mikotoksine i bakterijske toksine. Za biološke kontaminante je najvažniji put kontaminacije i preventivne mjere obzirom da mikotoksine proizvode toksikogene plijesni, a endotoksine i egzotoksine patogene i uslovno patogene vrste bakterija. Predstavljena je detaljna hemijska struktura, učestalost pojave specifičnih mikotoksina u pojedinim vrstama

hrane uz MDK , ukoliko se prema zakonskoj regulativi dokazuje njihova koncentracija u hrani ,a navedeno je upotpunjeno zdravstvenim rizicima koji u slučaju mikotoksina mogu biti i kumulativni.

Kontaminanti koji nastaju toplotnom obradom hrane su predstavljeni u petom poglavlju s osvrtom na način formiranja, visinu temperaturnih režima na kojima se formiraju te odabrane skupine namirnica u kojima je dokazano prisustvo ovih naknadnih kontaminanata uz preporučene preventivne mjere odnosno jednostavne a efikasne načine sprječavanja proizvodnje naknadnih kontaminanata tokom toplotne obrade hrane.

Analitičke tehnike za određivanje sadržaja specifičnih kontaminanata upućuju na zakonsku regulativu u kojoj se slijede osnovni zahtjevi za uzimanje uzoraka i metoda ispitivanja pojedinačnih kontaminanata su informativno predstavljene u svakom od pomenutih poglavlja knjige.

Autori

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. KONTAMINANTI ŽIVOTNE SREDINE	3
2.1. DIOKSINI	4
<i>Rasprostranjenost u okolišu</i>	<i>5</i>
<i>Zdravstveni rizici</i>	<i>5</i>
<i>Transfer dioksina u lanac ishrane</i>	<i>7</i>
<i>Preventivne mjere</i>	<i>10</i>
2.2. POLIHLORIRANI BIFENILI (PCB)	11
<i>Rasprostranjenost u okolišu</i>	<i>13</i>
<i>Zdravstveni rizici</i>	<i>13</i>
<i>Transfer PCBs u lanac ishrane</i>	<i>15</i>
<i>Preventivne mjere</i>	<i>18</i>
<i>Analitičke tehnike za određivanje sadržaja dioksina i PCBs u hrani</i>	<i>19</i>
2.3. POLICIKLIČNI AROMATSKI UGLJIKOVODICI	19
<i>Rasprostranjenost u okolišu</i>	<i>20</i>
<i>Zdravstveni rizici</i>	<i>22</i>
<i>Transfer PAHs iz okoliša u lanac ishrane</i>	<i>24</i>
2.4. TOKSIČNI TEŠKI METALI	26
<i>Rasprostranjenost teških metala u okolišu</i>	<i>27</i>
Olovo (Pb)	31
<i>Zdravstveni rizici</i>	<i>31</i>
<i>Transfer olova (Pb) u lanac ishrane</i>	<i>32</i>
Kadmij (Cd)	35
<i>Zdravstveni rizici</i>	<i>35</i>
<i>Transfer kadmija (Cd) u lanac ishrane</i>	<i>36</i>
Živa (Hg)	39
<i>Zdravstveni rizici</i>	<i>39</i>
<i>Transfer žive u lanac ishrane</i>	<i>39</i>
Arsen (As)	42

Zdravstveni rizici	43
Transfer arsena (As) u lanac ishrane	43
Preventivne mjere za smanjenje sadržaja teških metala	45
Analitičke tehnike određivanja toksičnih metala u hrani	46
2. 5. RADIOAKTIVNI ELEMENTI	47
Rasprostranjenost u okolišu	47
Zdravstveni rizici	49
Transfer radioaktivnih elemenata u lanac ishrane	49
Preventivne mjere za smanjenje količine radioaktivnih elemenata	52
Analitičke tehnike za određivanje radioaktivnih elemenata u hrani	53
2.6. LITERATURA	54
3. REZIDUE PESTICIDA I VETERINARSKIH LIJEKOVA U HRANI	60
3. 1. REZIDUE PESTICIDA	61
Rasprostranjenost u okolišu	61
Fizikalna svojstva pesticida	63
Klasifikacija pesticide prema namjeni	64
Insekticidi	65
Herbicidi	65
Fungicidi	66
Klasifikacija pesticida prema hemijskoj strukturi	66
Organohlorni pesticidi	67
Organofosforni pesticidi	68
Karbamati	69
Piretrini i piretroidi	70
Zdravstveni rizici	71
Kontaminacija hrane pesticidima	72
Preventivne mjere	76
Analitičke tehnike za dokazivanje rezidua pesticida u hrani	77
3. 2. REZIDUE VETERINARSKIH LIJEKOVA	79
Zdravstveni rizici	81
3.2.1. ANTIBIOTICI	83
Primjena antibiotika	87

Preventivne mjere za smanjenje rezidua antibiotika u mlijeku	90
Analitičke tehnike za određivanje rezidua veterinarskih lijekova hrani	91
3.3. LITERATURA	93
4. BIOLOŠKI TOKSINI	97
4.1. MIKOTOKSINI	97
4.1.1. AFLATOKSINI	100
Zdravstveni rizici	102
Pojavljivanje u hrani	103
Aflatoksini u mlijeku	106
4.1.2. OHRATOKSINI	108
Zdravstveni rizici	109
Pojavljivanje u hrani	109
4.1.3. FUZARIUM TOKSINI	111
Trihoteceni	111
Zdravstveni rizici	113
Fumonizini	113
Zdravstveni rizici	114
Zearalenon	115
Zdravstveni rizici	116
Pojavljivanje u hrani	117
4.1.4. PATULIN	119
Zdravstveni rizici	120
Pojavljivanje u hrani	120
Preventivne mjere	122
Analitičke tehnike za određivanje mikotoksina u hrani	125
4. 2. BAKTERIJSKI TOKSINI	126
Endotoksini	127
Egzotoksini	129
4.2.1. BAKTERIJE UZROČNICI TROVANJA HRANOM	132
Rod <i>Salmonella</i>	134

Kontaminacija hrane vrstama roda <i>Salmonella</i>	135
Izolacija i identifikacija <i>Salmonella</i> spp. iz uzoraka hrane, EN-ISO 6579-1:2017.	136
Rod <i>Vibrio</i>	139
Kontaminacija hrane vrstama roda <i>Vibrio</i>	140
Izolacija vrsta roda <i>Vibrio</i> iz uzoraka hrane	141
<i>Listeria monocytogenes</i>	141
Kontaminacija hrane vrstom <i>Listeria monocytogenes</i>	143
Izolacija <i>Listeria monocytogenes</i> iz uzoraka hrane, EN ISO 11290-1: 2017 ³ i ISO 11290-2: 2017 ⁴	143
Rod <i>Bacillus</i>	145
Kontaminacija hrane vrstama roda <i>Bacillus</i>	148
Izolacija vrste <i>B.cereus</i> iz uzoraka hrane	150
<i>Clostridium botulinum</i>	151
Kontaminacija hrane vrstom <i>Clostridium botulinum</i>	154
<i>Staphylococcus aureus</i>	155
Kontaminacija hrane vrstom <i>Staphylococcus aureus</i>	156
<i>Clostridium perfringens</i>	156
Kontaminacija hrane vrstom <i>C.perfringens</i>	159
Izolacija i identifikacija <i>Clostridium perfringens</i>	159
Rod <i>Aeromonas</i>	160
Izolacija i identifikacija <i>Aeromonas</i> spp.	162
Faktori rizika i preventivne mjere koje se koriste kako bi se spriječili slučajevi trovanja hranom	162
4.3. LITERATURA	164
5. KONTAMINANTI KOJI NASTAJU TOPLOTNOM OBRADOM HRANE	171
5.1. AKRILAMID	171
Zdravstveni rizici	172
Formiranje akrilamida u hrani	173
Preventivne mjere	179
Analitičke tehnike za određivanje akrilamida u hrani	180

5.2. HETEROCIKLIČNI AROMATSKI AMINI	181
Zdravstveni rizici	183
Pojavljivanje u hrani	184
Formiranje HAAs u mesu	185
Preventivne mjere	191
Analitičke tehnike za određivanje heterocikličnih amina u hrani	191
5.3. POLIČIKLIČNI AROMATSKI UGLJIKOVODICI (PAHs) U TOPLOTNO OBRAĐENIM PROIZVODIMA	192
Preventivne mjere	196
Analitičke tehnike za određivanje PAHs u hrani	197
5.4. N-NITROZAMINI	198
Nitrati i nitriti kao prekursori formiranja N-nitrozamina	198
Zdravstveni rizici	200
Nitrati i nitriti u hrani	200
Pojavljivanje N-nitrozamina u hrani	204
Preventivne mjere	208
Analitičke tehnike za određivanje nitrata, nitrita i N-nitrozamina	209
5.5. HLORPROPANOLI I GLICIDIL ESTERI MASNIH KISELINA U HRANI	210
Hlorpropanoli	210
Pojavljivanje hlorpropanola u hrani	211
Glicidil esteri masnih kiselina	214
Pojavljivanje u hrani	216
Zdravstveni rizici	218
Preventivne mjere	218
Analitičke tehnike za određivanje hlorpropanola i GEs u hrani	220
5. 6. LITERATURA	221

1. UVOD

Proizvodnja hrane je kompleksan proces, koji uključuje veliki broj subjekata, od poljoprivrednika i primarnih prerađivača, preko industrijske proizvodnje, do načina skladištenja, transporta i stavljanja hrane na tržište, a čiji je osnovni cilj dobijanje bezbjednih/sigurnih, kvalitetnih i higijenski ispravnih prehrambenih proizvoda. Svaka od spomenutih faza podrazumijeva različite rizike, uslovljene prisustvom različitih opasnosti u hrani.

Najčešće opasnosti su različite vrste kontaminanata koji u hranu mogu da dospiju nekontrolisano iz okoliša, ili mogu biti rezidue (ostaci) tretiranja koje je čovjek koristio u različitim fazama proizvodnje. To su materije koje nisu namjerno dodane u hranu nego su posljedica tretiranja tokom proizvodnje, pakovanja, transporta, obrade hrane, ili su pak posljedica nekih prirodnih procesa. Hemijske kontaminante koji se mogu naći u hrani, a s obzirom na njihov izvor, možemo podijeliti na:

- kontaminante iz okoliša kao što su dioksini, policiklički bifenili, policiklički aromatski ugljikovodici,
- biološke kontaminante, kao što su mikotoksini porijeklom iz plijesni i toksini bakterija,
- kontaminante/ ostatke od tretiranja biljaka i životinja, kao što su pesticidi i ostaci veterinarskih lijekova
- kontaminante koji nastaju obradom hrane, kao što su, akrilamid, heterociklični amini, nitrozamini, hlorpropanoli.

Kako bi se rizici lakše kontrolisali, postoje različiti sistemi prilagođeni određenim fazama proizvodnje hrane, a sve u svrhu da svaki od subjekata može efikasno kontrolirati rizike u svom dijelu lanca prehrane.

Zbog toga Svjetska zdravstvena organizacija (eng., *World Health Organization*; WHO) i Organizacija za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih naroda (eng., *Food and Agriculture Organization*; FAO) donose preporuke o maksimalno dozvoljenim količinama (MDK) kontaminanata u hrani, njihovom ukupnom dnevnom (eng., *acceptable daily intake*; ADI) i sedmičnom unosu (eng., *provisional tolerable weekly intake*; PTWI) za odrasle, nakon čega svaka država prema svojim studijama i prema preporukama WHO i FAO donosi nacionalne pravilnike u kojima su propisane najveće dozvoljene količine određenih kontaminanata u hrani. Utvrđene vrijednosti kontaminanata u hrani moraju biti unutar granica propisanih maksimalno dozvoljenih količina (MDK) koje su propisane navedenim pravilnicima.

2. KONTAMINANTI ŽIVOTNE SREDINE

Glavni uzrok kontaminacije hrane je zagađenost zraka, vode i zemljišta. Kako okoliš postaje zagađeniji tako se povećava rizik od kontaminacije hrane. Izvori onečišćenja okoliša mogu biti: prirodni (vulkani, stijene, šumski požari) i umjetni. Dok se na prirodne izvore ne može djelovati, umjetni izvori onečišćenja su isključivo posljedica čovjekove djelovanja preko:

- industrije,
- proizvodnje energije (termoelektrane),
- prometnih sredstava,
- otpadnih voda,
- poljoprivrede,
- proizvodnje hemikalija,
- spaljivanje otpada i sl.

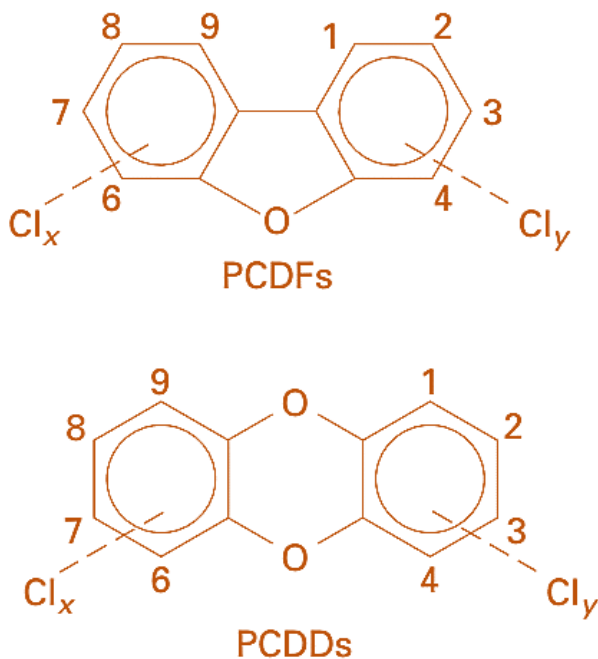
Emisija gasova iz industrijskih postrojenja i izduvnih plinova iz motornih vozila glavni su zagađivači zraka, a toksične čestice iz zraka se apsorbiraju u poljoprivredne sirovine. Industrijski i otpad iz domaćinstva često završava u vodi, toksične hemikalije se apsorbiraju u ekosistem i na taj način ulaze u hranidbeni lanac. Zagađenost zemljišta i biljaka često je rezultat industrijskih aktivnosti koje proizvode otrovni otpad koji se ne zbrinjava na adekvatan način.

Najznačajniji kontaminanti iz okoliša koji mogu dospjeti u hranu su:

- *Dioksini i polihlorirani bifenili*
- *Policiklični aromatski ugljikovodici*
- *Toksični teški metali*

2. 1. DIOKSINI

Dioksini predstavljaju skupinu polihloriranih aromatskih jedinjenja slične strukture. Ove supstance su posljednjih godina privukle veliku pažnju stručne i naučne javnosti zbog njihove toksičnosti. Od 210 teoretskih mogućih kongenera¹ dioksina njih 75 pripada skupini polihloriranih dibenzo-p-dioksida (engl. *Polychlorinated dibenzodioxins*, PCDDs), a 135 kongenera spada u skupinu polihloriranih dibenzofurana (engl. *Polychlorinated dibenzofurans*, PCDFs) Na Slici 1. prikazane su opšte strukture PCDDs i PCDFs.



Slika 1. Hemijska struktura PCDFs, PCDDs

¹kongener je jedna od dvije ili višesupstanci koje su nastale (kongenerisane) ilisintetizovaneizistihreakcijailizistog postupka, a često i kao jedna od dvije ili više supstanci koje imaju isto porijeklo, strukturu ili funkciju

Osim po sadržaju hlora, pojedini homolog i kongeneri PCDDs i PCDFs se po fizičkim i hemijskim osobinama mnogo ne razlikuju, a njihova karakteristična svojstva su: nizak napon pare, ekstremno mala rastvorljivost u vodi, dobra rastvorljivost u organskim rastvaračima, posebno u lipidnim matriksima i težnja da se vezuju za organsku supstancu u zemljištu i sedimentima, te sposobnost biakumulacije² i biomagnifikacije³,

Rasprostranjenost u okolišu

Dioksini su široko rasprostranjeni kontaminanti koji nemaju određenu upotrebu i ne proizvode se. Najvećim dijelom nastaju kao neželjeni nus-produkti različitih industrijskih procesa (sagorijevanja prilikom spaljivanja otpada te u proizvodnji određenih hemikalija (npr. organohlorinih pesticida i herbicida). Šumski požari i erupcije vulkana također su izvori dioksina. Smatra se da je najveći uzročnik kontaminacije okoliša spaljivanje otpada i zbog toga se primarno dioksini nalaze u zraku. Zbog stroge regulative koja se primjenjuje na industrije iz kojih mogu izaći dioksini, te na spalionice komunalnog i opasnog otpada, u SAD je npr. od 1980. do 2003. smanjena emisija dioksina za 90%.

Zdravstveni rizici

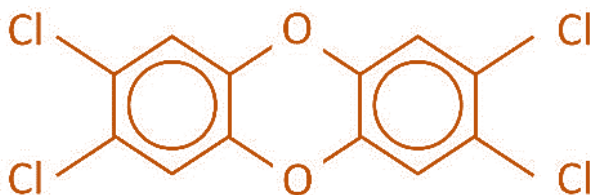
Kratkoročna izloženost velikim koncentracijama dioksina može izazvati lezije na koži kao što su hlorakne i tamne mrlje, te izazvati promjene u funkciji jetre. Dugoročna izloženost vezana je za slabljenje imuno sistema, oštećenja nervnog i endokrinog sistema, te reproduktivne funkcije. Kada dioksini dospiju u ljudski organizam, jedan dio se metabolizira i izluči iz organizma, a drugi dio se akumulira u masnom tkivu. Da bi se dioksini izlučili

²bioakumulacija je proces nakupljanja određenih supstanci, kao što su otrovne hemikalije, u različitim tkivima živih organizama uslijed njihovog unosapreko ishrane ili izokoline

³biomagnifikacija se opisuje kao proces nakupljanja određenih supstanci u organizmima živih bića udalekov većim koncentracijama nego što su koncentracije istih supstanci u organizmima koji se nalaze ispod njih u lancu ishrane

iz organizma moraju se prevesti u polarne derivate. Proces izlučivanja iz organizma ovisi o dozi unesenoj u organizam, starosnoj dobi i količini masnog tkiva.

Toksičnost pojedinih spojeva dibenzodioksina i dibenzofurana znatno se razlikuje. Najproučavaniji i najtoksičniji je dioksin (Slika 2) 2,3,7,8-tetrahlordibenzo-p-dioksin (eng. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, TCDD). Međunarodna agencija za istraživanje raka (eng. *International Agency for Research on Cancer, IARC*) 1977. godine je, na temelju tih studija i dostupnih epidemioloških podataka, kongeren 2,3,7,8-TCDD svrstala u spojeve koji su kancerogeni za ljude (skupina 1). Ispitivanja izlučivanja TCDD iz organizma pokazala su određene razlike unutar ljudske populacije. Prema tim istraživanjima, TCDD se brže izlučuje iz organizma muškaraca i mlađe populacije, dok je sporije izlučivanje uočeno kod žena i starije populacije. Na osnovu toksikoloških značaja dioksina, granica dopuštenoga dnevnoga unosa je u području od 1 do 10 pg TCDD/kg tjelesne težine.



Slika 2. Hemijska struktura 2,3,7,8-tetrahlordibenzo-p-dioksina (TCDD)

Svaki kongener dioksina ili dioksinima sličnih PCBs pokazuje različit efekat toksičnosti. Stoga je u svrhu procjene rizika razvijen koncept faktora ekvivalentne toksičnosti (eng. *Toxicity Equivalency Factor, TEF*) kako bi se mogla procijeniti kumulativna toksičnost smjese dioksina i PCBs sličnih dioksinima. Kao referentni kongener uzet je najtoksičniji kongener 2,3,7,8-tetrahlordibenzo-p-dioksin (TCDD), a njegova TEF vrijednost je 1. Relativna toksičnost svih ostalih dioksina (PCDD, PCDF i PCB) prikazuje se u odnosu na referentni kongener. Toksični efekat smjese dioksina i PCBs sličnih dioksinima je zbroj TEF vrijednosti pojedinačnih spojeva pomnožen s

njihovom koncentracijom. Dobijena vrijednost (jednačina 1) se naziva toksični ekvivalent (*Toxic equivalency, TEQ*)

$$TEQ = \sum_{i=1}^n |c_i \cdot TEF_i| \quad \dots (1)$$

gdje je:

TEQ - toksični ekvivalent

c_i - koncentracija pojedinog kongenera

TEF - faktor ekvivalentne toksičnosti.

Prema tome, faktori TEF i TEQ se koriste za određivanje rizika i u cilju nadzora, odnosno u cilju utvrđivanja prioritetnih oblasti za dekontaminaciju.

Transfer dioksina u lanac ishrane

Dioksini mogu dospjeti u hranu na različite načine. Iako se primarno nalaze u zraku, dioksini se iz zraka deponuju u zemljište, vodu, biljke i životinje. U zemljište mogu dospjeti i kroz onečišćeni mulj ili kompost, izlivanjem ili erozijom iz onečišćenih područja. Kako nisu rastvorljivi u vodi, apsorbiraju se na mineralne i organske čestice koje se suspendiraju u vodu.

U Belgiji su 1999. godine otkrivene velike koncentracije dioksina u piletini i jajima, a u Njemačkoj je 1998. godine otkriven dioksin u mlijeku. U oba slučaja izvor kontaminacije je bila hrana za životinje.

U Nizozemskoj su 2004. godine i 2006. godine zabilježena dva incidenta vezana uz povećane količine dioksina. U jednom slučaju se radilo o povećanoj koncentraciji dioksina u mlijeku, a uzrok kontaminacije je hrana za životinje, odnosno glina koja se koristila pri proizvodnji hrane za životinje.

U Irskoj je krajem 2008. godine otkrivena 200 puta veća količina dioksina od dozvoljene. Zbog toga je povučena velika količina svinjetine i proizvoda od svinjetine što je do sada najveće povlačenje hrane sa tržišta uzrokovano

hemijskom kontaminacijom. I u ovom slučaju primarni izvor kontaminacije dioksinima bila je hrana za životinje.

Strogi sistem kontrole hrane nisu dovoljno jamstvo sigurnosti hrane. Pokazala je to i najnovija afera vezana uz prisutnost dioksina u hrani i hrani za životinje otkrivena u Njemačkoj. Hrana za životinje kontaminirana je dioksinima dodavanjem masnih kiselina namijenjenih tehničkoj upotrebi. Utvrđeno je da su masne kiseline onečišćene dioksinima te da je njihovo porijeklo iz proizvodnje biodizela. Pretpostavlja se da je ovom aferom obuhvaćeno oko 4800 farmi u Njemačkoj. Stoga, više od 90% izlaganja ljudi dioksinima, se događa potrošnjom životinjskih prehrambenih proizvoda kao što su meso, mlijeko, mliječni proizvodi, jaja (Tabela 1) i riba.

Tabela 1. Sadržaj dioksina i furana u kokošjim jajima. Rezultati kvantifikacije za PCDD, PCDF prikazani su u pg WHO-TEQ / g masti, (Piskorska-Pliszczyńska i sar., 2015)

Sistem farme	PCDD/PCDF $\bar{X} \pm SD$ min-max
Intenzivan uzgoj kokoši (n = 72)	0,60 ± 0,42 0,32 – 0,76
Velika farma (n = 13)	0,40 ± 0,10 0,30 – 0,60
Slobodan uzgoj – dozvoljeno slobodno kretanje (n = 117)	1,38 ± 3,05 0,30 – 29,32
Organska proizvodnja kokoši (n = 23)	1,66 ± 1,80 0,32 – 8,21

U Tabeli 2. naznačene su MDK za PCDDs i PCDFs u nekim vrstama hrane u BiH.

Tabela 2. MDK dioksina u nekim vrstama hrane u Bosni i Hercegovini

Vrsta hrane	Maksimalno dozvoljena količina (MDK)
	Suma dioksina (WHO-PCDD/F-TEQ)
Meso i mesni proizvodi (izuzev jestive iznutrice) od slijedećih životinja:	
• goveda i ovce	2,5 pg /g masnoće
• perad	1,75 pg /g masnoće
• svinje	1,0 pg /g masnoće
Jetra kopnenih životinja definisanih pod 1., osim jetre ovce i iz nje dobivenih proizvoda	0,3 pg /g vlažne mase
Ovčija jetra i iz nje dobiveni proizvodi	1,25 pg /g vlažne mase
Mišićno meso ribe i proizvoda od njih, te riblji proizvodi, osim:	3,5 pg /g vlažne mase
• divljih jegulja	
• divlje slatkovodne ribe, osim određenih vrsta riba ulovljenih u slatkoj vodi	
• riblja jetra i proizvodi od riblje jetre	
• -ulja iz morskih organizama	
Maksimalna količina za tvrdokošče odnosi se na mišićno meso krakova i abdomena. Kada se radi o rakovima i rakovima sličnim tvrdokoščima (kratkorepi morski rakovi Brachyura i Anomura), onda se odnosi na mišićno meso krakova	
Sirovo mlijeko i mliječni proizvodi, uključujući i maslac	2,5 pg /g masnoće
Kokošja jaja i proizvodi od jaja	2,5 pg /g masnoće
Masnoća slijedećih životinja:	
• goveda i ovce	2,5 pg /g masnoće
• perad	1,75 pg /g masnoće
• svinje	1,0 pg /g masnoće
Miješane životinjske masnoće	1,5 pg /g masnoće
Biljna ulja i masnoće	0,75 pg /g masnoće
Hrana za dojenčad i malu djecu	0,1 pg /g vlažne mase

Masnije ribe sadrže veće količine ovih supstanci. Poseban rizik predstavlja prisustvo PCDDs i PCDFs u humanom mlijeku (10-100 puta veće količine nego u kravljem mlijeku).

Povrće i voće može biti izvor dioksina ukoliko su pesticidi, korišteni u njihovoj proizvodnji, sadržavali ove supstance, kao onečišćenja, ali u znatno manjoj mjeri nego životinjske namirnice.

Preventivne mjere

Kako se dioksini akumuliraju u masnome tkivu, treba izbjegavati masno meso, masno mlijeko i mliječne proizvode, a pri konzumaciji riba i peradi treba uklanjati kožu. Na žalost, pranjem, posebno voća i povrća, dioksini se ne mogu ukloniti.

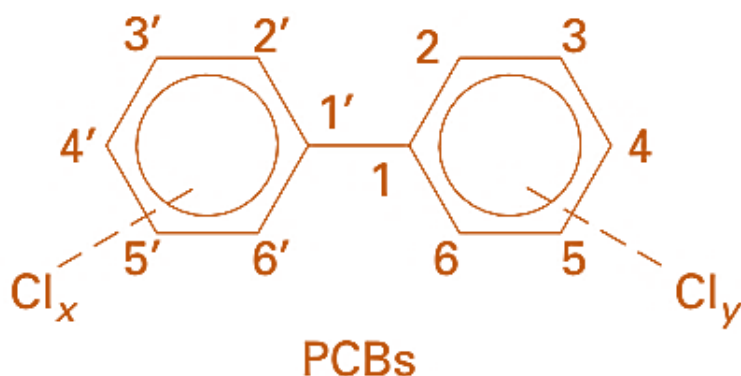
Kontaminacija hrane dioksinima može se smanjiti i sprječavanjem ispaše stoke u zagađenim područjima i kontrolom sirovina u proizvodnji krmiva (naročito u akvakulturi, zbog korištenja ribljeg brašna i ulja i tendencije nakupljanja ovih spojeva u ribi). Kod životinjskih masti, naročito ribljeg ulja, koji često sadrže visoke količine dioksina, učinkovitim se pokazalo uklanjanje masti iz ribljeg brašna. Moguće je i odabrati sirovinu s manje dioksina da koncentracija u konačnom proizvodu ne pređe zadana zakonska ograničenja ili zamijeniti dio ribljeg ulja s biljnim uljem (što za posljedicu može imati manji sadržaj omega-3 masnih kiselina u ribi). Postoje uspješne metode dekontaminacije ribljeg ulja primjenom destilacije kratkog puta (*short-path distillation*, SPD) ili tretmanom super kritičnim fluidima, aktivnim ugljenom ili kombinacijama ovih tehnika.

Nužno je podrobno podešavanje procesnih parametara da se spriječi gubitak prehrambeno važnih masnih kiselina i vitamina. Priprema hrane, poput guljenja voća i povrća ili uklanjanje životinjske masti, može pridonijeti manjem izlaganju, kao i prilagodba prehrane osjetljivih populacija (edukacijom i/ili poticajima proširenju izbora hrane). Istovremeni unos prehrambenih vlakana, naročito bogatih ligninom poput sjemenki lana ili rižinih mekinja, može znatno smanjiti apsorpciju dioksina iz hrane. Izračunato je također da potpuno izuzeće ribe iz prehrane nije dobro jer je

ona, pored eventualne kontaminacije metil živom ili halogeniranim ugljikovodicima, važan izvor korisnih nutrijenata poput joda, omega-3 masnih kiselina i vitamina A.

2. 2. POLIHLORIRANI BIFENILI (PCB)

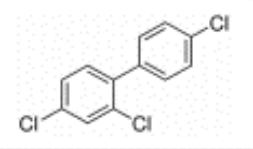
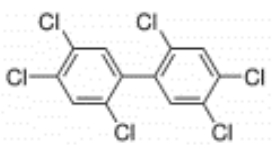
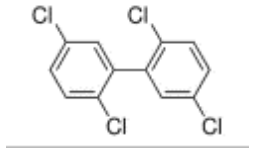
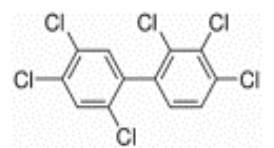
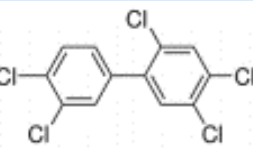
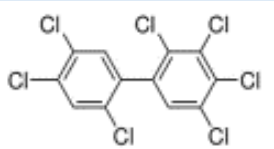
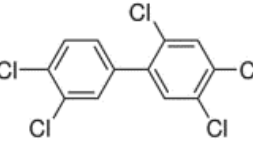
Polihlorirani bifenili (eng., *polychlorinated biphenyls PCBs*) su aromatski ugljikovodici, kod kojih je jedan ili svih deset atoma vodika iz bifenilne molekule (Slika 3) zamijenjeno sa atomom hlora.



Slika 3. Hemijska struktura PCBs

Postoji 209 teoretski mogućih kongenera PCBs. Hemijski su vrlo postojani. Ostaju nepromijenjeni u prisutnosti kiseonika i nekih metala, i pri visokim temperaturama. PCBs su slabo rastvorljivi u vodi ali se dobro rastvaraju u mastima i imaju osobinu biakumulacije i biomagnifikacije kroz lance ishrane. Na biakumulacije utiču: dužina ekspozicije, hemijska struktura jedinjenja, pozicija i broj atoma hlora. Strukturne formule nekih PCBs prikazane su u Tabeli 3.

Tabela 3. Strukturne formula nekih polihlorovanih bifenila
(Đinović- Stojanović i sar., 2013)

Naziv jedinjenja	Strukturna formula	Naziv jedinjenja	Strukturna formula
PCB 28		PCB 153	
PCB 52		PCB 138	
PCB 118		PCB 180	
PCB 118			

^a PCB–polihlorovanibifenili/a PCB – polychlorinatedbiphenyls:

2,4,4'–trihlorobifenil (PCB -28)/ 2,4,4'–trichlorobiphenyl (PCB -28)

2,2',5,5'–tetrahlorobifenil (PCB-52)/ 2,2',5,5'–tetrachlorobiphenyl (PCB-52)

2,2',4,5,5'–pentahlorobifenil (PCB -101)/ 2,2',4,5,5'–pentachlorobiphenyl (PCB -101)

2,3',4,4',5–pentahlorobifenil (PCB -118)/ 2,3',4,4',5–pentachlorobiphenyl (PCB -118)

2,2',4,4',5,5'–hexahlorobifenil (PCB -153)/ 2,2',4,4',5,5'–hexachlorobiphenyl (PCB -153)

2,2',3,4,4',5'–hexahlorbifenil (PCB 138)/ 2,2',3,4,4',5'–hexachlorbiphenyl (PCB 138)

2,2',3,4,4',5,5'–heptahlorobifenil (PCB -180)/ 2,2',3,4,4',5,5'–heptachlorobiphenyl (PCB -180)

Zbog negativnih efekata na akvatičnu i terestričnu faunu i zdravlje ljudi njihova proizvodnja je ograničena i podvrgnuta strogoj kontroli još prije 20 godina. Štokholmska konvencija od 23. maja 2001. godine donijela je zabranu upotrebe 12 visoko toksičnih organskih jedinjenja među kojima su

i PCBs, uz pravo korišćenja postojeće elektro opreme u kojoj se već nalaze PCBs do 2025. godine.

Rasprostranjenost u okolišu

Kao lipofilne substance, slabo se rastvaraju u vodi ali se odlično adsorbuju na najsitnije suspendovane materije, koje su uglavnom organskog i organomineralnog sastava. Na ovaj način mogu biti imobilisani za duži period. Većina PCBs prisutnih u životnoj sredini nalazi se vezana u riječnim, jezerskim i morskim sedimentima. Isparavanjem iz površinskih voda i zemljišta PCB dospijevaju u atmosferu gdje se vezuju za najsitnije čestice, a stepen adsorpcije raste sa brojem atoma hlora. Vazдушnim strujanjima PCB bivaju transportovani do najudaljenijih predjela, pa su otkriveni u snijegu Antartika i vodama polarnih mora. Taloženjem čestica prašine i ispiranjem padavinama, ponovo dospijevaju na zemlju i počinje novi ciklus kruženja. U vazduhu koncentracija PCBs se kreće od $0,002 \text{ ng/m}^3$ do 15 ng/m^3 , a u padavinama od $0,001 \mu\text{g/l}$ do $0,25 \mu\text{g/l}$, s tim što se više koncentracije sreću u urbanim nego u ruralnim područjima.

Zdravstveni rizici

PCBs su moćni induktori enzima jetre i enzima drugih tkiva koja učestvuju u metabolizmu. Određeni faktori modifikuju toksičnost PCBs, a mnogi od efekata nastali u interakciji sa drugim hemijskim materijama vezani su za indukciju enzima. U interakciji sa pesticidima, benzo[a]pirenom, akrilonitrilom, mnogim rastvaračima i kadmijumom, raste intenzitet oštećenja jetre. O pojavi karcinoma kod ljudi, kao posljedice unošenja PCBs ne postoje vjerodostojni podaci, mada su pojedina retrospektivna istraživanja kod radnika fabrika kondenzatora (Italija, SAD) pokazala povećanu smrtnost od raka jetre i gastrointestinalnog trakta. Međunarodna agencija za ispitivanje raka (IARC) svrstala je PCBs u grupu 2 A, odnosno u "hemijske materije vjerovatno kancerogene za ljude".

Dvanaest spojeva polihlorovanih bifenila od teoretskih 209 kongenera koji nisu supstituirani i koji su mono supstituirani u orto-položaju pokazuju toksikološka svojstva slična dioksinima. Zbog toga se takvi PCB često nazivaju PCBs slični dioksinima (*PCBs like dioxin, LD PCBs*).

Tabela 4. Vrijednosti faktora ekvivalentne toksičnosti (TEF) utvrđene 1998. godine, te pri zadnjoj re-evaluaciji 2005. godine (EFSA, 2010)

Hemijski spoj	TEF ₁₉₉₈	TEF ₂₀₀₅	Hemijski spoj	TEF ₁₉₉₈	TEF ₂₀₀₅
Hlorirani dibenzo-p-dioksini			<i>Ne supstituirani PCB na orto položaju</i>		
2,3,7,8-TCDD	1	1	PCB-77	0,0001	0,0001
1,2,3,7,8-PeCDD	1	1	PCB-81	0,0001	0,0003
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	0,1	PCB-126	0,1	0,1
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	0,1	PCB-169	0,01	0,03
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	0,1			
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,1	0,1			
OCDD	0,0001	0,0003			
Hlorirani dibenzofurani			<i>Mono-orto supstituirani PCB</i>		
2,3,7,8-TCDF	0,1	0,1	PCB-105	0,0001	0,00003
1,2,3,7,8-PeCDF	0,05	0,03	PCB-114	0,0005	0,00003
2,3,4,7,8-PeCDF	0,5	0,3	PCB-118	0,0001	0,00003
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	0,1	PCB-123	0,0001	0,00003
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	0,1	PCB-156	0,0005	0,00003
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	0,1	PCB-157	0,0005	0,00003
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	0,1	PCB-167	0,00001	0,00003
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,1	0,01	PCB-189	0,0001	0,00003

1,2,3,4,6,7,8,9-HpCDF	0,01	0,01
OCDF	0,0001	0,0003

Zadnja dva desetljeća Svjetska zdravstvena organizacija kroz međunarodni program hemijske sigurnosti (engl. *International Program on Chemical Safety, IPAC*) postavlja i re-evaluira TEF vrijednosti za dioksine i dioksinima slične spojeve. Zadnja re-evaluacija provedena je 2005. godine kada su promijenjene TEF vrijednosti za oktahlorirani dioksin i furan, te za polihlorirane bifenile. U Tabeli 4. prikazani su faktori ekvivalentne toksičnosti utvrđeni pri zadnjoj re-evaluaciji WHO-a 2005. godine. Kako je došlo do promjene TEF vrijednosti za neke spojeve, radi boljeg razumijevanja prikazane su i TEF vrijednosti utvrđene 1998. godine.

Ključna faza u eliminaciji PCBs iz organizma je metabolizam, koji se primarno odvija putem jetrenog citohrom P-450 monooksigenaznog sistema i koji je u ovisnosti o hloriranoj strukturi kongenera. Glavni metaboliti su hidroksilirani produkti pri čemu se hidroksilacija odvija primarno na para ili meta poziciji ukoliko su ova mjesta ne supstituirana.

Međuprodukti u oksidaciji nekih PCBs su arenoksidi, reaktivni spojevi koji se mogu bilo spontano ili enzimatskim putem pregraditi u produkte koji se mogu izlučiti iz organizma. Alternativno, mogu formirati potencijalno toksične (citotoksične, mutagene, karcinogene) makromolekularne spojeve. Hidroksilirani produkti PCBs mogu se i naknadno konjugirati s aktiviranom glukuronskom kiselinom ili sulfatom, a također identificirani su i parcijalno dehlrorirani metaboliti te metaboliti koji sadrže sumpor (kao što su metil-sulfonil PCBs ili MeSO₂-PCBs).

Transfer PCBs u lanac ishrane

Kao posljedica prisustva u životnoj sredini, ova jedinjenja mogu dospjeti u lanac ishrane i na taj način ugroziti ljudsko zdravlje.

Uključivanje PCBs, iz životne sredine, u lance ishrane započinje mikroorganizmima i zooplanktonom koji se hrane organskim česticama

prisutnim u vodi, i mikrozobentosom koji konzumira organske materije istaložene u sedimentu. Preko makrozoobentosa, riba, ihtiofagnih ptica i sisara PCBs dospijevaju do vrha piramida ishrane..

Najmanji nivo kontaminacije određen je u namirnicama biljnog porijekla. Iz zemljišta biljke malo usvajaju PCBs, uglavnom adsorpcijom na spoljnu

Tabela 5 . MDK PCBs za neke vrste hrane u Bosni i Hercegovini

Vrsta hrane	MDK
	Suma dioksina Suma PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 i PCB 180
Meso i mesni proizvodi (izuzev jestive iznutrice) od slijedećih životinja:	
• goveda i ovce	40 ngg masnoće
• perad	40 ngg masnoće
• svinje	40 ngg masnoće
Jetra kopnenih životinja definisanih pod 1., osim jetre ovce i iz nje dobivenih proizvoda	3,0 ng /g vlažne mase
Ovčija jetra i iz nje dobiveni proizvodi	3,0 ng /g vlažne mase
Mišićno meso ribe i proizvoda od njih, te riblji proizvodi, osim:	75 ng /g vlažne mase
• divljih jegulja	
• divlje slatkovodne ribe, osim određenih vrsta riba ulovljenih u slatkoj vodi	
• riblja jetra i proizvodi od riblje jetre	
• ulja iz morskih organizama	
Maksimalna količina za tvrdokožce odnosi se na mišićno meso krakova i abdomena. Kada se radi o rakovima i rakovima sličnim tvrdokožcima (kratkorepi morski rakovi Brachyura i Anomura), onda se odnosi na mišićno meso krakova	
Sirovo mlijeko i mliječni proizvodi, uključujući i puter	40 ng /g masnoće
Kokošja jaja i proizvodi od jaja	40 ng /g masnoće
Masnoća slijedećih životinja:	
• goveda i ovce	40 ng /g masnoće
• perad	40 ng /g masnoće
• svinje	40 ng /g masnoće
Miješane životinjske masnoće	40 ng /g masnoće
Biljna ulja i masnoće	40 ng /g masnoće
Hrana za dojenčad i malu djecu	1,0 ng /g vlažne mase

površinu i translokacijom. Oko 90% ovih zagađivača se unosi u organizam čovjeka konzumiranjem prehrambenih proizvoda životinjskog porijekla. Domaće su životinje izložene PCBs uzimanjem stočne hrane s onečišćenoga zemljišta, te se PCBs akumuliraju u mesu, jetri, a posebno u masnome tkivu. Mogu biti preneseni u mlijeko i jaja. U žena koje su bile izložene PCBs, u vrijeme trudnoće, pronađeni su PCBs u majčinome mlijeku.

Najviši nivo onečišćenja hrane PCBs je određen za ribu i riblje proizvode, a zatim slijede jaja, mlijeko i mliječni proizvodi, te meso i mesne prerađevine. Eksperimentalno utvrđen faktor biokoncentracije kod akvatičnih organizama (školjke, rakovi, ribe) kreće se od 200 do 1.000.000, ali biomagnifikacija nije posebno izražena.

Sadržaj PCBs jedinjenja u ribama mogu da zavise od više faktora, prije svega od: zagađenja životne sredine ovim organohlorinim jedinjenjima, vrste ribe (hemijskog sastava), starosti, veličine, njenog fiziološkog stanja, vremenskih prilika u pojedinim geografskim oblastima i dr.

U tabeli 5. navedene su MDK za PCBs jedinjenja u hrani, koja se stavlja na tržište Bosne i Hercegovine, a što je regulisano Pravilnikom o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani.

Dosadašnji rezultati istraživanja pokazuju da kavezno gajeni brancin (*Dicentrarchus labrax*) u Mediteranskom moru i Italiji ima veći sadržaj PCB jedinjenja od brancina iz slobodnog izlova. Ove rezultate autori objašnjavaju prisustvom PCB jedinjenja u vodama Mediterana, ali i većim sadržajem masti u kavezno gajevoj ribi.

Kako je za djecu do šest godina prosječni dopušteni dnevni unos PCBs 27 do 50 ng /kg tjelesne težine, taj je unos u prosjeku kod djece 2,5 puta veći negoli kod odraslih. Posebno su izložena dojenčad, koja mogu dnevno unositi prilikom dojenja od 230 do 7300 ng/kg tjelesne težine PCBs. Kod populacije ribara s Baltičkog mora prosječni dopušteni unos PCBs putem ribe je oko 40 ng/ kg tjelesne težine, što može iznositi dnevno i do 80 ng/kg tjelesne težine.

Preventivne mjere

Strategija smanjenja rizika od unošenja PCBs slična je preventivnim mjerama koje su navedene za dioksine. smanjenje koncentracije dioksina i PCB-s imaju neposredan utjecaj na količine kontaminanata u hrani životinjskog porijekla, a samim tim i hrani za ljude. Ove mjere trebaju uključivati razvoj kodeksa dobre poljoprivredne prakse, dobre prakse hranjenja životinja, koji mogu smanjiti nivo dioksina i Id-PCB . Takve mjere mogu uključivati:

- identifikaciju mogućih kontaminiranih područja u ekosistemu hrane za ljude i hrane za životinje,
- identifikaciju porijekla često kontaminirane hrane ili sastojaka hrane i hrane za životinje, i
- praćenje usklađenosti sastojaka hrane i hrane za životinje sa nacionalno utvrđenim nivoima ili maksimalnim ograničenjima, ako su dostupni. Nadležni nacionalni organ treba da ispituju robu koja narušava granice, kako bi se utvrdilo da li se ta roba treba isključiti iz daljeg ishrane.
- Nadležna nacionalna tijela trebala bi povremeno uzorkovati i analizirati, koristeći priznate međunarodne metode, sumnjive sastojke za hranu i hranu za životinje, kako bi se provjerile količine PCBs dioksina i dioksina. Te će informacije odrediti, ako je potrebno, aktivnosti koje će smanjiti nivo dioksina i dioksina sličnih PCBs,

U nekim zemljama prihvaćene su tri metode za bezbjedno uklanjanje PCBs:

- sagorijevanje pri visokim temperaturama u pećima za spaljivanje,
- hemijska dehlorinacija, i
- skladištenje u podzemnim deponijama.

Kod PCBs treba smanjiti konzumaciju masti i ulja i ribe, posebno ribe predatora (grabežljivaca). Slično dioksinima, moguća je dekontaminacija ribljeg ulja i modifikacije prehrane u smislu istovremenog unosa prehrambenih vlakana bogatih ligninom koji sprječavaju apsorpciju PCBs.

Analitičke tehnike za određivanje sadržaja dioksina i PCBs u hrani

Osnovni zahtjevi za uzimanje uzoraka i metoda ispitivanja dioksina i PCB-ova su: visoka osjetljivost i nizak nivo detekcije, visoka selektivnost (specifičnost) i visoka tačnost i preciznost.

Zbog ekstremne toksičnosti nekih njihovih kongenera, količine (TEQ) koje treba da se detektuju su reda veličine 10^{-12} g (pikograma). Regulativom Komisije (EC) 1883/2006 propisane su metode za uzimanje uzoraka kao i za ispitivanje dioksina i PCB-ova sličnih dioksinima u određenim namirnicama.

Najčešće se kombinuje visoko rezolutna gasna hromatografija sa masenim spektrofotometrom (GC/MS), a kao konfirmativna metoda može jedino da se koristi gasna hromatografija visoke rezolucije kuplovana sa masenom spektrometrijom visoke rezolucije (HRGC/HRMS).

2.3. POLIČIKLIČNI AROMATSKI UGLJIKOVODICI

Policiklični aromatski ugljikovodici (eng. *Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs*) predstavljaju veliku grupu organskih jedinjenja, čiju strukturu čine dva ili više kondenzovanih aromatskih prstenova sastavljenih od ugljikovih i vodikovih atoma. Treba naglasiti da se ova jedinjenja uglavnom javljaju kao složene smjese, a ne kao pojedinačni spojevi.

PAHs su sveprisutni zagađivači životne sredine, a uglavnom potiču od pirolize i nepotpunog sagorjevanja organske materije. Definitivan mehanizam formiranja PAHs jedinjenja nije dobro poznat, međutim, prema nekim istraživačima mogu se formirati reakcijama slobodnih radikala, intramolekularnim dodatkom ili polimerizacijom malih molekula.

Agencija za zaštitu životne sredine (engl. *Environmental Protection Agency-EPA*) definisala je 16 prioriternih PAHs jedinjenja, zbog zabrinutosti u vezi sa njihovom kontaminacijom u hrani i životnoj sredini (Tabela 6).

Rasprostranjenost u okolišu

PAHs su značajni zagađivači životne sredine, te se mogu naći u vazduhu, vodi, namirnicama, zemljištu. Ne koriste se u industriji već su proizvodi nepotpunog sagorijevanja ili pirolize organske materije i geoloških procesa. Osim duhanskog dima, produkti su emisije brojnih procesa u okolišu, kao što su proizvodnja ugljena, sirove nafte, benzina i drugih goriva, prirodnoga plina, te proizvodnje teških i lakih metala (željeza, čelika, aluminijsa). Procesi kao što su izgaranje šuma, paljenje otpada i plastičnih masa u nedopuštenim i nekontroliranim uslovima također, doprinose formiranju ovih jedinjenja. Veliku količinu PAHs sadrže i izduvni gasovi automobila. Prisutni u malim koncentracijama svuda oko nas, PAHs povremeno dostižu i veoma velike koncentracije kao rezultat sve bržeg razvoja industrije.

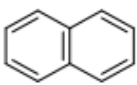
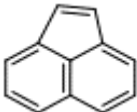
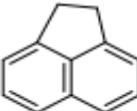
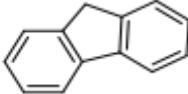
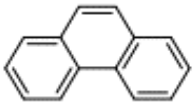
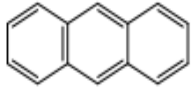
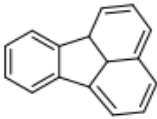
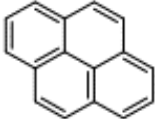
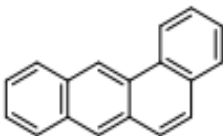
Dosadašnjim istraživanjima, utvrđeno je da su PAHs sa dva ili tri prstena (naftalen, acenaften, acenaften, antracen, fluoren, fenantren) prisutni u vazduhu u parnoj fazi. PAHs koji u svom sastavu imaju četiri prstena (fluoranten, piren, krizen, benzo[a]antracen), prisutni su i u parnoj i u čestičnoj fazi. PAHs sa pet ili više prstenova (benzo[a]piren, dibenzo[g,h,i]perilen) su pretežno prisutni u čestičnoj fazi vazduha. Koncentracija u vazduhu ovisi od lokacije i godišnjeg doba. Obično su koncentracije PAHs veće u zimskom periodu.

PAHs prisutni u zraku deponiraju se u zemljište, odnosno vodu. Naravno, to nije jedini način kontaminacije zemljišta i vode, koji se također mogu kontaminirati i odlaganjem određenog otpada, izlivanjem ulja, nafte i sl. U zemljištu, PAHs su adsorbovani od strane nepropustljivih čestica, i svojim kretanjem kontaminiraju i podzemne vode. Prosječna koncentracija kancerogenih PAHs u šumskom zemljištu kreće se od 5 µg do 100 µg/kg, dok ih poljoprivredna zemljišta sadrže u količini od 10 µg do 100 µg/kg. Najveća koncentracija kancerogenih PAHs registrovana je u ruralnim zemljištima, u iznosu od 600 do 3.000 µg/kg.

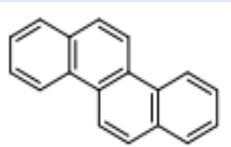
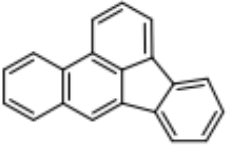
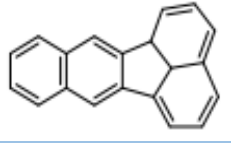
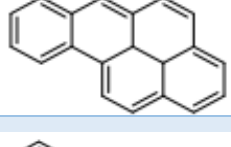
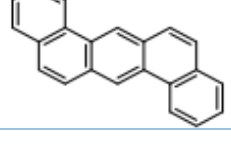
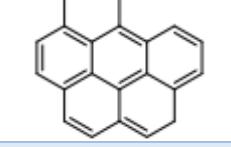
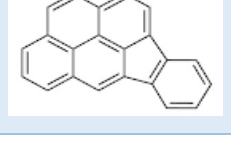
U vodu PAHs dospijevaju kroz industrijske otpadne vode i zagađene atmosfere, te navodnjavanjem i prihranjivanjem biljnih kultura. Dvije trećine PAHs u površinskim vodama nalazi se vezano za sediment, ostatak

je rastvoren. Oni se adsorbuju na čvrstim površinama i talože na dnu jezera ili rijeka.

Tabela 6. 16 prioritetnih PAHs jedinjenja definisanih od strane Agencije za zaštitu životne sredine (EPA)

	Jedinjenje	Skraćenica	Struktura
1.	Naftalen	NaP	
2.	Acenaftilen	Anl	
3.	Acenaften	Ane	
4.	Fluoren	Flu	
5.	Fenantren	Phen	
6.	Antracen	Ant	
7.	Fluoranten	Flt	
8.	Piren	Pyr	
9.	Benzo [a] antracen	BaA	

nastavaka tabele

10.	Krizen	Chry	
11.	Benzo [b] fluoranten	BbF	
12.	Benzo [k]fluoranten	BkF	
13.	Benzo [a] piren	BaP	
14.	Dibenzo [a,h] antracen	DahA	
15.	Benzo [g,h,i] perilen	BghiP	
16.	Indeno [1,2,3-cd] piren	InP	

Zdravstveni rizici

Kancerogena aktivnost pojedinih PAHs veoma je zavisna od njihove strukture. PAHs koji su građeni od 5 i 6 prstenova više su kancerogeni u

odnosu na PAH-ove koji sadrže 2 ili 3 prstena. Kancerogenost je potvrđena za benzo [a] piren, benzo [a] antracen i benzo [a,h] antracen, dok je kancerogenost moguća za benzo [b] fluoranten, benzo [k] fluoranten, benzi [j] fluoranten, dibenzo [a,e] piren, dibenzo [a,h] piren, dibenzo [a,i] piren, dibenzo [a,l] piren, indeno [1,2,3-c,d] piren i 5-metilkrizen. Benzo [a] piren je jedan od najpoznatijih kancerogena među PAHs, i od strane IARC-a je svrstan u prvu grupu 2A kancerogena.

Štetni efekti PAHs jedinjenja su istaknuti ne samo za različite vrste raka, već i za negenotoksične bolesti (kao što su dijabetes melitus (DM) i kardiovaskularni poremećaji). Povećana učestalost unosa PAHs u hrani rezultirala je defektima metabolizma, zbog njihove trajne bioakumulacije u hranidbenom lancu. Ciljna tkiva za kancerogeno djelovanje benzoapirena su aktivna i brzo proliferišuća tkiva (epitel, GIT, kosna srž, limfoidni organi).

Otpornost PAHs na degradaciju ometa aktivnost tetrabola glukoze i funkciju β -stanica, kao potencijalni uzrok dijabetesa tipa 2. Ovi negenotoksični efekti kontinuiranog izlaganja životnoj sredini i ishrani (ugljenisano i pečeno meso) postali su jedan od značajnih doprinosa neformalnog faktora razvoju metaboličkog sindroma u smislu dislipidemije i povišenog krvnog pritiska.

Prvobitno je Evropska Komisija regulativom iz 2005. godine (EU L 34, 2005/108/EC i 2005/Jecfa/64/SC) predložila zemljama članicama da se u namirnicama ispituje prisustvo 16 PAHs. Benzo [a] piren je korišten kao marker prisustva PAH jedinjenja u uzorcima. Naknadno, Evropska Unija je Regulativom od 19. 08.2011. godine (EU L 215 No 835/2011) utvrdila da se benzo [a] pirene može više koristiti kao marker, i indikator prisustva PAHs. Određeno je da se umjesto benzo [a] pirena, kao indikatora prisustva PAH jedinjenja, u uzorcima hrane, koristi sumarni sadržaj četiri PAH jedinjenja: benzo [a] piren, benzo [a] antracen, benzo [b] fluoranten i krizen. Pri tome, Komisija je propisala MDK za ova četiri PAH jedinjenja.

Transfer PAHs iz okoliša u lanac ishrane

Neprocesuirana hrana može biti kontaminirana PAHs prisutnima u zraku (depozicija/taloženje), u zemljištu (migracija iz tla) i vodi (depozicija i migracija). U područjima udaljenima od velikih urbanih i industrijskih središta (ruralna područja), količina PAHs u neobrađenoj hrani posljedica je zagađenosti okoliša, i to obično nakon velikih šumskih požara ili erupcija vulkana.

Kontaminacija hrane PAHs, iz okoliša, ovisi o fizikalno-hemijskim svojstvima PAHs, kao što su: relativna topljivost u vodi i organskim otapalima, isparljivost, hemijska reaktivnost, biotička i abiotička razgradivost.

PAHs su detektovani i u biljnim i životinjskim tkivima. Primijećeno je da je lisnato povrće obično više kontaminirano od stabljičastog povrća, zbog njihove veće površine, koja je osjetljiva na taloženje PAHs. Korjenasto povrće (krompir, rotkvica i mrkva) je sklonije lakšem unosu PAHs iz kontaminiranih lokacija zemljišta (zbog njihovog velikog potencijala da prodru ispod zemljišta) u odnosu na matično povrće (krastavac, patlidžan i paradajz). Međutim, tip izvora zagađenja (Tabela 7) ili lokacije (npr. blizu industrijskih postrojenja, aerodroma i autoputeva) povećava iznos PAHs. Time se ukazuje na značajnu ranjivost biljnih tkiva na akumulaciju zagađivača kao što su PAH iz zračnih naslaga.

Općenito, PAHs pripadaju skupini lipofilnih spojeva slabo topljivih u vodi. Topljivost u vodi smanjuje se povećanjem molekularne mase. Zbog toga se PAHs neće akumulirati u biljkama koje imaju visoki sadržaj vode, te će zbog toga migracija PAHs iz zemljišta u korijen biljke biti ograničena. Zbog vrlo niske isparljivosti, većina PAHs ima vrlo visoku tendenciju adsorpcije u organsku materiju. Stoga, koncentracija PAHs je veća na površini biljke, nego u unutrašnjem tkivu.

PAHs se može pojaviti u mastima i uljima, kao što su suncokretovo, maslinovo, sojino, palmino i drugim biljnim uljima. Biljna ulja, mogu biti kontaminirana PAHs iz zraka, tokom njihove proizvodnje (procesu zagrijavanja ili ekstrakcija organskim otapalima) i ili u kontaktu s dimom od izgaranja goriva.

Podaci pokazuju da kokosovo ulje može sadržati više količine PAH-ova u odnosu na druga biljna ulja i masti. Ovo je zbog proporcionalno veće prisutnosti benzo[a] antracena i krizena, koji ne mogu biti tako lako uklonjeni, tokom prerade kokosovog ulja.

Tabela 7. Rasponi PAHs (%) u maslinama koje su izložene različitom okruženju (Rodríguez-Acuña i sar., 2008)

PAHs	Aerodromski region	Urbano područje	Ubrano kombajnom
BaA	11,5 - 13,2	7,5 - 8,5	4,8 - 6,1
Chr	46,5 - 57,3	20,9 - 24,0	6,3 - 9,2
BbF	13,5 - 16,9	17,5 - 18,6	16,1 - 20,0
BkF	5,3 - 6,2	7,0 - 7,3	4,5 - 7,3
BaP	2,5 - 3,0	5,5 - 6,4	9,6 - 13,7
BghiP	2,1 - 3,3	14,8 - 16,5	13,7 - 18,8
InP	2,6 - 3,9	7,1 - 8,3	9,9 - 13,5

U vodenoj sredini većina PAHs podliježe fotolizi odakle ih preuzima akvatični svijet (ribe, rakovi, školjkaši itd.).

Prosječan sadržaj PAHs je manji u muskulaturi riba, nego u tkivima mekušaca, jer ribe (za razliku od školjkaša) imaju sposobnost da oksidiraju i dalje metaboliziraju PAHs u vodotopive spojeve koje izlučuje živi organizam. Uglavnom, jestivi dio ribe iz nezagađenih mora ne sadrži detektabilne količine benzo [a] pirena. Kod nekih vrsta riba (sardina, skuša), zabilježena su samo četiri PAHs, niske molekularne težine, naftalen, acenaften, fluoren i fenantren. Nisu detektovani PAHs visoke molekularne težine niti benzo [a] piren. Ovi rezultati su potvrđeni studijom istih vrsta riba, gdje su pronađena samo tri nisko molekularna PAHs (acenaften, fluoren i fenantren). Zbir njihovih sadržaja kretao se od 0,73 µg / kg do 6,6

$\mu\text{g} / \text{kg}$. Sličan profil PAHs je uočen kod soma. Dominantni PAH izmjeren u uzorcima tune bio je naftalen.

Prosječna koncentracija benzo [a] pirena u školjkašima je uglavnom znatno ispod $10 \mu\text{g} / \text{kg}$. Međutim, uzorci uzeti iz zagađenih voda mogu sadržati veće količine. U jestivim dijelovima školjkaša sadržaj benzo [a] pirena je ispod granica detekcije ili ne viši od nekoliko $\mu\text{g} / \text{kg}$.

Kontaminacija hrane PAHs može nastupiti i tokom procesa njene obrade i prerade (*vidi poglavlje Kontaminanti koju nastaju toplotnom obradom*

2. 4. TOKSIČNI TEŠKI METALI

Izraz „teški metali” često se koristi za grupu metala i polumetala (metaloidea) koji se dovode u vezu s kontaminacijom i potencijalnim toksičnim efektom. Elemente koji pripadaju grupi „teških metala” različiti autori su definisali različitim vrijednostima relativne gustoće, od gustoće iznad $3,5 \text{ g/cm}^3$, najčešće iznad 5 g/cm^3 , zatim iznad 6 g/cm^3 ili čak iznad. U literaturi u Bosni i Hercegovini po definiciji teški metali su oni metali čija gustina prelazi vrijednost od 5 g/cm^3 .

Sve navedene definicije uključuju elemente bitno različitih bioloških i ekoloških važnosti, posebno s aspekta neophodnosti, korisnosti i toksičnosti, kako za biljne, tako i za životinjske organizme. Ovu grupu hemijskih elemenata, vrlo heterogenu s hemijskog, fiziološkog i ekološkog aspekta, najčešće u svijetu nazivaju „elementima u tragovima“, a definisana je kao grupa elemenata koji su u veoma niskim koncentracijama (mg/kg ili manje) prisutni u većini zemljišta, biljaka i živih organizama.

Elementi u tragovima koji su intenzivno proučavani u posljednjim dekadama uključuju bakar (Cu), cink (Zn), željezo (Fe), mangan (Mn), molibden (Mo), bor (B), kobalt (Co), nikal (Ni), olovo (Pb), kadmij (Cd), hrom (Cr), arsen (As), živu (Hg) i selen (Se). Metali neophodni za više biljke i sisavce su željezo (Fe), mangan (Mn), cink (Zn), bakar (Cu) i molibden (Mo). Za biljke su još neophodni metal nikal (Ni) i polumetal bor (B), a za

životinjske organizme metal kobalt (Co) i nemetal selen (Se). Literatura, uglavnom metale kao što su olovo (Pb), kadmij (Cd), živa (Hg) i arsen (As), prepoznaje kao teške metale od toksikološkog značaja.

Rasprostranjenost teških metala u okolišu

Teški metali imaju normalan biogeochemijski ciklus, jer se uključuju u proces kruženja materije u ekosistemu, odnosno uključuju se u metabolizam ekosistema. Intenzitet tog kruženja je neravnomjeran u toku godine i zavisi od sezonskih promjena, klimatskih uslova i aktivnosti bioloških sistema.

U vazduhu se teški metali mogu nalaziti u obliku čestica (aerosola) i gasova. Vrijeme zadržavanja u atmosferi zavisi od veličine čestica. Veće čestice iz industrijskih i urbanih izvora imaju uglavnom kratko vrijeme zadržavanja, obično oko 10 sati. Ukoliko se radi o sitnijim česticama koje mogu dospjeti u stratosferu, vrijeme zadržavanja može biti i više od godinu dana. Prosječno vrijeme zadržavanja aerosola u troposferi iznosi od 6 do 12 dana, što je dovoljno da se čestice metala transportuju daleko od izvora emisije i na taj način ugroze veća područja.

Prisutnost teških metala u zemljištu posljedica je prirodnih i antropogenih procesa (Tabela 8). Prirodni su pedogenetski procesi kojima zemljište nasljeđuje teške metale iz matičnog supstrata, a antropogeni procesi uključuju urbanizaciju, industrijalizaciju, promet i poljoprivrednu proizvodnju. U udaljenim područjima s malim antropogenim utjecajem na atmosfersku depoziciju, teški metali u zemljištu su većinom porijeklom iz matičnog supstrata. U urbanim i poljoprivrednim područjima koncentracije teških metala u zemljištu veće se od koncentracija u matičnim supstratima zbog kontinuiranog unosa u ekosistem. Geogeno porijeklo ekološki najinteresantnijih teških metala, Cu, Cd i Pb, najčešće je povezano sa sumpornim mineralima koji u okolišu relativno brzo oksidiraju, te se metalni kation odvaja od sumpora u ranoj fazi trošenja minerala.

Teški metali iz atmosfere suhom depozicijom ili u obliku padavina dopijevaju i talože se na zemljištu kao i na dnu vodenih površina kao teško rastvorljivi karbonati, sulfati ili sulfidi. Kad se adsorpcijski kapacitet

sedimenata iscrpi, raste koncentracija metalnih jona u vodi. Ako rijeke i jezera sadrže značajnije koncentracije ovih polutanata oni mogu dosta doprinijeti kontaminaciji obradivih površina, plavljenjem zemljišta.

Tabela 8. Izvori zagađenja i porijeklo teških metala u zemljištu (Wilson i sar., 2008.)

Element	Matična stijena s visokom koncentracijom	Izvor zagađenja
As	Sedimentni materijali bogati sulfidima (npr. ugljen); sulfidi i rude Ag, Pb, Cu, Ni	Konzerviranje i obrada drveta; pesticidi; izgaranje ugljena; rudarstvo; talionice
Cd	Često zajedno sa Zn; visoke koncentracije u klasičnim pelitima i u škriljcima	Atmosferska depozicija; industrijski i komunalni otpad; fosfatna gnojiva; kanalizacijski mulj; rude i taljenje Zn
Cr	Ultrabazične magmatske stijene i stijene niskog stupnja metamorfoze; serpentiniti	Različiti industrijski otpad; završna obrada metala i oplata; elektronika; obrada drveta
Cu	Minerali s Cu, Fe i S; najobilniji u bazičnim magmatskim stijenama	Komunalni mulj; talionički otpad; peradski i svinjski stajski gnoj
Hg	Uglavnom niska koncentracija, veće koncentracije uz sulfide u stijenama, npr. u škriljcima; cinabarit (HgS) i sulfidni minerali s As, Se, Ag, Zn, Pb	Izgaranje fosilnih goriva; vulkanska aktivnost; gradski mulj; tretirano sjeme; industrijski procesi
Ni	Ultrabazične magmatske stijene i stijene niskog stupnja metamorfoze; serpentiniti	Rudarstvo, talionice, industrijski procesi
Pb	Uglavnom niska koncentracija, veće koncentracije uz sulfide u stijenama; galenit (PbS)	Automobili; transportni sistemi; boje
Se	Morski sedimenti iz perioda kasne krede i tercijara	Rudarstvo; irigacija na područjima bogatim selenom.

Pored atmosferske depozicije, u povećanju količina teških metala u zemljištu, značajan je i doprinos poljoprivrede. Poljoprivredna proizvodnja doprinosi akumulaciji teških metala u površinskim slojevima poljoprivrednih zemljišta primjenom različitih agrotehničkih mjera:

- gnojidba mineralnim gnojivima (prirodni minerali, pojedinačna i složena gnojiva),
- gnojidba organskim gnojivima (stajska gnojiva, komposti, organski ostaci),
- kondicioniranje tala (kalcizacija, zakiseljavanje, poboljšivači teksture),
- aplikacija pesticida,
- navodnjavanje i fertigacija.

Značajan dio pesticida, fungicida i herbicida također sadržavaju bakar, cink, željezo, mangan, pa i arsen, a pojedini teški metali kao kadmij i olovo unose se u zemljište kao nečistoće prisutne u gnojivima. Organska gnojiva, kao stajska gnojiva i komposti, mogu sadržavati veće koncentracije teških metala nego poljoprivredna zemljišta. Posljedica kontinuirane upotrebe takvih organskih gnojiva je povećanje ukupne koncentracije teških metala u zemljištima. Pri tome je značajan pozitivan uticaj gnojidbe na raspoloživost esencijalnih teških metala, osobito na laganim pjeskovitim i karbonatnim zemljištima, ali je negativna posljedica povećanje koncentracije toksičnih teških metala kao Cd-a i Pb-a. Najveći značaj među mineralnim gnojivima u pogledu teških metala (Tabela 9) kao nečistoća imaju fosfatna gnojiva, tj. sirovi fosfati kao pojedinačna gnojiva ili kao sirovina za proizvodnju pojedinačnih i složenih gnojiva. Stoga, u većini zemalja propisana je maksimalna koncentracija pojedinih teških metala u organskim gnojivima.

Smanjenjem pH vrijednosti sa 7 na 4 povećava se mobilnost metala u zemljištu. To znači da u kiselom zemljištu postoji mogućnost kontaminacije biljaka teškim metalima. Iako se aktivnost metala smanjuje sa povećanjem pH iznad 7, postoje određene interakcije u rastvoru zemljišta koje pokazuju dostupnost metala biljkama.

Prisutnost toksičnih metala u prehrambenom lancu upravo je posljedica zagađenja okoline i njihove koncentracije moraju biti pod stalnom kontrolom, jer predstavljaju ozbiljne opasnosti za zdravlje ljudi. Upotreba teških metala raširena je i u prehrambenoj industriji (oprema i posuđe) što povećava mogućnost nastanka kontaminacije finalnog proizvoda.

Tabela 9. Primjeri koncentracija (u mg kg⁻¹) teških metala u različitim gnojivima (Vukobratović, 2008.)

Gnojivo	Fe	Cu	Ni	Cr	Cd	Pb	Co
Goveđi stajski gnoj	2927	35,0	9,5	14,2	0,24	5,27	1,30
Konjski stajski gnoj	6357	24,0	17,3	27,4	0,30	16,0	2,44
Svinjski stajski gnoj	13740	81,0	20,1	37,8	0,90	5,72	2,00
Pileći stajski gnoj	669	48,0	9,1	10,1	0,45	2,28	0,94
Goveđi kompost	4943	67,0	23,3	46,5	0,56	4,04	3,00
Konjski kompost	5807	22,0	30,2	68,4	0,59	19,6	2,74
Svinjski kompost	18620	119,0	30,4	70,9	1,19	7,00	2,83
Pileći kompost	1015	76,0	14,7	18,4	0,69	1,64	2,15

Transfer teških metala iz zemljišta u biljku i hranu osnova je ulaska teških metala u prehrambeni lanac. Faktor/koeficijent prenosa (FP) opisuje transfer teških metala iz zemljišta do biljke (jednačina 2).

$$FP = \frac{\text{Koncentracija teških metala u biljci}}{\text{Koncentracija teških metala u zemljištu}} \quad \dots (2)$$

Generalno, vrijednosti FP-a su povećane sa smanjenjem koncentracije teških metala u zemljištu.

Olovo (Pb)

Olovo je metal koji se može naći u svim dijelovima našeg okoliša (u kopnenim vodama, moru, zemljištu i zraku). Prirodne emisije olova su vulkani, šumski požari i biogeni izvori. Nešto olova (^{210}Pb) se formira u atmosferi raspadanjem radona. Antropogeni izvori uključuju emisije izvora olova na globalnoj skali, poput sagorijevanja fosilnih goriva, proizvodnje neobojenog metala i željeza, i proizvodnje čelika.

Upotreba olova veoma je raznovrsna – koristilo se u proizvodnji motornih goriva, baterija, streljiva, metalnih proizvoda, za zaštitu od x-zraka, bilo je primjesa boja, amalgama, a upotrebljava se i na razne druge načine. Olovo je zastupljeno u organskom i neorganskom obliku, a u okolišu je češće neorgansko od organskog olova. Glavna oksidacijska stanja olova su +2 i +4, iako je +2 u okolišu rasprostranjeniji oblik. Njegova koncentracija u zraku varira u ovisnost od lokacije i vremenskim uslova. U ruralnih područjima koncentracija olova u zraku iznosi 0,04 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, a u urbanim 0,27 $\mu\text{g}/\text{m}^3$.

Rastvaranje olova u vodi zavisi o njenom aciditetu (pKa), slanosti, prisutnost humusnih materijala i od hemijskih osobina same vode (pH, tvrdoća, koncentracija hlorida i nitrata, temperatura).

Zdravstveni rizici

Utvrdene štetne posljedice izlaganju olovu uključuju neurotoksičnost, anemiju, hipertenziju i kardiovaskularne bolesti, nefrotoksičnost, imunosupresiju, reproduktivnu i razvojnu toksičnost, te potencijalne kancerogene efekte visokih doza. Osjetljive populacijske skupine uključuju fetuse i malu djecu. Također, rizične podskupine su trudnice, dojilje i starije osobe, te osobe s deficitarnim unosom pojedinih elemenata.

Kao metal sa kumulativnim dejstvom olovo je konkurentno esencijalnim metalima (gvožđu, kalcijumu, bakru i cinku) za njihove brojne funkcije u organizmu, posebno one vezane za prisustvo slobodnih –SH grupa u dijelovima biomolekula proteina i enzima. Prema fizičko–hemijskim osobinama, Pb^{2+} može lako da zamjeni Ca^{2+} u kalcifikovanim tkivima

(kostima i zubima), ali i u različitim rastvornim kompleksima ovog metala sa bioligandima u biološkim tečnostima i tkivima. Nakon apsorpcije u crijevnoj barijeri olovo putem krvi prelazi na tkiva, gdje se akumulira. Olovo u kostima doprinosi razvoju osteoporoze, smanjenju koštane mase, promjeni strukture i povećanoj resorpciji kostiju kod starijih osoba. Olovo može preći od majke na dijete još u stomaku ili putem dojenja. Prihvatljivi sedmični unos za odraslu osobu je 25 µg/kg, dok sedmična doza za djecu još uvijek nije uspostavljena zbog nedostatka relevantnih naučnih podataka.

Transfer olova (Pb) u lanac ishrane

U kontaminiranim područjima, olovo se iz zemljišta apsorbira u biljke i nakuplja u životinjama. Hrana je najzagađenija u industrijskim područjima i blizu autoputeva, gdje olova u biljkama ima bar 10 puta više nego u ruralnom području. Nakupljanje olova u biljkama, u blizini autoputeva zavisi od udaljenosti biljaka od saobraćajnice, pokrovnosti zemljišta biljkama, dužine trajanja vegetacije, pravca i intenziteta vjetra. Transfer olova, iz zemljišta u biljku, se povećava ukoliko je pH zemljišta ispod 6,5. Dodatak organske materije u zemljište, kod pH iznad 6,5 smanjuje njegovu dostupnost, jer nastaju kompleksi olova sa organskom materijom. Biljke olovo u neorganskom obliku slabo usvajaju, izuzev na kiselim zemljištima. Organska jedinjenja olova, veoma se brzo usvajaju i transportuju u nadzemne dijelove biljaka. Taloženje olova kod većine biljaka intenzivnije je u korijenu u odnosu na nadzemne dijelove.

Smatra se da pšenica i soja imaju relativno visoku tolerantnost prema olovu. Špinat, salata, kopriva (Tabela 10) se ubrajaju u osjetljiva biljke. Zemljišta na kojima se gaje čajevi su obično kisela, što utječe na povećanu mobilnost metala i povećano usvajanje. Posebno, visoka koncentracija olova ističe se u biljnom čaju od lista nane. Također, čajevi gajeni u blizini saobraćajnica su izloženi povišenim koncentracijama olova.

Tabela 10 . Prosječan sadržaj olova (mg/kg) u salati i koprivi na 6 analiziranih lokacija u Bosni i Hercegovini (Karalić, 2017)

Lokalitet	Sadržaj Pb u salati	Sadržaj Pb u koprivi
	$\bar{x} \pm Sd$	$\bar{x} \pm Sd$
Gornji Čajdraš	0,36 $\pm$ 0,001	0,24 $\pm$ 0,002
Gradišće	0,19 $\pm$ 0,001	0,77 $\pm$ 0,001
Janjići	0,07 $\pm$ 0,001	2,12 $\pm$ 0,001
Šerići	0,61 $\pm$ 0,001	0,12 $\pm$ 0,001
Stranjani	0,08 $\pm$ 0,001	0,54 $\pm$ 0,001
Tetovo	0,76 $\pm$ 0,001	1,81 $\pm$ 0,001

Životinje, npr. goveda, ovce, kokoši i sl., izložene su olovu konzumacijom hrane (trave, sjemenja) iz onečišćenoga zemljišta. Kod riba unos olova dostiže ravnotežu tek nakon niza sedmica izloženosti. Koncentracije olova su, uglavnom zbog apsorpcije, veće u škrgama i koži ali se olovo akumulira i u jetri, bubregu i kostima, dok se u mišićnom tkivu riba olovo ne akumulira. Iako olovo postoji u mnogim različitim oblicima, u morskim i kopnenim vodama, najviše olova kojeg možemo naći u okolišu i ribi je neorganske prirode, te je vezano za bjelančevine. U školjkama je koncentracija olova viša u kalcijem bogatoj ljušturi nego u mekom tkivu, zavisno od koncentracije olova u sedimentu.

U prosječnih odraslih potrošača u Evropi izloženost olovu putem prehrane varira od 0,36 do 1,24 pa sve do 2,43 $\mu\text{g/kg}$ tjelesne mase po danu kod većih potrošača. Izloženost se kod novorođene djece kreće u rasponu od 0,21 do 0,94 $\mu\text{g/kg}$ tjelesne mase, a kod djece 0,80 do 3,10 (prosječni potrošači do 5,51 (veći potrošači) $\mu\text{g/kg}$ tjelesne mase po danu. U Tabeli 11 su prikazane MDK olova u hrani prema trenutno važećem Pravilniku o maksimalno dozvoljenim količinama za određene kontaminante u hrani u BiH (Sl. glasnik BiH, broj 68/2014 i 79/16).

Tabela 11. MDK olova (Pb) za neke vrste hrane u Bosni i Hercegovini

Hrana	MDK (mg/kg)
Sirovo mlijeko, toplotni obrađeno mlijeko i mlijeko za proizvodnju mliječnih proizvoda	0,020
Početna i prijelazna hrana za dojenčad	
• stavljena na tržište kao prah	0,050
• stavljena na tržište kao tekućina	0,010
Prerađena hrana na bazi žitarica i hrana za dojenčad i malu djecu osim pića za dojenčad i malu djecu	0,050
Hrana za posebne medicinske potrebe isključivo namijenjena dojenčadi i maloj djeci	
• stavljena na tržište kao prah	0,050
• stavljena na tržište kao tekućina	0,010
Piće za dojenčad i malu djecu označena i stavljena na tržište kao takva, osim početne i prijelazne hrane za dojenčad i hrane za posebne medicinske potrebe	
• stavljena na tržište kao tekućina ili za rekonstituciju prema uputstvima proizvođača, uključujući voćne sokove	0,030
• za pripremu u obliku rinfuza ili kuhanjem u kipućoj tekućini	1,50
Meso (osim iznutrica) goveda, ovaca, svinja i peradi	0,10
Mišićno meso riba	0,30
Glavonošci	0,30
Ljuskari	0,50
Školjkaši	1,50
Žitarice i mahunarke	0,20
Povrće osim lisnatih kupusnjača, turovca, lisnatog povrća i svježeg bilja, gljiva, morske trave i plodovitog povrća	0,10
Lisnate kupusnjače, turovac, lisnato povrće osim svježeg bilja i slijedećih gljiva <i>Agaricus bisporus</i> (plemenita pečurka ili šampinjon, <i>Pleurotus ostreatus</i> (bukovača), <i>Lentinula edodes</i> (shitake)	0,30
Voće, osim brusnica, ribizla, bazginih bobica i plodova planike	0,10
Brusnica, ribizla, bazgine bobice i plodovi planike	0,20
Masti i ulja, uključujući mliječnu mast	0,10
Voćni sokovi, rekonstituirani koncentrirani voćni sokovi i voćni nektari	
• isključivo od bobičastog i ostalog sitnog voća	0,05
• od voća osim bobičastog i ostalog sitnog voća	0,03
Vino (uključujući pjenušavo vino, osim likerskih vina), jabukovača, kruškovača i voćno vino	
• proizvodi proizvedeni od plodova berbe 2001. do berbe 2015.	0,20
• proizvodi proizvedeni od plodova berbe 2016. nadalje	0,15
Med	0,10

Kadmij (Cd)

Kadmij nema esencijalne biološke funkcije, ali je pronađen u više od 1000 vrsta terestrične i akvatične flore i faune. On je najopasniji teški metal u zemljištu i životnoj sredini, zbog čega mu se i posvećuje posebna pažnja.

Prirodni izvor kadmija je matični supstrat i najčešće se pojavljuje u sastavu sfalerita i galenita, tj. kao primjesa u sulfidnim rudama cinka i olova. Antropogena emisija kadmija u atmosferi javlja se kod proizvodnje i upotrebe kadmija i njegovih spojeva, odlaganja otpada koji sadrži kadmij, spaljivanja fosilnih goriva, proizvodnje cementa itd. Stijene i rude koje se kopaju za proizvodnju fosfatnih đubriva sadrže različite količine kadmija, što dovodi do toga da koncentracija ovog metala naraste i do 300 mg u 1 kg proizvedenih fosfatnih đubriva.

U različitim medijima biosfere različite su koncentracije kadmija, tako u zraku prosječna koncentracija je oko $0,01 \mu\text{g}/\text{m}^3$, u zemljištu je 1 ppm, u vodi 1 ppb i u hrani do 0,05 ppm. U područjima gdje je teška industrija koncentrirana na malom području ove koncentracije znatno nadmašuju gornje vrijednosti. U ovim područjima zrak sadrži i $0,3 \mu\text{g}/\text{m}^3$, zemljište 50 ppm, voda 20 ppm i hrana 400 ppm kadmija, što za posljedicu ima povećanu koncentraciju kadmija u organizmu odrasle osobe (do 90 mg). Studije o prisustvu ovog teškog metala, u gornjim slojevima obradivog zemljišta, pokazuju da su prisutne visoke koncentracije i da premašuju brzinu otklanjanja.

Zdravstveni rizici

Kadmij je prvenstveno nefrotoksičan. Kod jako visokih doza (ili hroničnim unosom uz nedostatak Ca) izaziva demineralizaciju koštanog tkiva i eventualno napuknuća i deformacije kostiju izazivajući tzv. itai-itai ili bolest bolnih kostiju. Kadmij se prenosi u majčino mlijeko, kod trudnica izaziva malformacije, smanjenje težine fetusa i abnormalnosti dezoksiribonukleinske kiseline (DNK) i proteina bebe, te u većim koncentracijama abortus. Rizične grupe čine i stariji ljudi, ljudi sa

dijabetesom i pušači. Međunarodna agencija za istraživanje raka (IARC) klasificirala je kadmij u grupu I kancerogena.

Transfer kadmija (Cd) u lanac ishrane

Zemljište je jedno od bitnih izvora zagađenosti kadmijem. Značajna količina kadmija u zemljištu, se može naći ukoliko se zemljište gnoji otpadnim vodenim muljem. Kadmij, apsorbiran iz zemljišta, najvećim dijelom se zadržava u korijenu. Udio ovog elementa u stablu i listovima biljaka je približno isti, ali manji od njegove koncentracije u korijenu. Međutim, usjevi, npr., u blizini rudnika cinka ili deponija otpada, mogu biti onečišćeni prašinom koja sadrži kadmij, što dovodi do povišene koncentracije kadmija u nadzemnom dijelu biljke.

Kod brojnih biljnih vrsta intenzitet transporta kadmija, u nadzemne organe, u korelaciji je sa njegovom koncentracijom u hranljivoj podlozi. Prenos i apsorpcija kadmija u biljke uglavnom zavise od pH vrijednosti, kombinacije minerala, tipa i organske kombinacije zemljišta.

Konzumacijom preko biljaka direktno ili preko životinja, kadmij ulazi u hranidbeni lanac. Kadmij je prisutan u niskim koncentracijama u većini namirnica, poput žitarica za doručak, voća, povrća. Riža i neke divlje gljive mogu da sadrže visoke koncentracije kadmija. Meso i riba daju najveći doprinos izlaganju kadmiju, upravo zbog činjenice da su to namirnice koje se konzumiraju u najvećim količinama.

Veće količine kadmija su kod morskih organizama (školjkaši i rakovi) u odnosu na količine kod slatkovodnih organizama. Najveća koncentracija ovog teškog metala je pronađena u iznutricama sisara, te dagnjama i ostrigama.

Mliječni proizvodi dnevno obezbjeđuju 4 do 5 µg kadmija. Koncentracija kadmija u mlijeku (Tabela 12) zavisi od geografske regije i uticaja okoline.

Tabela 12. Prosječne količine Cd-a (mg/kg) u sterilisanom mlijeku u ovisnost od geografskog regiona (Bandić, 2018)

Mlijeko-eko	Cd
Meggle (2,8% mliječne masti, BiH)	1,825
Dukat trajno (2,8% mliječne masti, BiH)	1,630
MizoDrink (2,8% mliječne masti, Rumunija)	1,657
Milkos trajno (2,8% mliječne masti, BiH)	0,113
MilkLand (2,8% mliječne masti, BiH))	0,129
Domaće blago, trajno (2,8% mliječne masti, BiH))	0,280
Zbregov trajno + Ca 1,6% mm (Hrvatska)	0,717
Alpsko Lakhoten (1,5% mliječne mast, bez laktoze, Slovenija)	0,593
Zdenka mlijeko (2,8% mliječne masti, Hrvatska)	1,049
Zbregov + Ca 1,6% (Hrvatska)	nd ⁺

⁺nd – nije identifikovan

Uredba Evropske komisije br. 1881/2006/EZ (EC, 2006) o najvećim dopuštenim količinama kontaminanata u hrani, i njene izmjene i dopune 629/2008/EZ (EC, 2008) ne navodi maksimalno dozvoljenu količinu kadmija za sirovo, toplotno obrađeno, i mlijeko za proizvodnju mliječnih proizvoda. Također, Pravilnik o maksimalno dozvoljenim količinama za određene kontaminante (Tabela 13) u hrani (Sl. glasnik BiH, broj 68/2014 i 79/16) ne navodi maksimalno dopuštene koncentracije kadmija u mlijeku.

Tabela 13. MDK Cd za neke vrste hrane u Bosni i Hercegovini.

Hrana	MDK (mg/kg)
Povrće i voće, osim korjenastog i gomoljastog povrća, lisnatog povrća, svježeg začinskog bilja, lisnatih kupusnjača, stabljičastog povrća, gljiva i morske trave	0,050
Lisnato povrće, svježe začinsko bilje, lisnate kupusnjače, celer, celer korjenaš, pastrnjak, turovachren i slijedeće gljive <i>Agaricus bisporus</i> (plemenita pečurka ili šampinjon, <i>Pleurotus ostreatus</i> (bukovača), <i>Lentinula edodes</i> (shitake)	0,20
Meso (osim iznutrica) goveda, ovaca, svinja i peradi	0,050
Konjsko meso, osim iznutrica	0,20
Jetra goveda, ovaca, svinja, peradi i konja	0,50
Bubreg goveda, ovaca, svinja, peradi i konja	1,0
Mišićno meso slijedećih riba skuša (<i>Scomber species</i>), tuna (<i>Thunnus species</i>, <i>Katsuwonus pelamis</i>, <i>Euthynus species</i>, <i>Sicyopterus lagocephalus</i>)	0,10
Školjkaši	1,0
Glavonošci (bez utrobe)	1,0
Početna hrana za dojenčad i prijelazna hrana	0,010 od
Hrana za dojenčad u prahu proizvedena od bjelančevina kravljeg mlijeka ili hidrolizata bjelančevina	01.01.2015.
Tekuća hrana za dojenčad proizvedena od bjelančevina kravljeg mlijeka ili hidrolizata bjelančevina	0,005 od 01.01.2015.
Prerađena hrana na bazi žitarica i hrana za dojenčad i malu djecu	0,040 od 01.01.2015.
Dodaci ishrani koji se isključivo ili uglavnom sastoje od suhe morske trave, proizvoda dobivenih od morske trave ili od sušenih školjakaša	3,0

Živa (Hg)

Živa se u prirodi nalazi u tri hemijska oblika – elementarna, neorganska i organska živa, koji imaju različitu toksičnost. U okoliš dospijeva iz prirodnih i antropogenih izvora. Erozija zemljišta i ispiranje stijena, erupcija vulkana, bakterijska razgradnja organskih živinih jedinjenja, ali i bakterijska indukcija stvaranja organske žive, posebno – metil žive (najtoksičnijeg jedinjenja žive), ubrajaju se među značajnije prirodne izvore žive u okolišu. Industrije koje koriste živu u tehnološkim procesima, rudarska industrija, izgaranje fosilnih goriva, termoelektrane, spaljivanje otpada, ubrajaju se među značajnije antropogene izvore žive u okolišu.

Ovisno o načinu ulaska u hidrosferu živa se može pronaći u različitim jedinjenjima. U moru je najčešće zastupljena u organskim jedinjenjima ili u obliku jedinjenja živinog hlorida (HgCl_4 i HgCl_2). U anoksičnim sedimentima najčešće se nalazi u spojevima živinog sulfida (HgS i HgS_2) ili kao elementarna živa. Najčešći oblik organske žive, koji se akumulira u prehrambeni lanac, je metil-živa (HgCH_3).

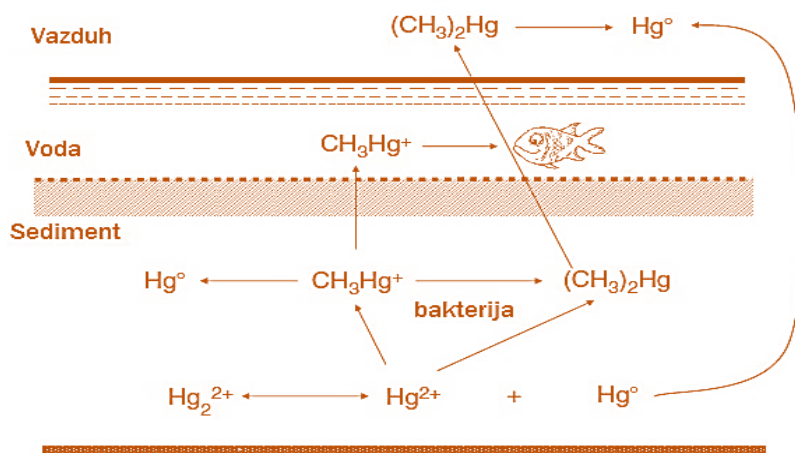
Zdravstveni rizici

Dokazano je da živa uzrokuje promjene u središnjem nervnom sistemu, što može dovesti do razdražljivosti, umora, promjena u ponašanju, drhtavice, glavobolja, halucinacije i smrti. Zbog direktne interakcije žive s DNK, u subtoksičnim dozama, može doći do hromosomskih oštećenja kod ljudi.

Metil-živa ima štetno djelovanje na kardiovaskularni sistem, a ujedno je i neurotoksična, kako za odrasle osobe, tako i za djecu. (razvojna neurotoksičnost). Neorganska živa pretežno ima toksično djelovanje na bubrege, ali može toksično djelovati i na druge organe i sisteme, poput jetre, nervnog, imunološkog i reproduktivnog sistema. S obzirom na to da živa prelazi kroz placentu, do fetusa, ovakva vrsta trovanje je posebna štetna za razvoj nervnog sistema male djece, te može utjecati na razvoj ploda uzrokujući paralizu i mentalnu zaostalost.

Transfer žive u lanac ishrane

Mikroorganizmi imaju sposobnost pretvaranja neorganskih oblika žive, prisutnih u vodi i zemljištu, u organski toksični oblik metil-žive (Slika 4). Koncentracija metil-žive ovisi o koncentracije žive u vodi, pH vode i temperature, koncentracije otopljenih čvrstih i organskih materija u vodi, prisustvu sumpora i drugih hemijskih supstanci u vodi, pa je bioakumulaciju metil-žive teško predvidjeti. Živa iz vode, sedimenta i drugih biota ulazi u hranidbeni lanac (Slika 4), u kojem se bioakumulira, dostižući najviše nivoe u predatorskim vrstama na vrhu hranidbenog lanca.



Slika 4. Ulazak metil žive u hranidbeni lanac

Čestom konzumacijom velikih riba koje dugo žive i pri vrhu su prehranbenog lanca (morski pas, tuna, sabljarka,) čovjek može višestruko povećati unos žive u organizam.

Pristupačnost žive u zemljištu za biljke je obično niska. Smatra se da korijen predstavlja prepreku većem nakupljanju žive u izdanku. U biljkama i gljivama živa je prvenstveno zastupljena u neorganskom obliku, a najviše je zastupljena u žitaricama, voću i povrću, bezalkoholnim pićima, te mliječnim

proizvodima. Kod žita, koncentracija Hg je 3 do 10 puta niža u zrnu, nego u slami. Biljke koje imaju najveću akumulacionu sposobnost Hg su kopriva, bokvica, maslačak.

Pravilnik o maksimalno dozvoljenim količinama za određene kontaminante u hrani (Sl. glasnik BiH, broj 68/2014 i 79/16) navodi MDK žive za hranu koja se može stavljati na tržište BiH (Tabela 14).

Tabela 14. MDK žive (Hg) za neke vrste hrane u Bosni i Hercegovini

Hrana	MDK (mg/kg)
Mišićno meso slijedećih vrsta ribe	1,0
• morski đavo (<i>Lophius species</i>) • atlantski som (<i>Anarhichas lupus</i>) • bonito (<i>Sarda sarda</i>) • jegulja (<i>Anguilla species</i>) • carska riba, ružičasta vojna riba (<i>Hoplostethus species</i>) • grenadir (<i>Coryphaenoides rupestris</i>) • plovac (<i>Hippoglossus hippoglossus</i>) • marlin (<i>Makaira species</i>) • megrim (<i>Lepidorhombus species</i>) • cipol (<i>Mullus species</i>) • štika (<i>Esox lucius</i>) • obični bonito (<i>Orcynopsis unicolor</i>) • bakalar (<i>Tricopterus minutes</i>) • portugalska riba pas (<i>Centroscymnus coelolepis</i>) • raža (<i>Raja species</i>) • crvena riba (<i>Sebastes marinus</i>, <i>S. mentella</i>, <i>S. viviparus</i>) • riba jedro (<i>Istiophorus platypterus</i>) • riba korica (<i>Lepidopus caudatus</i>, <i>Aphanopus carbo</i>) • arbun, pandora (<i>Pagellus species</i>) • morski pas (sve vrste) • zmijska skuša (<i>Lepidocybium flavobrunneum</i>) • Ruvettus pretiosus (<i>Gempylus serpens</i>) • kečiga (<i>Acipenser species</i>) • sabljarka (<i>Xiphias gladius</i>) • tuna (<i>Thunnus species</i>, <i>Euthynnus species</i>, <i>Katsuwonus pelamis</i>) • kingklip riba (<i>Genypterus capensis</i>) • ružičasta jegulja (<i>Genypterus blacodes</i>)	
Dodaci ishrani	0,10

Obzirom da su živa i metil-živa topive u mastima, najviše su zastupljeni u utrobi, mada ih ima i u mišićnom tkivu riba. Prosječne količine Hg u ribljim paštetama predstavljene su u Tabeli 15.

Tabela 15. Prosječan sadržaj žive u ribljim paštetama (Nurić, 2016)

Pašteta	Hg (mg/kg)
Adria Mare „Srdela pašteta“	0,0042
Eva „Classic tuna“	0,0012
MDK „Riblja pašteta“	0,0075
Mercator „Tuna pašteta“	0,0075
Delamaris „Turistička pašteta“	0,0054
Neoplanta „Petelina“	0,0102
Argeta „Sardina Adriatica“	0,0064
Argeta „Losos“	0,0185
Carnex „Slatkovodna riba“	0,0055
Carnex „Tuna“	0,0021

Arsen (As)

Arsen je metaloid koji je najrasprostranjeniji u litosferi, a nalazi se i u vodama, atmosferi i u organizmima. Važniji izvori arsena u okolišu su vulkanske aktivnosti, otapanje minerala u podzemnim vodama, izgaranje

fosilnih goriva, rudarenje, upotreba u drvnoj i tekstilnoj industriji, a u prošlosti i upotreba u proizvodnji zaštitnih sredstava u poljoprivredi.

U većini slatkovodnih voda, jezera i rijeka koncentracije arsena uglavnom se kreću ispod 10 µg/L, dok se u blizini antropogenih izvora nalazi i u koncentraciji od 5 mg/L, koliko ga se u prosjeku nalazi i u zemljištu.

U okolišu se nalazi u četiri oksidacijska stanja: arsin (-3), arsen (0), arsenit (+3) i arsenat (+5). Također, javlja se u različitim neorganskim i organskim oblicima, od kojih su neorganski (arsenit, arsenat) više toksični u odnosu na organske (arsenobetain, arsenošćeceri, arsenolipidi) koji se javljaju u hrani.

Zdravstveni rizici

Toksičnost neorganskog As uključuje promjene na koži (hiperkeratoze, pa i rak kože), neurotoksičnost i kancerogenost, a postoje indicije da bi mogao djelovati i kao reproduktivni i razvojni toksin, te izazivati dijabetes.

Smatra se da trovalentni oblici arsena reagiraju sa -SH skupinama u vitalnim ćelijskim enzimima, pri čemu dolazi do koćenja reakcija u Krebsovom ciklusu, i sprječavanja razgradnje ugljikohidrata, masti i bjelančevina. To ima utjecaja na oksidaciju stanica i paralitičko djelovanje arsena na glatku muskulaturu krvnih žila, po čemu se arsen svrstava u vaskularne otrove. Kardiovaskularna toksičnost arsena se povezuje s hipertenzijom i tzv. bolešću crnih stopala (eng. *blackfoot disease*; javlja se uglavnom na Tajvanu, te se smatra da dodatni lokalni faktori sudjeluju u etiologiji) zbog poremećaja periferne cirkulacije, kao i s aterosklerozom, srčanim, moždanim udarom i drugo.

Transfer arsena (As) u lanac ishrane

Hemizam arsena je u mnogim aspektima sličan hemizmu azota i fosfora. Ta hemijska sličnost može biti razlog pojavljivanja arsena u visokim količinama u mnogim morskim organizmima, odnosno hrani koja potiče iz mora. Primjerice, neorganski ioni arsenata javljaju se u morskoj vodi, zajedno sa

strukturno sličnim fosfatima. Morske ih alge nisu u stanju razlikovati, te se u njihovim nastojanjima da unesu esencijalne fosfate događa da nehotice uzimaju i potencijalno toksične arsenate. U prehrambenom lancu vodenih ekosistema bioakumulacije se ne pojavljuje u većoj mjeri, dok se biokoncentracije arsena javlja prvenstveno kod algi i nižih vodenih beskralježnjaka.

Za biljke arsen je ne-esencijalni obično toksični element. Arsen, prisutan u zemljištu, ima sposobnost ulaska u biljku, putem korijenja, kao i mogućnost transformacije iz manje toksičnog oblika arsenata (AsV) u toksičniji arsenit (AsIII) utječući na promjenu metabolizma biljke, što se može odraziti na sam rast biljke (usporavanje) i akumulaciju biomase, kao i na reproduktivni sistem biljke stvarajući gubitke u prinosu. Riža je poznata kao namirnica s većim količinama neorganskog arsena i smatra se uz vodu za piće i morske plodove glavnim kontaminantom arsena za čovjeka.

Dostupni podaci o udjelu ukupnog arsena u hrani pokazuju kako riba, rakovi, školjkaši i glavonošci imaju najviše koncentracije arsena, u kojima se više od 90% arsena nalazi u obliku relativno netoksičnog organskog spoja arsenobetaina. Prosječna koncentracija ukupnog arsena u mješovitom uzorku morskih i slatkovodnih riba i druge hrane porijeklom iz mora prikazana je u Tabeli 16. Maksimalno dozvoljene količine arsena za neku vrstu hrane u BiH prikazane su u Tabeli 17.

Tabela 16. Koncentracija As (mg/kg mokre težine) u jestivim dijelovima nekih akvatičnih organizama (HAH⁴, 2014)

Vrsta	n	As	$\bar{X}$
Slatkovodna riba	39	0,074	(0,051-0,279)
Morska riba	94	0,158	(0,041-4,789)
Rakovi i školjkaši	8	0,053	(0,028-0,499)
Glavonošci	20	3,51	(0,278-54,38)

⁴HAH – Hrvatska agencija za hranu

Tabela 17. MDK arsena (As) za neke vrste hrane u Bosni i Hercegovini

Hrana	MDK (mg/kg)
Čaj (<i>Tea sinensis</i>) i domaći čaj	1,0
Svježe i prerađene gljive (samonikle i uzgojene)	0,3
Suhe samonikle i uzgojene gljive	1,0
Kafa i prerađevine od kafe	1,0
Ulja i masti, biljnog i životinjskog porijekla, margarini margarinski namazi	0,1
<i>As (neorganski)</i>	
Nepretkuhana valjana riža (polirana ili bijela)	0,20
Pretkuhana i ljuštena riža	0,25
Rižini vafli, rižine oblatne, rižini krekeri i rižini kolačići	0,30

Preventivne mjere za smanjenje sadržaja teških metala

Primjena preparata sa povećanom koncentracijom kalcijuma i magnezijuma, uz višefazno oranje, dovodi do smanjenja nivoa teških metala u oraničnim slojevima zemljišta. Pravilan izbor kultivisanih predusjeva sa izraženom adsorpcijom teških metala može biti veoma djelotvoran za smanjenje kritičnih granica teških metala. Također, da se smanji usvajanje teških metala, kod biljaka, omogućeno je povećanim rastom korijena u dubinu, do slojeva u kojima teški metali nisu prisutni u

većim koncentracijama. Teški metali su manje topivi u alkalnim zemljištima, a održavanje visoke vrijednosti pH je jedan od načina za redukciju vjerovatne kontaminacije biljaka teškim metalima.

Dugoročna strategija ekološkog menadžmenta se fokusira na smanjenje inputa u zemljište. Određivanjem optimalnih doza apliciranih đubriva, neutralisanje industrijskog otpada i korištenje kombinovanih sistema proizvodnje predstavlja siguran način minimiziranja štetnih utjecaja teških metala, na ekološke komponente poljoprivrede. Praksa održivog upravljanja saldom teških metala u agroekosistemu predstavlja dinamički model koji podrazumijeva sljedeće faktore:

- upotrebu dobre proizvođačke prakse (DPP);
- adekvatan ekološki monitoring;
- procjenu izvjesnosti toksičnog dejstva na zemljište, usjeve i podzemne vode;
- korištenje integrisanog sistema održivosti;
- korištenje mješovitih sistema proizvodnje, u skladu sa potencijalom regiona;
- poštovanje zakonskih normi kako međunarodnih, tako i nacionalnih;
- hemijska analiza zemljišta, podzemnih voda i usjeva na prisustvo teških metala svakih šest mjeseci. Ako se pojave kvalitativne promjene u otpadnim vodama učestalost analiza se mora povećati;
- donošenje i poštovanje zakonitosti koji zabranjuju ili ograničavaju primjenu teških metala u agroindustrijskoj proizvodnji;
- upotreba ekonomskih instrumenata u cilju minimiziranja količine hazardnih materija (više tarife, porezi, subvencije i poreske olakšice i dr.).

Analitičke tehnike određivanja toksičnih metala u hrani

Analiza hrane na prisustvo metala je otežana zbog komplikovane prirode matriksa. Mineralne komponente u ispitivanom kompleksu se nalaze u vrlo niskim koncentracijama koje pored toga sadrže i organske komponente.

Pored toga, biološki uzorci su pretežno nehomogeni i zahtijevaju dodatne korake u pripremi. Još jedna otežavajuća okolnost jeste mogućnost naknadne kontaminacije. Također, treba voditi računa o čistoći reagenasa i vode koja se koristi u samom tretmanu i analizi kao i čistoći opreme i pribora koja se koristi u ispitivanju.

Najčešće korištene metode su: Plamena atomska apsorpciona spektroskopija (FAAS), Elektrotermalna atomizacija - atomska apsorpciona spektrometrija (ETA-AAS), Hidridna tehnika- atomska apsorpciona spektrometrija (HG-AAS), Tehnika hladnih para- atomska apsorpciona spektrometrija (CV-AAS), Indukovano kuplovana plazma - atomska emisiona spektrometrija (ICP-AES), Indukovano kuplovana plazma - masena spektrometrija (ICP-AES), Indukovano kuplovana plazma - masena spektrometrija (ICP-MS), Jon selektivne elektrode (ISE), Anodna strippingvoltometrija (ASV), Neutronska aktivaciona analiza (NAA).

2. 5. RADIOAKTIVNI ELEMENTI

Riječ je zapravo o radioaktivnim izotopima elemenata ili radionuklidima koji su sposobni emitirati radioaktivno(ionizirajuće) zračenje prilikom prelaza u stabilni oblik atomske jezgre. Među najvažnijim radionuklidima koji se mogu naći u hrani i vodi su ^3H , ^{14}C , ^{131}I , ^{134}Cs , ^{137}Cs , ^{40}K , ^{89}Sr , ^{90}Sr , ^{222}Rn , ^{226}Ra , ^{228}Ra , ^{228}Th , ^{235}U , ^{239}Pu , itd.

Rasprostranjenost u okolišu

Prema nastanku, prirodni radionuklidi se dijele na radionuklide oduvijek prisutne na Zemlji (npr. ^{235}U , ^{238}U , ^{40}K) kojima je svojstveno dugo vrijeme poluraspada⁵ (Tabela 18) i na produkte njihova raspada (npr. ^{222}Rn najčešći

⁵vrijeme poluraspada - definiše se kao vrijeme potrebno da se razgradi 50 % početne količine

radionuklid u atmosferi), te na radionuklide nastale djelovanjem kosmičkoga zračenja (npr. ^{14}C , ^3H , ^7Be). Osim uobičajenog prisustva u okolišnom zemljištu, zraku i vodi, pojačana izloženost može biti uzrokovana antropogenim izvorima poput rudnika (uranija), naučnih i medicinskih ustanova, nuklearnih centrala, havarija nuklearnih centrala i eksplozija nuklearnog oružja.

Tabela 18. Neki radionuklidi i njihova vremena poluraspada

Radionuklid (element)	Vrijeme poluraspada	Radionuklid (element)	Vrijeme poluraspada	Radionuklid (element)	Vrijeme poluraspada
^3H (vodik)	12,33 god.	^{43}Sc (skandij)	3,89 h	^{222}Rn (radon)	3,82 dana
^7Be (berilij)	53,12 dana	^{60}Co (kobalt)	5,28 god.	^{226}Ra (radij)	1600 god.
^{14}C (ugljik)	5730 god.	^{90}Sr (stroncij)	28,79 god.	^{234}Th (torij)	24,10 dana
^{18}F (flor)	109,77 min	$^{99\text{m}}\text{Tc}$ (tehnecij)	6,01 h	^{235}U (uranij)	$7,04 \cdot 10^8$ god.
^{32}P (fosfor)	14,26 dana	^{131}I (jod)	8,04 dana	^{238}U (uranij)	$4,47 \cdot 10^9$ god.
^{40}K (kalij)	$1,28 \cdot 10^9$ god.	^{201}Tl (talij)	72,91 h	^{239}Pu (plutonij)	24 110 god.

Radionuklidi imaju veliku upotrebnu vrijednost. Primjenjuju se u određivanju starosti geoloških formacija, arheoloških nalaza i sl., u tehnici kao radioindikatori i izvori zračenja, npr. u radiografiji kao nedestruktivnoj metodi ispitivanja materijala. U medicinskoj dijagnostici i liječenju primjenjuje se 10-ak radionuklida, u elementarnom obliku ili u obliku farmakoloških pripravaka (radiofarmaci).

Ovisno o meteorološkim uslovima, radioaktivne čestice mogu dospjeti vrlo daleko od mjesta eksplozije u obliku tzv. fallouta⁶ ili radioaktivne prašine.

⁶fallout – radiaktivni materijal/prašina u atmosferi

Zdravstveni rizici

Utjecaj na zdravlje koji je posljedica izloženosti ionizirajućem zračenju ovisi o vrsti zračenja, dozi i brzini doze.

Nema dokaza štetnosti uobičajenih nivoa radioaktivnosti prirodnog porijekla. S druge strane, hronična izloženost višim dozama radionuklida, uslijed emisije radioaktivnog zračenja, dovodi do opsežne produkcije slobodnih radikala i oksidativnog stresa, uz mogućnost kancerogenog, mutagenog i teratogenog efekta. Lokacija spomenutih efekata ovisi o samom elementu tj. mjestu njegova nakupljanja u organizmu.

Razmatranje potencijalne opasnosti od radioaktivnih elemenata mora uzeti u obzir stopu apsorpcije u probavnom traktu, raspodjelu u organizmu, vrijeme poluraspada ($t_{1/2}$, vrijeme potrebno da se početna količina radioaktivnog izotopa smanji za polovicu), biološko vrijeme poluživota (t_{biol} , vrijeme za koje organizam izluči polovicu prisutnog radionuklida) te vrsta radijacije koju emitiraju.

Posljednjih godina zabilježena su zapažanja, kako u studijama na životinjama tako i iz populacijskih studija, da zračenje može dovesti i do drugih zdravstvenih efekata, kao što je koronarna bolest srca, i neurološke bolesti. Međutim, rizik od ovih bolesti je manji od rizika od raka, a povećani rizik od raka i dalje se smatra dominantnim učinkom pri niskim dozama. Međunarodna agencija za istraživanje raka je na temelju studija na životinjama i epidemioloških istraživanja kategorizirala sve vrste ionizirajućeg zračenja kao kancerogene za ljude.

Transfer radioaktivnih elemenata u lanac ishrane

Kontaminacija biljaka radioaktivnim elementima može biti:

- direktna, za vrijeme perioda rasta, deponiranjem radionuklida na dijelovima biljke iznad zemljišta i
- indirektna – apsorpcijom radionuklida iz zemljišta preko korijena.

Relativna proporcija ovih dviju kontaminacija ovisi o karakteristikama zemljišta, biljke i faktora okoline.

Pod direktnom kontaminacijom biljaka podrazumijeva se kontaminacija biljnih kultura fisionim materijalom, koji pada po površini nadzemnih dijelova biljke. Ovaj izvor kontaminacije je mnogo opasniji od kontaminacije preko zemljišta, jer prolaskom fisionih produkata kroz zemljište dolazi do njihova razrjeđenja sa materijalom zemljišta, zatim do jačeg ili slabijeg fiksiranja u zemljištu, i ispiranja s kišom u dublje slojeve, van domena korijena većine biljaka koje se koriste za ljudsku i stočnu hranu. Stepenn direktna kontaminacija u prvom redu ovisi o količini radioaktivnih padavina u periodu vegetacije, stadija razvoja biljke i morfoloških karakteristika biljke.

Direktna kontaminacija može se svrstati u dvije kategorije:

- 1) *Površinska kontaminacija* je tip kontaminacije radioaktivnim česticama koje se natalože na površini biljke, i
- 2) *Direktna unutrašnja kontaminacija*– uzimanje radionuklida kroz lišće, stabljiku, cvijet, i druge nadzemne organe biljke, i njihovo dalje gibanje kroz biljku. Direktna unutrašnja kontaminacija ovisi od transportne mogućnosti radionuklida kroz biljku. Poznato je da se kalcij prenosi samo transpiratornim putem, i da vrlo sporo putuje u druge dijelove biljke (uglavnom se zadržava u lišću). Na osnovu te činjenice može se zaključiti da će i Sr-90 ići istim putem.

Plodovi kukuruza i graha zaštićeni su prirodnim omotačem od direktna kontaminacije. Gomolji krompira razvijaju se u zemlji, pa je i tu onemogućena površinska kontaminacija.

Indirektna kontaminacija biljaka, tj. kontaminacija preko korijena, ovisi o više faktora:

1. Od mogućnosti biljke da koristi radionuklide koji su dospjeli u zemljište. Ta mogućnost ovisi o načinu fiksiranja radionuklida u materijalu zemljišta i o njihovoj topljivosti, pri uslovima koji vladaju u zemljištu. Kiselija zemljišta imaju mnogo veću sposobnost otapanja radionuklida,

od neutralnih i bazičnih, pa je i apsorpcija radionuklida iz kiselijih zemljišta veća.

Važan faktor kod indirektna kontaminacije je *kapacitet korijena za pojedine elemente*. Poznato je da korijen biljke ima veliki kapacitet za kalcij i kalij, a s obzirom na to da je Sr^{90} hemijski veoma sličan kalciju, a Cs-137 kaliju, pretpostavlja se da je i kapacitet korijena za ove radionuklide velik.

2. Sposobnost transporta pojedinih elemenata od korijena do drugih dijelova biljke, također, je važan faktor kod indirektna kontaminacije. Ta sposobnost je za stroncij i cezij velika, opet iz razloga što je sposobnost biljke da transportira kalcij i kalij velika. Karakteristika stroncija i kalcija, s obzirom na njihovo ponašanje u zemljištu, njihovo preuzimanje i transport, tako su slične, te se sa sigurnošću može pretpostaviti da neće doći do diskriminacije jednog prema drugom, ni u zemljištu, ni u bilo kojem drugom dijelu biljke. Prema tome, biljka će uzimati stroncij i kalcij, iz zemljišta, približno u onom odnosu u kojem se oni nalaze u topljivom, odnosno reaktivnom obliku u zemljištu.

Veoma je važno istaknuti da, prelazom radioaktivnih elementa iz zemljišta u biljke njihova koncentracija se smanjuje stotinjak puta. Druga zaštitna barijera je prelaz iz biljaka u životinjska tkiva, pri čemu također dolazi do redukcije nivoa za 10 do 1000 puta. Ipak, ribe i školjkaši koncentriraju radionuklide od 10 do 10000 puta u odnosu na okoliš. Mlijeko, u situacijama povećane prisutnosti radionuklida u okolišu, npr. poslije nuklearne nezgode (Černobil, Fukushima), sadrži više koncentracije ^{131}I .

Tabela 19. Prisustvo radionuklida u vodi za piće, izračunato na osnovu sastava kamenca (Rajković i sar., 2008)

Radionuklid	Udio u kamencu	Izračunata masena koncentracija u vodi za piće
Stroncijum	0,05%	0,15 mg/dm ³
Uran	1,38 ppm	0,41 µg/dm ³

Ozračivanje populacije radionuklidima iz vode za piće (Tabela 19) uglavnom je malo, i nastaje kao posljedica raspada prirodnih radionuklida uranovog i torijumovog niza.

Preventivne mjere za smanjenje količine radioaktivnih elemenata

Kod akutne izloženosti radioaktivnom jodu (havarije nuklearnih centrala, eksplozije nuklearnog oružja), preporučuje se tretman kalij jodidom ili sličnim solima, koje će umanjiti nakupljanje ^{131}I u štitnjači. Obratno, ukoliko se želi sniziti količina radioaktivnog joda u mlijeku, u sličnim izvanrednim situacijama, nužno je smanjiti unos stabilnog joda, kod mliječnih životinja, jer će se više radioizotopa zadržati u štitnjači, i do 60% manje izlučiti u mlijeko. Općeniti nutricionistički pristup smanjenja štete je, kao što je gore navedeno, najučinkovitiji već u fazi apsorpcije radionuklida, koja značajno opada kod adekvatnog unosa mineralnih materija. Shodno načinu djelovanja radioaktivnih materija, pojačan unos antioksidanasa i aminokiselina sa sumporom (zbog poticanja sinteze najvažnijeg endogenog antioksidansa–glutaciona) bi mogao ublažiti posljedice izlaganja.

Kao učinkovita mjera za reduciranje količine radionuklida u mesu je dodavanje aditiva krmivima (ferocijanidi, zeoliti, mineralne soli). Različite vrste adsorbenata se mnogu dodavati zemljištima, u cilju smanjenja prelaza radioizotopa u ratarske kulture, kao i antagonisti radiostroncija (gašeni kreč i umjetna gnojiva na bazi kalcija) ili radiocezija (umjetna gnojiva obogaćena kalijem). Postupci (bio)remedijacije zemljišta koji najviše obećavaju uključuju specijalne načine obrade zemljišta, uzgoj biljnih vrsta koje izvlače radionuklide iz zemljišta ili tretman zemljišta odabranim fungalnim mikroorganizmima koji mogu imobilizirati radionuklide. Posebnim šumarskim zahvatima se može spriječiti redistribucija radionuklida u okolišu koji će, npr., u područjima kontaminiranim černobilskom havarijom biti opasno radioaktivan sljedećih tri vijeka. Iskušavane su i metode sprječavanja akumulacije radionuklida u ribi dodatkom kreča ili kalija jezerskoj vodi. Voda za piće se u izvanrednim

situacijama može dodatno pročistiti adsorbensima poput zeolita i aktivnog ugljena.

Preradom krompira u škrob, ugljikohidratnih sirovina u šećere, ili mlijeka u vrhnje i maslac, može se ukloniti najveći dio prisutnih (vodotopljivih) radioizotopa.

Drugi načini prerade hrane su se pokazali učinkovitim: pranje, prešanje, guljenje, uklanjanje nejestivih dijelova voća i povrća, tretman tekućih namirnica adsorbensima, ili termičko tretiranje, tokom kojeg dolazi do isparavanja isparljivih radionuklida, i/ili gubitka u vodi za kuhanje, usoljavanje (uklanjanje radiocezija), ili otkoštavanje (uklanjanje radiostroncija) ribe i mesa, i dr.

Analitičke tehnike za određivanje radioaktivnih elemenata u hrani

Ima više metoda za određivanje radioaktivnih elemenata u hrani: atomska apsorpciona spektrometrija (eng. *Graphitefurnace AA spectrometry*, AAS), emisiona indukovana plazma spektrometrija (ICPS), X-ray fluorimetrija (XRF), neutronska aktivaciona analiza (NNA), masena spektrometrija (MS). Sve ove metode mogu se automatizovati, specifične su i veoma osjetljive. Za rutinske analize preporučuje se AAS ili XRF, a kao metoda za kontrolu kvaliteta NNA na svakih 10-1000 uzoraka. Laser indukovana fluorescentna spektrometrija je usavršena varijacija fluorimetrijske metode.

2. 6. LITERATURA

1. Alina, M., Azrina, A., Mohd Yunus, AS., Mohd Zakiuddin, S., Mohd Izuan Effendi, H., Muhammad Rizal, R. (2012). Heavy metals (mercury, arsenic, cadmium, plumbum) in selected marine fish and shell fish along the Straits of Malacca. *Int. Food Res. J.* 19(1): 135–140.
2. Aylward L.L., Brunet, R.C., Carrier, G. , Hays, S.M., Cushing, C.A., Needham, L.L., Petterson, D.G., Gerthoux, P.M., Brambilla, O., Mocarelli, P. (2005): Concentration-dependent TCDD elimination kinetics in humans: toxicokinetic modeling for moderately to highly exposed adults from Seveso, Italy and Vienna, Austria, and impact on dose estimates for the NIOSH cohort. *J. Expo Anal. Environ. Epidemiol.*, 15, pp: 51-65.
3. Babut, M., Mathieu, A., Pradelle, S., Marchand, P., Le Bizec, B., Perceval, O. (2012): Nationwide PCB congener pattern analysis in freshwater fish samples in France. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, 407, Article Number: 07, DOI: 10.1051/kmae/2013033.
4. Baldassari, L. T., Abate, V., Alivernini, S., Battistelli, C. L., Carasi, S., Casella, M., Jacovella, N., Iamiceli, A. L., Indelicato, A., Scarcella, C., La Rocca, C., (2007): A study on PCB, PCDD/PCDF industrial contamination in a mixed urban-agricultural area significantly affecting the food chain and the human exposure. *Part I: Soil and feed. Chemosphere*, 67, pp 1822–1830.
5. Bandić, E., (2018): Određivanje sadržaja teških metala u sterilisanom mlijeku. *Završni-Master rad*. Poljoprivredno-prehrambeni fakultet Univerziteta u Sarajevu. Sarajevo.
6. Cole, D. W., Cole, R., Gaydos, S. I., Gray, I., Hyland, G., Jacques, M. L., Powell-Dunford, N., Sawhney, C., Au, W.W. (2009): Aquaculture: Environmental, toxicological, and health issues. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 212, pp: 369–377.
7. Cvetković, O. (2007): Inventar PCB-a. *Ministarstvo životne sredine i prostornog planiranja Republike Srbije*.
8. Đinović-Stojanović, I., Spasić, I., Popović, A., Vranić, D., Nikičević, M., Hegediš, A., Nikolić, D. (2013): Distribucija organohlornih pesticida i

- polihlorovanih bifenila u dve vrste riba iz Dunava. *Meat Technology/Tehnologija mesa*, Vol. 54 No 1, pp: 69-78.
9. EFSA, European Food Safety Agency (2012): Guidance on selected default values to be used by the EFSA Scientific Committee, Scientific Panels and Units in the absence of actual measured data. *EFSA Journal*, 10, No 3, pp:2579.
 10. EFSA, European Food Safety Agency (2012a): Scientific Opinion on the risk for public health related to the presence of mercury and methylmercury in food. *EFSA Journal*, 10, No 12, pp: 2985.
 11. EFSA, European Food Safety Agency (2012b): Lead dietary exposure in the European population. *EFSA Journal*, 10, No 7, pp:2831.
 12. EFSA, European Food Safety Agency (2012c): Cadmium dietary exposure in the European population. *EFSA Journal*, 10, No 1, pp:2551.
 13. EFSA, European Food Safety Agency (2014): Dietary exposure to inorganic arsenic in the European population. *EFSA Journal*, 12, No 3, pp:3597.
 14. Fiedler, H. (2003): in the *Handbook of Environmental Chemistry, Persistent Organic Pollutants*, Vol. 3., Part O, H. Fiedler Ed., Springer, Berlin-Heidelberg, pp:123.
 15. Francesconi, K. (2010): Arsenic species in seafood: Origin and human health implications. *Pur. Applied Chemistry*, 82, pp: 373-381.
 16. Grassi, P., Fattore, E., Generoso, C., Fanelli, R., Arvati, M. and Zuccato, E. (2010): Polychlorobiphenyls (PCBs), polychlorinated dibenzodioxins (PCDDs) and dibenzofurans (PCDFs) in fruit and vegetables from an industrial area in northern Italy. *Chemosphere* 79, pp: 292–298.
 17. Hanurur, R., Zeenath, F., Alamgir, Z. C., Khorshed, A., Latiful, B., Mohammed, M., Siew, H. G. (2016): Determination of heavy metals in the soil of tea plantations and in fresh and processed tea leaves: an evaluation of six digestion methods. *Chemistry Central Journal*. 10: pp:7.
 18. (HAH) Hrvatska agencija za sigurnost hrane (2014): Znanstveno mišljenje o prisutnosti žive, olova, kadmija i arsena u akvatičnim organizmima na tržištu Republike Hrvatske, pp: 15-23.

19. Hoogenboom, R., Traag, W., Fernandes, A. and Rose, M. (2015): European developments following incidents with dioxins and PCBs in the food and feed chain. *Food Control* 50, pp: 670-683.
20. Jureša, D., Blanuša, M. (2003): Mercury, arsenic, lead and cadmium in fish and shellfish from the Adriatic sea. *Food Additives and Contaminants*, 20, pp:241-6.
21. Karalić, A. (2017): Sadržaj arsena, kadmija i olova u salati i koprivi na području općine Zenica. *Završni - Master rad. Poljoprivredno-prehrambeni fakultet Univerziteta u Sarajevu.*
22. Kawashima, A., Watanabe, S., Iwakiri, R., Honda, K. (2009): Removal of dioxins and dioxin-like PCBs from fish oil by counter current supercritical CO₂ extraction and activated carbon treatment. *Chemosphere*, Volume 75, Issue 6, pp: 788–794.
23. Keil, DE., Berger-Ritchie, I., McMillin, GA. (2011): Testing for Toxic Elements: A Focus on Arsenic, Cadmium, Lead, and Mercury. *Labmedicine*. Volume 42, No 12.
24. Kovačević, S. (2016): Sadržaji olova, bakra, mangana i cinka u bijelim i crvenim kosovskim vinima. *Master rad, Poljoprivredno-prehrambeni fakultet Univerzita u Sarajevu*, pp:48.
25. Krželj, M., Kuzmanić-Šamija, R., Lakoš, V., Šimat, V., Krželj, V. (2011): Problem unosa žive u organizam prehranom namirnicama iz mora, Nasljedne metaboličke bolesti, Djeca, metali i nove bolesti, *Medicinska naklada*, pp:92-101.
26. Knežević, Z., Sedak, M., Đokić, M., Vratarić, D. (2011): Dioksini u hranidbenom lancu. *Vo XIII*, (5-6) No 3.
27. Leong, Y.H., Maiid, M.I.A. (2017): Dioxins and dioxin-like polychlorinated biphenyls in seafood: dietary exposure amongst Malaysian adult populations and its association with sociodemographic factors. *International Food Research Journal* 24(2), pp: 755-769.
28. Lončarić, Z., Kadar, I., Jurković, Z., Kovačević, V., Popović, B., Karalić, K. (2011): Teški metali od polja do stola. *Proceedings 47th Croatian and 7th International Symposium on Agriculture . Opatija . Hrvatska (14–23).*

29. Marinković N., D. Pašalić, G. Ferenčak, B. Gršković, A. Stavljenić-Rukavina (2010): Dioxins and human toxicity. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 16, pp:445-45.
30. Martorell, I., Perell, G., Marti-Cid, R., Llobet, IM., Castell, V., Domingo, IL. (2011): Human exposure to arsenic, cadmium, mercury and lead from foods in Catalonia, Spain: temporal trend. *Biological Trace Element Research*, 14, pp:309-322.
31. Mazej, Z., Al Sayegh-Petkovšek, S., Pokorny, B. (2010): Heavy metal concentrations in food chain of lake Velenjsko jezero, Slovenia: an artificial lake from mining. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 5, pp:998-1007.
32. Moon, HB., Ok, G. (2006): Dietary intake of PCDDs, PCDFs and dioxin-like PCBs, due to the consumption of various marine organisms from Korea. *Chemosphere* 62, pp:1142–1152.
33. Motariemi, Y., Gerald, G.M., Ewen Todd, CD., (2014): „*Encyclopedia of food safety*“, Academic press, Elsevier, London, UK.
34. Noël, L., Chekri., R., Millour, S., Merlo, M., Leblanc, IL. (2013): Distribution and relationships of As, Cd, Pb and Hg in freshwater fish from five French fishing areas. *Chemosphere*, 90, pp: 1900-1910.
35. Nurić, O. (2017): Određivanje sadržaja teških metala u ribljim paštetama na tržištu BiH. *Završni-Master rad. Poljoprivredno-prehrambeni fakultet Univerziteta u Sarajevu. Sarajevo.*
36. Pacyna, EG., Pacyna, IM., Sundseth, K., Munthe, I., Kindbom, K., Wilson, S., Steenhuisen F, Maxson, P. (2010): Global emission of mercury to the atmosphere from anthropogenic sources in 2005 and projections to 2020. *Atmospheric Environment*, 44, pp 2487–2499.
37. Pinter, N., Cvrtila-Fleck, Ž., Kozačinski, L., Njari, B., Čož Rakovac, R., Topić Popović, N. (2013): Procjena rizika od unosa hranom ostataka teških metala iz konzervi sardina (*Sardina pilchardus* Walbaum, 1792) koji se koristi za potrebe Oružanih snaga Republike Hrvatske. *Meso*, Vol. XV, broj 1.
38. Pirrone, N., Cinnirella, S., Feng, X., Finkelman, RB., Friedli, HR., Leaner, I., Mason, R., Mukherjee, Ab., Stracher, GB., Streets, DG., Telmer, K. (2010): Global mercury emissions to the atmosphere from

- anthropogenic and natural sources. *Atmospheric Chemistry and Physics* 10, pp: 5951–5964.
39. Piskorska-Pliszczyńska, J., Struciński, P., Mikołajczyk, S., Maszewski, S., Rachubik, I., Warenik-Bany, M. (2015): Dioxins, furans, and polychlorinated biphenyls in hen eggs – a new source of hazard for consumers? *Bull. Vet. Inst. Pulawy*. 59, pp: 519-526.
40. Pravilnik o maksimalno dozvoljenim količinama za određene kontaminante u hrani. *Službeni glasnik BiH, broj 68/14 i 79/16*.
41. Rajković, M., Stojanović, M., Lačnjevac, Č., Tošković, D., Stanojević, D. (2008): Određivanje tragova radioaktivnih supstanci u vodi za piće. *Zaštita materijala* 49, No 4, pp: 44-54.
42. Ramalhosa, M. I., Paíga, P., Morais, S., Ramos, S., Delerue-Matos, C., Oliveira, M.B. (2012) “Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Levels in Three Pelagic Fish Species from Atlantic Ocean: Inter-Specific and Inter-Season Comparisons and Assessment of Potential Public Health Risks.” *Food and Chemical Toxicology* 50, pp:162–167.
43. Rice, C.P., O’Keefe, P., Kubiak, T. (2003): Sources, Pathways, and Effects of PCBs, Dioxins, and Dibenzofurans. In: Hoffman, D.I., Rattner, B.A., Burton, Jr., G.A., Cairns Jr., J. (Eds.), *Handbook of Ecotoxicology*. Lewis Publishers, London, New York, pp: 501–573.
44. Rodríguez Acuna, R., A, Pérez-Camino, M., Cert, A., Moreda, W. (2008): Sources of contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons in Spanish virgin olive oils. *Food Additives and Contaminants*, 25(1): 115–122.
45. Storelli, M.M., Normanno, G., Barone, G., Dambrosio, A., Errico, L., Garofalo, R. (2012): Toxic metals (Hg, Cd, and Pb) in fishery products imported into Italy: suitability for human consumption. *Journal of food protection*, 75, pp: 189-194.
46. Shi, I. C., Li, Y., Liang, H., Zheng, G. I., Wu, Y., Lui, W., (2013): OCPs and PCBs in Marine Edible Fish and Human Health Risk Assessment in the Eastern Guangdong, China. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 64, No 4, pp: 632–642.
47. Šarkani B. i sur. (2010): Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani, *Hrvatska agencija za hranu (HAH), Osijek, Hrvatska*, pp: 50-56.
48. Vasić-Rački, Đurđa (2010) u Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani, *Onečišćivači iz okoliša Osijek*, pp: 50-57.

49. Zelinkova, Z. and Wnzi, T. (2015): The occurrence of 16 EPA PAHs in food – A Review. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 35:248–284.

3. REZIDUE PESTICIDA I VETERINARSKIH LIJEKOVA U HRANI

Poznata je činjenica da 35% hrane, proizvedene u svijetu, ne dođe do potrošača, a dodatnih 20 % propadne u procesu skladištenja. Bez primjene kemijskih sredstava za suzbijanje štetnih organizama, odnosno sredstava za zaštitu bilja, gubitci bi bili dvostruko veći. Stoga, trenutno na nivou globalne proizvodnje hrane, upotreba pesticida nema alternative.

Antimikrobni ostaci su neželjene hemikalije koje imaju postojanu sposobnost kroz hranidbenu mrežu i mogući negativni učinci na ljude. Antimikrobni lijekovi široko se koriste za poboljšanje zdravlja, povećanje rasta, učinkovitost hrane i smanjenja učestalosti bolesti. Međutim, zbog toga što se nepropisno primjenjuju, ilegalna i česta upotreba tih lijekova dovela je do nakupljanja opasnih antimikrobnih ostataka u namirnicama jestivog životinjskog porijekla, koje su namijenjene za ljudsku potrošnju, čime se u opasnost dovodi javno zdravlje.

Aktivne materije pesticida i veterinarskih lijekova su hemijski elementi, jedinjenja ili mikroorganizmi, s opštim ili ciljanim djelovanjem protiv štetnih organizama na biljke, dijelove biljaka ili biljne proizvode, kao i na razne vrste bolesti kod životinja.

Nakon primjene pesticida i veterinarskih lijekova, aktivne materije nisu stabilne, već se pod djelovanjem uslova sredine, enzima, svjetlosti, vlažnosti, te hemijskih osobina u određenoj mjeri transformiraju. Za ostatke aktivnih materija, njihovih metabolita, produkata razgradnje, ili produkata reakcije aktivnih materija, uobičajeno se koristi naziv ostatci (rezidue).

Pored svih prednosti koje su ostvarene upotrebom pesticida i veterinarskih lijekova, pojavile su se i štetne posljedice za biljke, čovjeka, životinje i okoliš. Svi ovi problemi ne umanjuju njihov značaj. Oni i dalje predstavljaju realnu osnovu za povećanje proizvodnje hrane, a praćenje njihovih ostataka od izuzetnog je značaja za očuvanje zdravlja ljudi i životinja.

3. 1. REZIDUE PESTICIDA

U slovima savremene proizvodnje više od 30% svjetske proizvodnje hrane iz raznih razloga ne dopire do potrošača. Bez primjene sredstava za zaštitu bilja – *pesticida* mogla bi se izgubiti trećina svjetskih usjeva svake godine.

Pod *pesticidima* se podrazumijevaju hemijska i biološka sredstva koja se upotrebljavaju protiv uzročnika biljnih bolesti, štetnih insekata, nematoda, glodara, ptica, za suzbijanje korova ili za regulisanje rasta biljaka. Koriste se i za uništavanje štetočina i gljivica u uskladištenim namirnicama. Pesticidi služe i za uništavanje insekata i drugih prenosioca uzročnika zaraznih bolesti ljudi i životinja, kao i parazita kod ljudi i životinja.

U upotrebi se danas nalaze tzv. *selektivni* i *neselektivni* pesticidi. *Selektivni pesticidi*, djeluju na točno određenu skupinu štetnika i prema mišljenju mnogih stručnjaka, navodno nisu štetni za drugi biljni i životinjski svijet. Svi pesticidi, posebno neselektivni, djeluju vrlo štetno na ekosisteme. Mnogi ubijaju korisne insekte, ribe, ptice, te tako uzrokuju više štete nego koristi. Pesticidi vrlo nepovoljno djeluju i na korisne tzv. “azotne” bakterije u zemljištu, a posljedica je iscrpljenje zemljišta. Neselektivni pesticidi trebali bi se upotrebljavati samo onda kada ne postoji druga mogućnost odbrane od štetočina, što nažalost često nije slučaj.

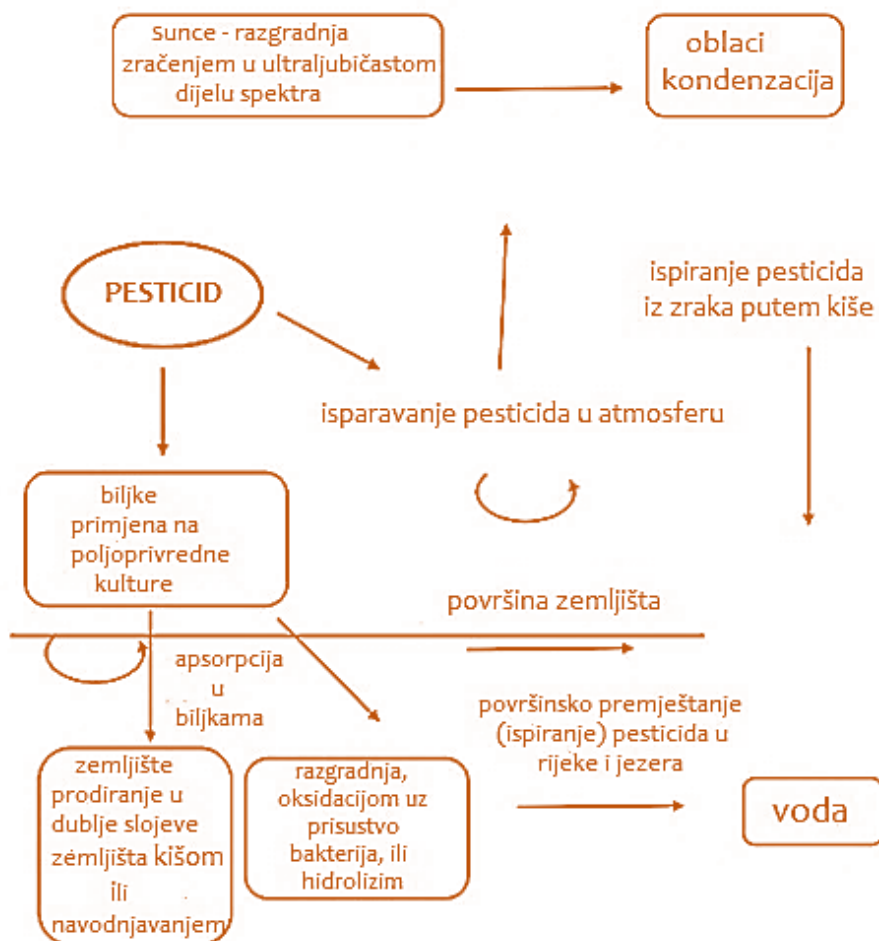
Rasprostranjenost u okolišu

Njihova intenzivna upotreba u poljoprivredi u posljednjih 30 do 40 godina dovela je do pojave i nakupljanja ovih jedinjenja u životnoj sredini prvenstveno u zemljištu, sedimentu, podzemnoj i površinskoj vodi, kao i u organizmima živih bića. Pesticidi mogu, ovisno o vrsti i primijenjenoj dozi, zaostajati u hrani i okolišu čak i po nekoliko mjeseci, što zavisi od njihove perzistencije. *Perzistencija* predstavlja vrijeme zadržavanja nekog pesticida u prirodnoj sredini i ona zavisi od slijedećih faktora:

- hemijskih (osjetljivosti prema hidrolizi, oksidaciji, svjetlosti),

- fizičkih (rastvorljivost u vodi, u lipidima, napon pare) i
- bioloških (površina i priroda biljke).

Od trenutka kad dopiju u okoliš postaju sastavni dio ciklusa prirodne izmjene materija (Slika 5) te se mogu detektirati ne samo u područjima gdje su korišteni već i daleko izvan njih.



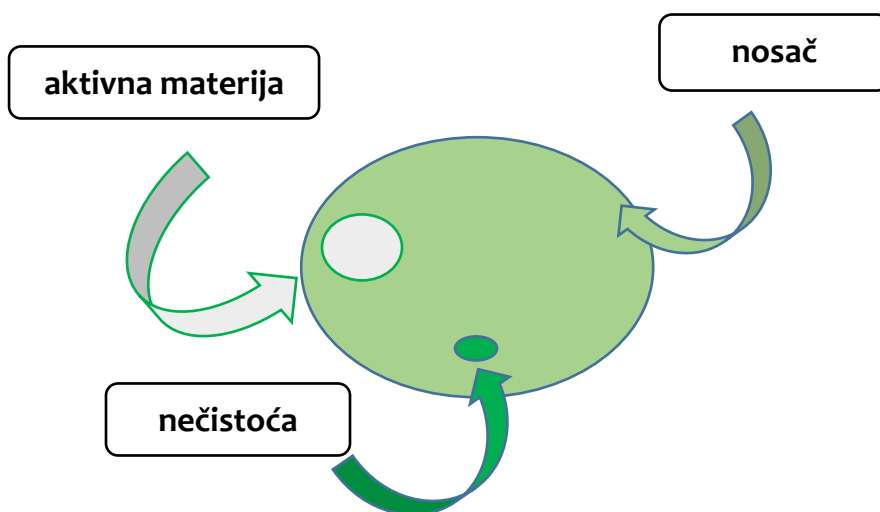
Slika 5. Ciklus pesticida

Raspodjela i interakcija pesticida u okolišu vrlo je složen proces koji ovisi o mnogo faktora kao što su: fizikalno – hemijska svojstva pesticida, kinetika njegove razgradnje te sklonost sorpciji u zemljištu. Sorpcija, desorpcija i biorazgradnja neki su od važnijih procesa koji utječu na zaostajanje i

raspodjelu pesticida u okolišu. Učinkovitost sorpcije ovisi o tipu pesticida, udjelu vlage u zemljištu, te o pH i hemijskom sastavu zemljišta. Biološka aktivnost pesticida ovisi najviše o njihovim fizikalno – hemijskim svojstvima. Ona određuju način djelovanja pesticida, dozu, način primjene te termodinamiku u okolišu.

Fizikalna svojstva pesticida

Fizikalna svojstva pesticida ovise o hemijskoj prirodi pesticida. U sastav pesticida ulaze tri glavne komponente (Slika 6) aktivna materija, nosač i nečistoća.



Slika 6. Komponente pesticida

Aktivna materija je najvažnija u smislu javno-zdravstvene opasnosti od pesticida, i najčešći je uzročnik trovanja. Nosač (pomoćna materija) je bez pesticidnog djelovanja, a također može biti opasan po zdravlje (otrovna organska otapala). Nečistoće, koje zaostaju u preparatu tokom proizvodnje, u nekim slučajevima, mogu predstavljati veliku opasnost za zdravlje.

Najvažnija fizikalna svojstva pesticida koja direktno utječu na ponašanje pesticida u okolišu su: pritisak para, topljivost u vodi, hidrofobnost koja se

izražava koeficijentom razdijeljena u sistemu oktanol – voda, koeficijenti sorpcije u zemljištu i Henrijeva konstanta.

Pesticidi u okolišu podliježu nizu kompleksnih procesa koji se nazivaju kemodinamika pesticida. Kemodinamika pesticida ovisi o fizikalno – kemijskim svojstvima pesticida, te o uslovima okoliša kao što su pH, temperatura, vlažnost, salinitet, topografija, jačina svjetlosti, te mokro i suho taloženje. Najvažniji kemodinamički procesi koji utječu na sudbinu pesticida u okolišu su njihov prenos i zadržavanje, razgradnja u različitim dijelovima okoliša, sorpcija i desorpcija. Razgradnja pesticida je najutjecajnija obzirom da uključuje hemijske transformacije pesticida što mijenja njihova hemijska svojstva. Razgradnjom pesticida nastaju molekule koje nisu nužno jednostavnije strukture ili manje toksične u odnosu na molekulu izvornog pesticida. Vrlo često razgradnjom nastaju novi pesticidi ili još toksičnije materije.

Pesticidi mogu biti organske i neorganske materije, sintetske ili izolirane iz prirodnih izvora(bakterije, gljive, biljke). Razvrstavaju se u različite skupine ovisno o hemijskoj strukturi i fizikalno–hemijskim svojstvima. Općenito, obzirom na hemijsku strukturu pesticidi se razvrstavaju u različite hemijske skupine ovisno o:

- načinu djelovanja (insekticidi, fungicidi, herbicidi...)
- vrsti štetnog organizma kojeg suzbija (akaricidi, botriticidi...)
- hemijskoj strukturi (organohlorini, organofosfori, piretroidi..)

Klasifikacija pesticida prema namjeni

Prema namjeni pesticidi su podijeljeni u nekoliko osnovnih grupa:

- *insekticide* - sredstva koja štite ljude i biljne kulture od insekata,
- *herbicide* - sredstva za suzbijanje korova,
- *fungicide* - sredstva koja se koriste za uništavanje gljivica i plijesni
- *akaracide* - sredstva za suzbijanje grinja,
- *baktericide* - sredstva za suzbijanje bakterija,
- *nematocidi* - sredstva protiv nematoda – valjkastih glista,

- *rodenticidi* - sredstva za uništavanje glodara,
- *limacide* – sredstva za uništavanje puževa,
- *algicide* – sredstva za suzbijanje algi
- *avicide*- sredstva za suzbijanje jaja insekata,
- *biocide* – sredstva za ubijanje živih organizama,
- *repelente* – sredstva za odbijanje divljači,
- *antihelminthici* – sredstva za suzbijanje glista
- *viricide* – sredstva za ubijanje virusa van organizma,
- *defolijante* – sredstva koja izazivaju prijevremeno opadanje lišća,
- *desikante* – sredstva koja izazivaju sušenje biljaka.

Unutar navedenih grupa, insekticidima, herbicidima i fungicidima se daje poseban značaj, zbog njihovog toksičnog djelovanja na ljudsko zdravlje.

Insekticidi

Insekticidi su sredstva hemijskog ili biološkog porijekla koji se koriste za suzbijanje ili sprečavanje djelovanja insekata. Njihova namjena u poljoprivredi se odnosi na primjenu preko zemljišta, za zimsko tretiranje voćaka i vinove loze, za tretiranje sjemenskog, rasada i sadnog materijala, za folijarno tretiranje biljaka i za suzbijanje štetnih insekata i grinja u skladištu.

Herbicidi

Herbicidi su fitotoksične hemikalije koje se koriste za sprječavanje rasta nepoželjnih biljaka (korova) ili za njihovo potpuno uništavanje. Herbicidima se može tretirati lišće neželjenih biljaka, zemljište prije ili poslije nicanja usjeva. Mogu biti selektivni herbicidi, za uništavanje određenih korova na oranicama pri čemu kulturne biljke ostaju neoštećene ili totalni herbicidi za potpuno uništavanje bilja na nekom području.

Fungicidi

Fungicidi su sredstva namijenjena suzbijanju fitopatogenih gljiva i bakterija, uzročnika biljnih bolesti. Prema hemijskom sastavu dijele se na organska, neorganska i biološka jedinjenja. Organska i neorganska jedinjenja koja inhibiraju razvoj fitopatogenih gljiva su fungostatici, a oni koji ih uništavaju su fungicidi. Većina fungicida ima preventivno djelovanje, iako se koriste i u suzbijanje već nastale bolesti. Osnovno djelovanje im je u sprječavanju razvoja spora, odnosno njihovu uništavanju prije nego što prodru u biljku. Koriste se za tretiranje zemljišta, sjemena, nadzemnih dijelova biljke i plodova prije skladištenja.

Klasifikacija pesticida prema hemijskoj strukturi

Dosada je poznato oko 130 različitih hemijskih skupina pesticida u koje je razvrstano oko 1000 aktivnih materija. Pesticidi u svojoj hemijskoj strukturi često sadrže hetero atome od kojih valja spomenuti atome halogenih elemenata, fosfor, azot i sumpor. U praksi se pesticidi najčešće svrstavaju u skupine obzirom na hetero atom kojeg sadrže u svojoj strukturi, npr.:

- organohlorna jedinjenja
- organofosforna jedinjenja
- karbamati
- piretrini i piretroidi itd.

Posljednjih godina može se govoriti o brzom razvoju nove grupe pesticida, tzv. biopesticidi. *Biopesticidi* su pesticidi dobiveni iz prirodnih materijala, kao što su biljke, životinje i neki minerali. Razlikuju se:

- mikrobiološki biopesticidi: bakterije (*Bacillus thuringiensis*), gljivice, virusi
- inkorporirani protektivni agensi (PIP = *Plant Incorporated Protectants*) su spojevi koje producira sama genetski modificirana biljka
- biohemijski pesticidi: prirodni netoksični spojevi pesticidnoga djelovanja (*feromoni*).

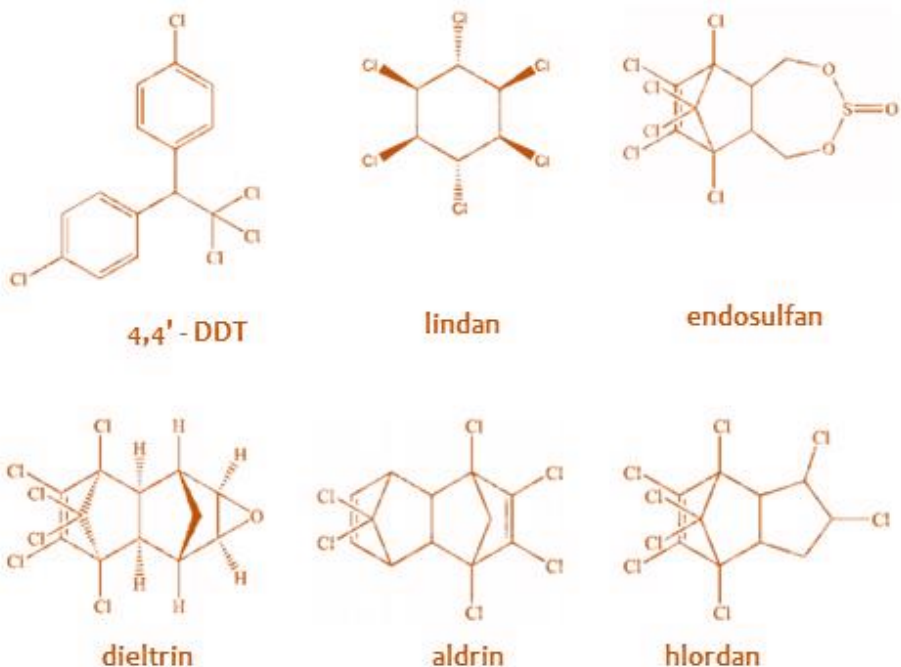
Prednosti biopesticida su niska toksičnost, djelotvornost u malim količinama i brza razgradivost, ali su, kao i svi živi sistemi, ograničeni trajanjem, imaju uzak spektar djelovanja i skupi su.

Organohlorni pesticidi

Organohlorni pesticidi su organski spojevi sa 5 ili više atoma hlora. To su bili prvi sintetski organski pesticidi čija je upotreba u većini razvijenih zemalja zabranjena sedamdesetih godina 20. vijeka, zbog utvrđenih toksičnih svojstava, i perzistentnosti u okolišu. Koristili su se najviše za suzbijanje različitih vrsta insekata. Otporni su na hemijsku i mikrobiološku razgradnju, te se mogu naći u proizvodima biljnog i životinjskog porijekla vrlo dugo (godinama) nakon primjene. Imaju izražen lipofilni, karakter zbog čega posjeduju sposobnost bioakumulacije i biomagnifikacije, kako u okolišu, tako i u lancu ishrane.

Njihova upotreba još uvijek nije regulirana, niti zabranjena u Africi gdje se koriste najčešće kao insekticidi i za suzbijanje malarije. Neki odvažnih predstavnika ove skupine su 4,4'-DDT, γ -heksahlorcikloheksan (lindan), endosulfan, aldrin, i dieldrin čije su strukture prikazane na Slici 7.

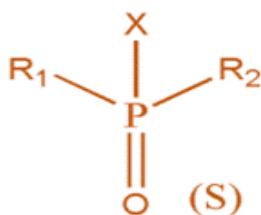
Upotreba organohlornih insekticida, zbog njihove akumulacije u životnoj sredini, zamijenjena je manje postojećim organofosforinim insekticidima.



Slika 7. Strukture nekih organoklorinskih pesticida.

Organofosforni pesticidi

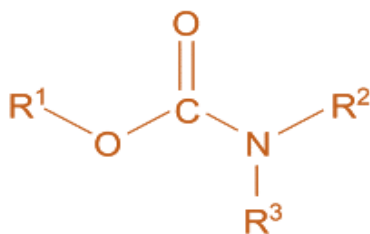
Organofosforni pesticidi su organski spojevi koji su po svojoj strukturi (Slika 8) najčešće triesterfosforne, tiofosforne i ditiofosforne kiseline. U skupinu organofosforinih pesticida ubrajaju se i fosforamidotioati, poput acefata, te glifosat koji je po svojoj strukturi fosfonat. Za razliku od organoklorinskih pesticida, organofosforni pesticidi se lako razgrađuju u okolišu u različitim hemijskim i biohemijskim procesima, te prema tome nisu perzistentni. Najčešće se koriste za suzbijanje insekata, a neki, npr. glifosat, za suzbijanje korova. Kao i u okolišu, u organizmu se također brzo razgrađuju na dialkilfosforne metabolite, dok je glavni razgradni produkt glifosata aminometilfosfonska kiselina. Pri primjeni ovih pesticida je potrebno strogo voditi računa o periodu karence.



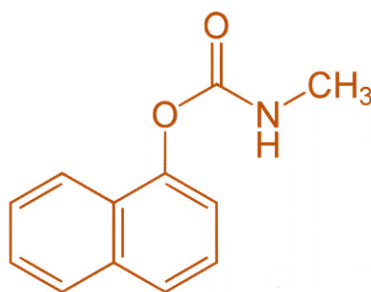
Slika 8. Opšta strukturna formula organofosfata

Karbamati

Karbamati su organski spojevi, izvedeni iz karbaminske kiseline, strukturne formule prikazane na Slici 9. R1 je skupina specifična za pojedini spoj, R2 je metilna grupa, a R3 je obično vodikov atom. Najviše primjenjivani karbamati su jedinjenja iz grupe N-metilnih derivata, kao što je karbaril (Slika 10). Predstavnici ove skupine su sličnog spektra djelovanja kao organofosforni pesticidi.



Slika 9. Strukturna formula karbamata



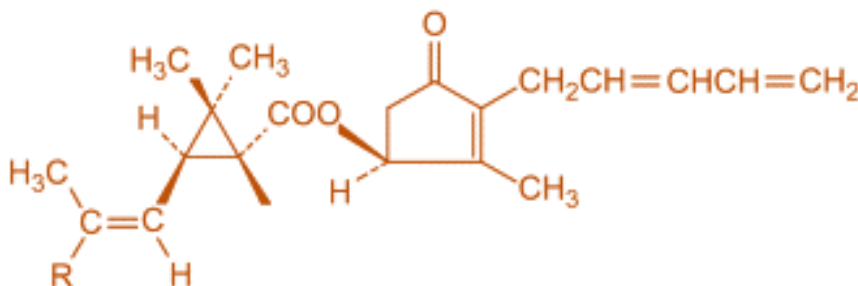
Slika 10. Strukturna formula karbarila

Neke od aktivnih materija iz grupe karbamata su: metiokarb, karbofuran, karbosulfan, fenoksikarb, fentiokarb, bendiokarb, pirimikarb, benfurkarb, aldikarb, metomil, karbaril, propoksur i dr.

Karbamati se kao i organofosforni pesticidi u okolišu lako razgrađuju, te nisu perzistentni.

Piretrini i piretroidi

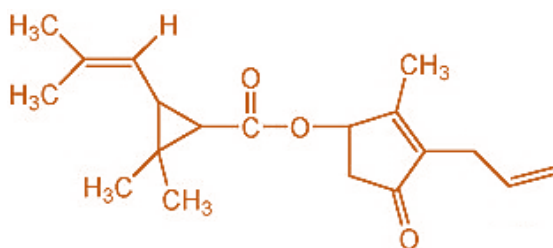
Piretrini su prirodne insekticidne supstance, koje su sadržane u ekstraktu cvijeta biljke buhača (*Chrysanthemum cinerariaefolium*, *Chrysanthemum coccineum*). Ulaze u sastav velikog broja preparata, npr. u insekticidima protiv sinantropnih i drugih insekata, repelentima za komarce i sl. Najpoznatiji su : piretrin I (Slika 11), piretrin II, cinerin I, cinerin II i sl.



Slika 11. Hemijska struktura piretrina I

Piretroidi su kontakti i digestivni insekticidi, sintetički analozi i derivati piretrina. Stabilniji su od prirodnih piretrina. Insekticidnu aktivnost piretrina imaju optički aktivni esteri iz (+)-trans-krizantemske kiseline i (+)-trans-piretrinske kiseline. Prirodni piretrini su efikasni insekticidi, međutim izrazito su fotosenzibilni, te se razgrađuju toliko brzo, da je njihova primjenjivost kao insekticida upitna.

Struktura piretroida slična je piretrinskoj uz dodatak bifenoksi skupine, te zamjenu nekoliko vodikovih atoma s atomima halogena, da bi se postigla bolja stabilnost uz istodobno očuvanje osnovnih svojstava piretrina. Predstavnici ove skupine su aletrin (Slika 12), bioaletrin, bioresmetrin, tetrametrin, deltametrin i sl.



Slika 12. Hemijska struktura Aletrina

Ostala hemijska klasifikacija pesticida obuhvaća relativno nove vrste pesticida iz skupina fungicida, herbicida, insekticida, regulatora rasta itd. Zajednička karakteristika novijih vrsta pesticida su manja toksičnost, brza razgradivost i visoka učinkovitost.

Zdravstveni rizici

Postoji ozbiljan negativan uticaj pesticida na ljudsko zdravlje povezan sa izloženošću višestrukim ostacima, što dovodi do pojave različitih oblika kombinovane toksičnosti. Najčešći simptomi kod trovanja pesticidima su: slabost, abdominalna bol, glavobolja, vrtoglavica, bol u nogama i leđima, anemija, mučnina, povraćanje, zamagljen vid, tahikardija, pojačano lučenje sline, povišen krvni tlak, letargija itd. Primarni ciljevi toksičnog efekta pesticida, u ljudskom organizmu, su hematopoetski sistem (inhibicija serumske kolinesteraze), kardiovaskularni (abnormalnosti u radu srca, kardiovaskularne lezije), reproduktivni (promjena morfologije placente, hemoragija i fibroza te inhibicija sinteze DNA u sjemenskim cjevčicama) i nervni sistem (glavobolje, slabost u mišićima, nesanica, vrtoglavica i oslabljena memorija). Pokazano je kako pesticidi mogu uzrokovati imunološke disfunkcije među životinjama. Osim toga, dokazan je utjecaj pesticida i na djevojke u pubertetu, gdje se kod pretjerane izloženosti DDT-u može razviti rak dojke. Također, može doći i do stvaranja nekih limfoma. Pesticidi imaju izniman efekat za reproduktivni sistem. Kod trudnica, koje su izložene previsokim količinama pesticida, može doći do kriptorhizma

kod novorođenčadi, ili češće pojave spontanih pobačaja, ili prijevremenog poroda. Kod muškaraca oni mogu uzrokovati neplodnost, smanjenu reproduktivnu sposobnost, smanjenje koncentracije spermija u ejakulatu, povišenu količinu luteinizirajućeg hormona (LH) i folikulostimulirajućeg hormona (FSH), te smanjen broj spermija, a ako se očevi izlažu pesticidima, mogu dovesti do kriptorhizma novorođenčadi.

Kontaminacija hrane pesticidima

Opšta populacija može da bude izložena pesticidima na razne načine, međutim unošenje rezidua pesticida vodom za piće i hranom je najznačajniji put.

Najčešća upotreba pesticida je za zaštitu nadzemnog ili podzemnog dijela biljke, zatim za zaštitu sjemena za sjetvu. Pri zaštiti nadzemnih dijelova biljki pesticidi se primjenjuju prskanjem ili zaprašivanjem biljke. Za zaštitu podzemnih dijelova biljaka posipa se zemljište pred sjetvu ili u toku rasta biljke. Često se u različitim fazama vegetacije biljke vrši zaštita različitim pesticidima, te se u toku cijelog vegetacionog perioda može koristiti i desetak različitih preparata.

Prilikom tretiranja biljnih kultura preparatima pesticida veći dio aktivne supstance se mehanički uklanja sa tretirane biljke, i odlazi u zemljište ili vodotokove, dijelom se razgrađuje, ali izvjesna količina se može trajno zadržati u biljnom tkivu iz kojeg preko hrane dopijeva u organizam ljudi i životinja. Ove količine pesticida koje se trajno zadržavaju na tretiranim biljkama označavaju se kao *rezidualne količine pesticida*. Stoga, kontaminacija hrane biljnog porijekla može nastati:

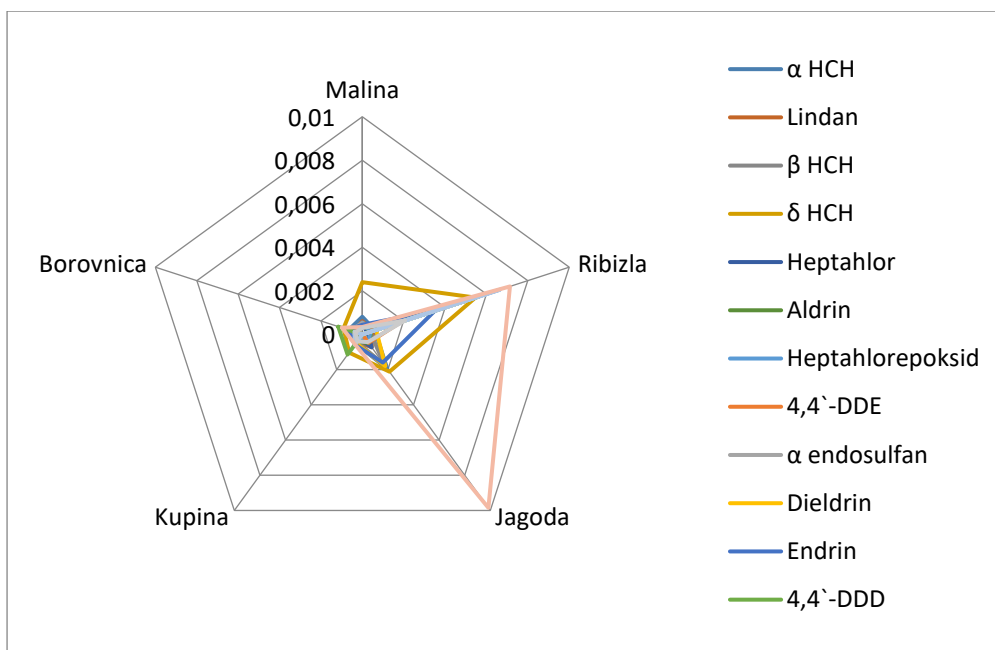
- direktnim kontaktom s pesticidima (tretmanom biljaka tokom rastenja i razvića, te naknadno u silosima i prostorima za čuvanje) i
- indirektnim kontaktom, apsorpcijom rezidua iz zemljišta, navodnjavanjem kontaminiranom vodom, zrakom, ispiranjem sa susjednih zemljišta i sl.

Rezidue pesticida mogu biti prisutne u svježem ili konzerviranom voću i povrću, prerađenoj hrani i pićima, te u svježim ili prerađenim proizvodima

životinjskog porijekla. Pojedina hrana može sadržavati smjesu različitih pesticida kao i što raznolikom hranom unosimo različite pesticide u isto vrijeme. Najsigurnije voće je tropsko kao što su papaja, avokado, ananas i mango, jer se te voćke ne tretiraju pesticidima. Dinje, kivi i lubenice također su na bijeloj listi voća. Citrusno voće se snažno tretira pesticidima, iako se ponekad ne nalazi na listama „najopasnijih“ namirnica jer se njihova kora, u kojoj je najveća koncentracija pesticida, ne konzumira direktno. Povrće najmanje tretirano pesticidima uključuje kupus, luk, karfiol, šparogu, mrkvu, patlidžan, kukuruz šećerac i gljive.

Namirnice animalnog porijekla mogu da sadrže rezidue pesticida ukoliko se životinje hrane zagađenom biljnom hranom (silažna hrana, rezanci šećerne repe, lucerka, cerealijske, soja i sl.) ili ako je na životinjama vršeno suzbijanje parazita i insekata.

Prosječni nivoi unosa *organohlornih pesticida* se razlikuje od zemlje do zemlje i zavisi od načina ishrane i vrste hrane. Namirnice životinjskog porijekla su značajan izvor ovih insekticida. *Insekticid DDT* može da se akumulira u ribama u količinama koje se nekoliko hiljada puta veće nego što je njegov sadržaj u vodi u kojoj žive. Uzgajanjem korjenastog i drugog povrća na zemljištu, koje sadrži ostatke i metabolite organohlornih pesticida, oni prelaze u povrće. Nađene koncentracije u povrću su veoma niske, ali su istovremeno vrlo učestale. Kako je u proizvodnji organske hrane strogo zabranjena upotreba organohlornih pesticida, ostaci koji se mogu pronaći su porijeklom iz zemljišta na kojem je povrće uzgajano. Na grafikonu 1 su prikazane rezidualne vrijednosti ovih jedinjenja pronađenih u raznim vrstama i sortama bobičastog voća porijeklom sa jedne farme u Visokom (BiH).



Grafikon 1. Prosječan sadržaj analiziranih organohlorinih insekticida po sortama bobičastog voća (Halilović, 2015)

Rezidue *organofosforinih* insekticida u namirnicama su rijetki i zato ne predstavljaju veliku opasnost. Koncentracije ostataka piretrina i piretroida, u animalnim namirnicama, uglavnom su niske, i manje su za *trans* nego za *cis* izomere. Najveće koncentracije nalaze se u masnom tkivu.

Prisutnost *neonikotinoida* otkrivena je u medu, a nedavno je prijavljen jedan slučaj kobnog ljudskog trovanja.

U posljednje vrijeme, sve više se pažnje obraća i problemu trovanja pesticidima mlijeka dojilja. Pesticidi u mlijeku dojilja, potiču od razgradnje masti u ljudskom organizmu, gdje se inače pohranjuju. U Italiji, rezidui pesticida, nađeni su u mlijeku dojilja svega četiri dana nakon porođaja. U nekim slučajevima koncentracija DDT-a (*dihlorodifeniltrihloretana*) u mlijeku dojilja, bila je viša čak 127 puta, nego u kravljem mlijeku. Nedavna istraživanja u Francuskoj, pokazuju da su koncentracije DDT-a, pesticida na bazi hlorisanih ugljikovodika i karbonata u mlijeku dojilja, još uvijek znatno više od dozvoljenih količina propisanih od strane Svjetske zdravstvene organizacije (WHO). Istraživanja, također, ukazuju na činjenicu da mlijeko

dojilja koje konzumiraju većinom organsku hranu, sadrži znatno manje pesticida.

Količina pesticida u namirnicama zavisi i od poštovanja karence pesticida. *Karenca predstavlja period od primjene pesticida do berbe ili sjetve biljnih kultura, odnosno to je posljednji rok primjene nekog pesticida prije berbe ili žetve.* Karenca pesticida je utvrđena za sve aktivne materije koje se u većem broju oblika i preparata nalaze na tržištu. Stoga je za pesticide veoma bitna vrijednost maksimalne količine ostataka (*engl. Maximum residue level-MRL*). Maksimalna količina ostataka pesticida je maksimalna koncentracija ostataka (izražena u miligramima po kilogramu proizvoda na koji se primjenjuje) koja je legalno dopuštena u hrani i životinjskom krmivu. Količina ostataka pesticida u prehrambenim proizvodima je određena zakonom, tako da se prvenstveno minimizira izloženost potrošača štetnim i nepotrebnim unosima pesticida, zatim osigura pravilna primjena pesticida, te slobodno kretanje proizvoda koji su tretirani pesticidima.

MRL je određen uz pomoć podataka koji su dobiveni terenskim ispitivanjima, koja su uobičajeno provedena od strane proizvođača pesticida u nekoliko različitih geografskih regija, tako da su zastupljeni različiti klimatski uslovi, kulturna praksa i vrste zemljišta. Maksimalna količina ostataka pesticida je određena za sve poljoprivredne proizvode, gdje su pesticidi korišteni direktno na usjevima namijenjenima za ljudsku konzumaciju, ili na usjevima kojima se namjeravaju hraniti životinje. Također MRL vrijednosti su određene za životinjske proizvode koje konzumira čovjek, npr. meso, mlijeko i jaja. U nekim slučajevima, određeni su i za prerađenu hranu ako postoji mogućnost da se pesticidi koncentriraju prilikom prerađivanja ili za primarno prerađenu hranu kao što su brašno i biljna ulja. MRL je vjerodostojno i korisno sredstvo za provedbu prihvatljivog korištenja pesticida. Međutim, korištenje MRL-a se pokazalo neadekvatnim kao vodič za konzumaciju ostataka pesticida putem hrane. Prilikom analize studija gdje se procjenjivao unos ostataka pesticida hranom pokazano je kako se korištenjem MRL-a kao osnovnog pokazatelja procjene unosa ostataka pesticida došlo do precjenjivanja stvarnog unosa. SZO je zato preporučila drugačiji pristup za procjenjivanje prehrambenog rizika od izloženosti pesticidima koji uključuje činjenicu da se hrana većinom

procesira u industriji/kućanstvima prije same upotrebe što utječe na konačnu količinu ostataka u njoj. Tako, npr. sadržaj ostataka pesticida zaostao na usjevima uobičajeno opada prilikom transporta, skladištenja, pripreme i procesiranja. Zato je razvijen faktor procesuiranja (Pf) - usporedba sadržaja ostataka pesticida u procesuiranoj i ne procesuiranoj namirnici. Predlaže se da se rukovanje hranom nakon berbe, te procesuiranje hrane uzima u obzir kod procjene unosa ostataka pesticida hranom, kako bi se pružila realnija procjena prehrambenog unosa, i tako osigurala sigurnost konzumenata. Ukoliko ipak dođe do premašenih vrijednosti MRL-a na usjevima, one su snažni pokazatelji kršenja dobre poljoprivredne prakse.

Preventivne mjere

Obzirom da upotreba pesticida nije bezopasna u interesu je svesti rizik, koji oni predstavljaju za čovjeka i okoliš na najmanju moguću mjeru. Danas postoje brojne mjere kojima se može smanjiti rizik kojeg sa sobom nosi upotreba pesticida, ipak, za sigurnost hrane općenito, najznačajnije su:

Administrativne - Svaka država različitim administrativnim mjerama (zakoni i podzakonski akti, karantenska služba, izvještajno prognozna služba i sl.) provodi sistem zaštite bilja.

Agrotehničke – Agrotehničke mjere obuhvaćaju plodosmjenu, zaoravanje biljnih ostataka, sjetvu/ sadnju zdravog sjemenskog odnosno sadnog materijala, uzgoj tolerantnih/otpornih kultivara, suzbijanje korova alternativnih domaćina fitopatogenim gljivama, izbalansiranu gnojidbu, navodnjavanje i odvodnju kao i pravovremenu sjetvu/sadnju te žetvu. One pozitivno djeluju na rast, razvoj i vitalnost biljaka, pri čemu negativno djeluju na patogene, a njihovo pravilno provođenje može značajno smanjiti intenzitet pojave bolesti.

Mehaničke - Mehaničke mjere borbe obuhvataju odsijecanje, čupanje i iznošenje iz nasada bolesnih biljaka ili biljnih dijelova kako ne bi postali izvor zaraze za zdrave biljke, uništavanje biljnih organa u kojima parazit prezimljuje i uklanjanje samih parazita.

Fizikalne - Fizikalne mjere podrazumijevaju primjenu visokih temperatura za suzbijanje uzročnika bolesti (termoterapija). Toplinska energija može se primijeniti za dezinfekciju zemljišta vodenom parom (80 do 95°C), no ova se metoda, iako vrlo efikasna, rijetko koristi jer je skupa. Drugi način primjene visokih temperatura u područjima s dugim i vrućim ljetima je solarizacija, pri čemu se zemljište prekriva tankom prozirnom polietilenskom folijom, u trajanju od jednog do dva mjeseca.

Biološke se mjere još uvijek malo koriste u borbi protiv uzročnika biljnih bolesti. Mogu se koristiti manje agresivni (hipovirulentni) sojevi virusa pa se tako na primjer pokušao riješiti problem *Pepinomozaik* virusa na paradajzu. U staklenicima i plastenicima protiv uzročnika sive plijesni (*Botrytis cinerea*) moguća je upotreba biofungicida na osnovi predatorske gljive *Trichoderma harzianum*.

Hemijske mjere pretpostavljaju upotrebu različitih hemijskih preparata koji, ovisno o vrsti preparata, uzročniku bolesti ubijaju ili zaustavljaju njegov porast i razvoj.

Ekološki prihvatljiv pristup zaštiti bilja je tzv. integrisana zaštita koja se temelji na kombinaciji metoda fizičke kontrole (mreže protiv muha i ptica i sl.), metoda kulturološke kontrole (higijenske mjere), metoda biološke kontrole (korištenje prirodnih neprijatelja i metoda hemijske kontrole (primjena pesticida, ali uz minimalan rizik za ne ciljane organizme).

Analitičke tehnike za dokazivanje rezidua pesticida u hrani

Pesticidi čine heterogenu grupu kemijskih spojeva s različitim biološkim, kemijskim i fizikalnim osobinama i zbog toga ne postoji jedinstvena metoda ili tehnika njihovog određivanja.

Analitičke tehnike za određivanje pesticida ekstrahiranih iz različitih tipova uzoraka hrane, moraju biti visoko selektivne te omogućiti kvalitativnu i kvantitativnu analizu pri vrlo niskim koncentracijama analita. Uz odabir prikladnog postupka pripreme uzorka, odabir instrumentne tehnike, često je ključan korak za uspješnu analizu. Hromatografske

tehnike, od kojih valja izdvojiti plinsku i tekuću hromatografiju, udovoljavaju navedenim zahtjevima za određivanje pesticida (GC – MS).

QuEChERS (*eng. Quick Easy Cheap Effective Rugged And Safe*) predstavlja skraćenicu za: brzu, jednostavnu, jeftinu, učinkovitu, robusnu i sigurnu metodu ekstrakcije, koja je razvijena u cilju određivanja ostataka pesticida u poljoprivrednim proizvodima, te se koristi za širok spektar pesticida prisutnih u hrani.

3. 2. REZIDUE VETERINARSKIH LIJEKOVA

U današnje vrijeme upotreba veterinarskih lijekova je postala svakodnevica, a sve u svrhu sprječavanja ili iskorjenjivanja mnogih bolesti koje prijete životinjama, a koje bi mogle ostaviti nesagledive štetne posljedice i po same životinje, a i po farmere i ljude koji konzumiraju proizvode od tih životinja. Gledajući sa te strane veterinarski lijekovi su neizostavni i pomažu u liječenju mnogih bolesti životinja, ali s druge strane veliku opasnost predstavljaju njihove rezidue koje se mogu naći kasnije u proizvodima, koji potiču od životinja tretiranih sa tim lijekovima.

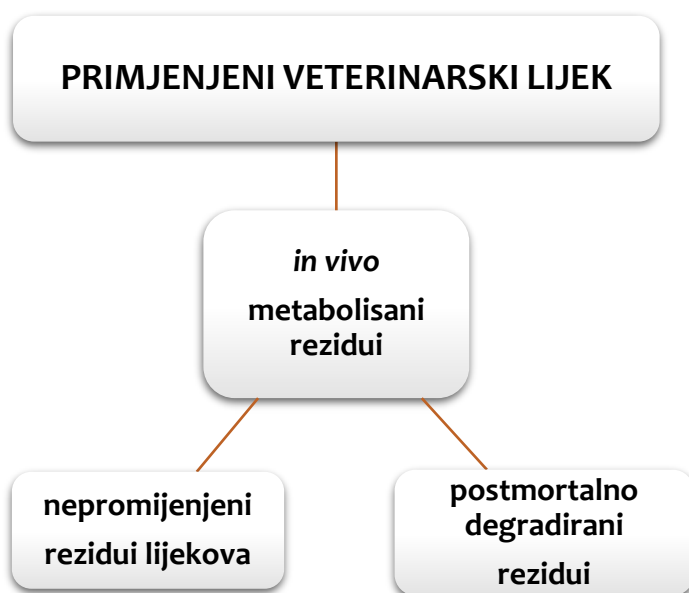
Rezidualne količine nekog lijeka čine:

- neizmijenjene antimikrobne aktivne supstance,
- metabolički izmijenjene supstance koje su i dalje antimikrobno aktivne i
- inaktivni oblici primijenjenog lijeka (Slika 13).

Koji će oblik rezidua biti zastupljen – nativni ili izmijenjeni zavisi od vremenskog perioda/*karence*, koji protekne od posljednje primjene lijeka i žrtvovanja životinje. Karenca lijeka, odnosno period njegovog izlučivanja iz organizma životinja, najvažniji je faktor koji utiče na pojavu rezidua antibiotika ali i drugih lijekova u namirnicama animalnog porijekla

Rezidue veterinarskih lijekova u hrani se uglavnom mogu naći u: mesu, mlijeku i jajima životinja koje su bile tretirane lijekovima, zbog liječenja određene bolesti ili se dodaju zbog bržega rasta, većega prinosa mesa, nadzora reprodukcije te umirenja životinja.

S obzirom da su animalni proizvodi jedni od najčešće konzumiranih proizvoda u svakom domaćinstvu, vrlo je važno da su oni zdravstveno ispravni, i da ne sadrže rezidue u većim količinama od dopuštenih vrijednosti, propisanih zakonskim propisima.



Slika 13. Moguće promjene lijeka nakon unošenja u organizam životinje

Životinje koje se uzgajaju, za meso, određeno se vrijeme (ovisno o vrsti lijeka) prije usmrćivanja ne smiju tretirati lijekovima, ovisno o karenci. Veterinari i stočari, zbog toga imaju veliku odgovornost i obavezu da prate period karence kod životinja koje su na bilo koji način tretirane veterinarskim lijekovima, a namijenjene su za ishranu ljudi. Jedino na ovaj način je moguće obezbijediti da se u jestivim tkivima životinja, mlijeku i jajima ne pojave nedozvoljene količine rezidua lijeka. U suprotnom ljudi, kao konzumenti namirnica životinjskog porijekla, će biti kontinuirano, tokom života, izloženi djelovanju zaostataka tih materija, koje mogu imati brojne negativne efekte na zdravlje, ali i na tehnološke postupke.

Postoji veliki broj veterinarskih lijekova, ali općenito rezidue veterinarskih lijekova, od tretiranja životinja, se najčešće dijele na:

- antibiotike,
- antiparazitne lijekove,
- hormonske pripravke,
- antiseptike,
- dezinficijense i

- sredstva za smirenje.

Farmakokinetika lijeka, odnosno njegova resorpcija, raspodjela u organizmu, metabolički procesi kojima podliježe, i eliminacija su faktori koji značajno utiču na efikasnost lijeka i period njegovog izlučivanja iz organizma (karencu).

Kontrola ostataka (rezidua) u hrani iznimno je važan dio veterinarskog javnog zdravstva kao i cjelokupnog sistema sigurnosti hrane, naročito danas, u uslovima intenzivne proizvodnje hrane, koja je praćena upotrebom različitih hemijskih supstanci. S tog gledišta, značajna je mogućnost štetnog djelovanja po zdravlje ljudi ukoliko zaostanu u proizvodima animalnog porijekla.

U pogledu utjecaja procjene štetnosti i negativnih efekata na zdravlje, kao i tehnološke efekte na animalne proizvode, posebno se ističu antibiotici.

Zdravstveni rizici

Osim tehnoloških negativnih efekata, veoma značajne su štetne posljedice po zdravlje čovjeka. Realna su očekivanja pojave alergijskih efekata nakon konzumiranja namirnica koje sadrže rezidue antibiotika. Postoje dvije mogućnosti da dođe do pojave senzibilacije ili alergijske reakcije uslijed prisustva antibiotika u namirnicama. Prva mogućnost je stalna senzibilacija organizma reziduama antibiotika iz hrane, a kao posljedica se može javiti alergijska reakcija, pri terapijskoj primjeni antibiotika. Druga mogućnost je pojava alergije prilikom upotrebe životnih namirnica kontaminiranih reziduama ovih lijekova, kod osoba koje su već senzibilisane prethodnom terapijom antibioticima. Manifestacija alergijske reakcije kod različitih grupa preosjetljivih osoba može da bude različitog intenziteta.

Osim alergijskih reakcija, rezidue antibiotika u hrani animalnog porijekla mogu nakon dužeg konzumiranja izazvati i mikrobnu rezistentnost kod čovjeka, što predstavlja veliki problem, kao i poremetiti crijevnu mikrofloru, a neki od antibiotika, poput hloramfenikola i nitrofurana izazivaju i djeluju

genotoksično i kancerogene, te su stoga i zabranjeni, mada se i dalje primjenjuju ilegalnim putem.

Zbog učestalog izlaganja antibioticima, upravo putem hrane animalnog porijekla koja sadrži veće količine rezidua antibiotika od dopuštene, bakterije mogu stvoriti mehanizme za neutralizaciju učinka lijeka uslijed čega vrlo brzo postaju rezistentne.

Neki lijekovi mogu da imaju kancerogeno, mutageno i teratogeno djelovanje. Smatra se da su mogući teratogeni i mutageni efekti antimikrobnih lijekova povezani sa njihovom osobinom da najčešće djeluju antibakterijski, ometajući sintezu proteina i da je osnova njihove toksičnosti isto djelovanje i na ćelije humanog organizma. Poseban problem predstavljaju mutageni i kancerogeni efekti pojedinih hormona. Hormonski se lijekovi koriste u svrhu bržega rasta i boljega prirasta, kontrole spolne zrelosti (ubrzanje ili odgode parenja, povećanje mliječnosti krava ili produkcije jaja kod nesilica Korištenje svih oblika hormonskih promotora rasta zabranjeno je u EU od 2006., iako se, zbog teškog otkrivanja, mogu još naći na crnome i sivome tržištu, ali i u SAD-u i Kanadi gdje su dozvoljeni.

Osim što se unosom takvih materija u organizam direktno može poremetiti hormonska ravnoteža, oni, također, djeluju i genotoksično i kancerogeno na ljudski organizam. Za hormone je karakteristična karcinogenost (zabranjeni karcinogeni DES17 β estradiol: genotoksični metaboliti). Toksični su za srce i pluća i zabranjen je klenbuterol. Neki su karakteristični za razvojnu toksičnost (DES, 1980: feminizacija dječaka i uranjen pubertet kod djevojčica). Ostaci hormona, također, mogu utjecati na embrionalni, odnosno fetalni razvoj djeteta. Najosjetljiviji dio populacije na djelovanje hormona su novorođenčad, djeca u pubertetu i žene tijekom i poslije menopauze. Epidemiološkim je studijama utvrđena povezanost unosa crvenoga mesa s većom učestalošću hormonski ovisnih vrsta raka, poput raka dojke i genitalnoga trakta

Očito je da se rezidui antimikrobnih lijekova, kao i anabolici, mogu naći u hrani i da njihovo prisustvo predstavlja rizik za zdravlje ljudi, posebno pojedinih populacionih grupa kao što su trudnice, djeca i hronični bolesnici. Od svih veterinarskih lijekova najčešća je primjena antibiotika.

3. 2. 1. ANTIBIOTICI

Antibiotici su specifični proizvodi metabolizma, koji posjeduju visoku fiziološku aktivnost prema određenim grupama organizama kao što su virusi, bakterije, plijesni, protozoe ili zloćudni tumori, zadržavajući njihov rast ili uništavajući ih. Osim prirodnih, dobivenih mikrobnom biosintezom, postoje sintetski i polusintetski antibiotici odnosno hemijski spojevi nastali hemijskom modifikacijom, mikrobnom biosintezom proizvedenih antibiotika. Antibiotike proizvode mnogi organizmi kao što su bakterije, gljive, alge, lišaji, biljke i životinje, a industrijski se proizvod mikroorganizama, te ih je u upotrebi oko 200 različitih vrsta. Antibiotici se razlikuju od opštih bioloških toksina (fenoli, alkoholi, organske kiseline) po selektivnom odnosno, specifičnom djelovanju i visokoj fiziološkoj aktivnosti, što znači da djeluju na osjetljive mikroorganizme u vrlo niskim koncentracijama (10^{-4} do 10^{-6} g/mL).

Antibiotici se mogu klasificirati na nekoliko načina. Možemo ih podijeliti prema mikroorganizmu koji ih proizvodi, načinu i spektru djelovanja, prekursoru iz kojeg se sintetiziraju, metaboličkom putu biosinteze te prema njihovoj kemijskoj strukturi. Upravo je podjela prema hemijskoj strukturi (Tabela 20) najčešći način klasificiranja antibiotika, jer antibiotici iste ili slične hemijske strukture pokazuju sličnost i u antibakterijskoj aktivnosti, efikasnosti, toksičnosti i alergijskom potencijalu.

Tabela 20. Podjela antibiotika prema hemijskoj klasifikaciji i mehanizmu djelovanja (Kohanski i sar., 2010.)

VRSTA LIJEKA	PORIJEKLO	MJESTO DJELOVANJA
Fluorokinoloni	sintetsko	Inhibicija sinteze DNK
Trimetoprim-sulfamethoxazol	sintetsko	Inhibicija sinteze DNK
Rifamicin	Prirodni i polusintetički oblici ansamicina (derivati <i>S. mediteranei</i>)	Inhibicija sinteze RNK
β-laktami	Prirodne i polusintetske forme sa karbonilnim laktamskim prstenom	Inhibicija sinteze ćelijskog zida
Glikopeptidi i glikolipopeptidi	Prirodne i polusintetske forme aminopeptidnih lanaca (za glikopeptide) ili sa vezanim masnim kiselinama kod glikolipopeptida (derivati aktinobakterija)	Inhibicija sinteze ćelijskog zida
Lipopeptidi	Prirodne i polusintetske forme peptidnih lanaca masnih kiselina (dobiveni od <i>S. roseosporus</i> i <i>B. polymyxa</i>)	Inhibicija sinteze ćelijskog zida
Aminoglikozidi	Prirodne i polusintetske forme amino šećera (-mycin) od <i>Streptomyces</i> spp. i mycins od <i>Micromonospora</i> spp.)	Inhibicija sinteze proteina
Tetraciklini	Prirodne i polusintetske forme -4 prstena poliketona (od <i>S. aureofaciens</i> i <i>S. rimosus</i>)	Inhibicija sinteze proteina
Makrolidi	Prirodne i polusintetske forme vezanog laktonskog prstena (14- i 16-) (od <i>S. erythraea</i> i <i>S. ambofaciens</i>)	Inhibicija sinteze proteina
Streptogramini	Prirodne i polusintetske forme pristinamycin I i pristinamycin II (od <i>Streptomyces</i> spp.)	Inhibicija sinteze proteina
Fenikoli	Prirodne i polusintetske forme dihaloroacetatne kiseline sa aromatskim prstenom i aminopropandiol lancem (od <i>S. venezuelae</i>)	Inhibicija sinteze proteina

Antibiotici koji se koriste u veterinarskoj medicini pripadaju sljedećim osnovnim skupinama (Makovec i sur., 2014)

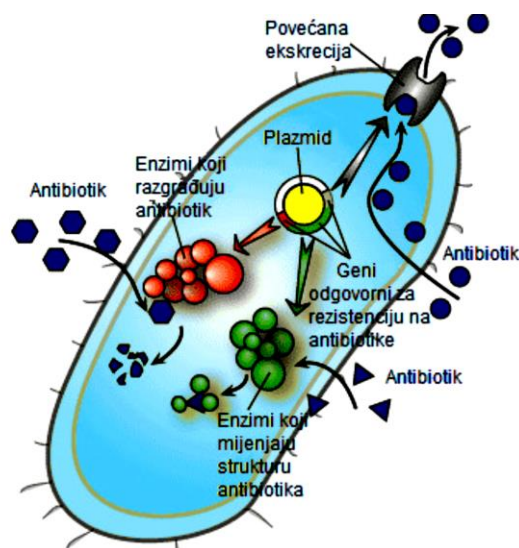
- β-laktamski antibiotici koji predstavljaju grupu najčešće primjenjivanih antibiotika u tretiranju bakterijskih infekcija životinja

na farmama, te obuhvaćaju dvije glavne skupine antibiotika: peniciline i cefalosporine;

- aminoglikozidni antibiotici koji se koriste u liječenju animalnih i humanih bolesti čiji su najpoznatiji predstavnici gentamicin, linkomicin, neomicin, streptomycin, kanamicin, amikacin i apramicin;
- makrolidni antibiotici su grupa antibiotika koja se u veterinarskoj praksi koristi za tretiranje respiratornih bolesti, a najpoznatiji predstavnici su: acetilsovaleriltilvalozin, eritromicin, spiramicin, tilmikozin, tilozin i tulatromicin;
- peptidni antibiotici s najčešćom primjenom u liječenju upalnih procesa urinarnog trakta čiji su najpoznatiji predstavnici cink-bacitracin, efrotomicin i virginijamicin;
- tetraciklinski antibiotici su često primjenjivana grupa antibiotika zbog širokog spektra djelovanja, a najpoznatiji predstavnici su klortetraciklin, oksitetraciklin, tetraciklin i doksiciklin;
- kinoloni, odnosno sintetički antimikrobni agensi širokog spektra djelovanja koji se upotrebljavaju u stočarstvu i za akvakulture, a najpoznatiji predstavnici su sarafloksacin i difloksacin.

Zbog učestalog izlaganja antibioticima, bakterije moraju stvoriti mehanizme za neutralizaciju djelovanja lijeka (Slika 14), uslijed čega vrlo brzo postaju rezistentne. Razlikujemo četiri osnovna mehanizma otpornosti-rezistentnosti, koji se mogu međusobno preklapati:

- Stvaranje enzima koji razgrađuju molekulu antibiotika – enzimska inaktivacija lijeka. Primjer za to je enzim β -laktamaza koja hidrolizira četveročlani β -laktamski prsten, aktivni dio molekule penicilina i cefalosporina, te navedeni lijekovi gube svoje djelovanje.
- Promjene u ćelijskom zidu ili u ćelijskoj membrani (ovim se sprječava prodiranje lijeka u bakterijsku stanicu).
- Promjene u mjestu vezivanja lijeka ili nestanak tih veznih mjesta (većina lijekova djeluje na specifična mjesta kao što je protein, RNK, DNK ili ćelijska membrana, a samo male promjene na mjestima izlaganja djelovanju antibiotika mogu zaštititi bakteriju od štetnog djelovanja lijeka).
- Promjene osnovnih metaboličkih puteva



Slika 14. Mehanizam otpornosti na antibiotike(Jurić i Kukolj, 2010.)

Povećana rezistencija uočena je kod većine patogena proteklih godina u različitim regionima svijeta uključujući i razvijene zemlje. Ovo se dešava uslijed promjene u karakteristikama mikroorganizama, povećanom upotrebom antibiotika, te društvenim i tehnološkim promjenama koje su ubrzale razvoj i širenje organizama koji su rezistentni na lijekove.

Primjena antibiotika

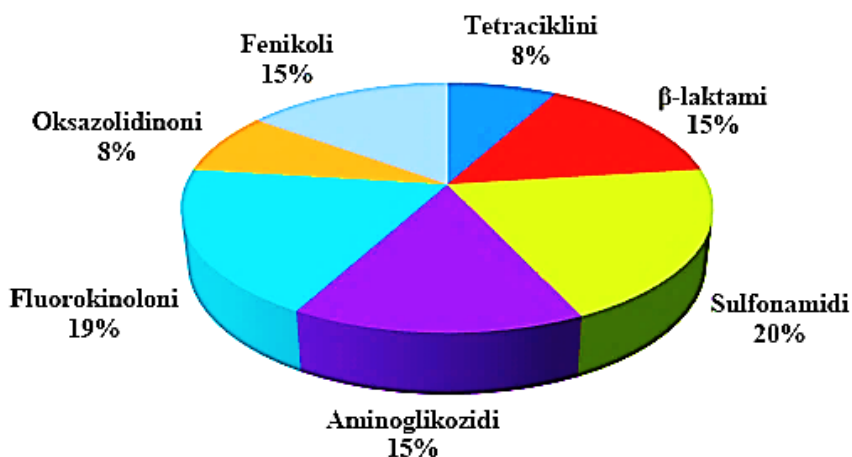
Antibiotici se upotrebljavaju u mnogobrojne svrhe te se mogu koristiti kao:

1. **Terapeutska sredstva:** za liječenje bolesti. Zaražene životinje dobivaju terapiju antibioticima, što obično uključuje visoke doze antibiotika u relativno kratkom vremenskom periodu.
2. **Profilaktička sredstva:** za prevenciju bolesti. To uključuje davanje subterapijskih doza antibiotika životinjama putem hrane ili vode za piće, kada su znakovi i simptomi infekcije odsutni, ali postoji sumnja na nju. Antibiotici se primjenjuju periodično po nekoliko dana tijekom životnog ciklusa životinje.
3. **Promotori rasta:** Za povećanje stope rasta. Upotrebu promotora rasta karakterizira primjena vrlo niske doze antibiotika na svakodnevnoj bazi, uglavnom tokom cijeloga života životinje, i daje joj se putem hrane. Ovakva upotreba se razlikuje od terapeutske i profilaktičke upotrebe antibiotika, koji se koriste u većim dozama i većinom se primjenjuju kroz vodu za piće. Za antibiotike koji se koriste kao promotori rasta je poznato da potiskuju crijevne bakterije ostavljajući više hranjivih tvari koje onda životinja apsorbira za veće dobivanje na težini.

Na slici 15. prikazano je sedam glavnih skupina antibiotika, te njihovi udjeli u korištenim veterinarskim lijekovima, pri čemu najveći dio čine sulfonamidi i fluorokinoloni.

Tetraciklini, β -laktami, sulfonamidi, aminoglikozidi, fluorokinoloni, oksazolidinoni, fenikoli su antibiotici, koji se koriste u većim dozama, i većinom se primjenjuju kroz vodu za piće. Za antibiotike koji se koriste kao promotori rasta je poznato da potiskuju crijevne bakterije ostavljajući više hranjivih materija, koje onda životinja apsorbira za veće dobivanje na težini. Istraživanje također pokazuje da je „korist“ od upotrebe promotora rasta više vidljiva u bolesnih životinja ili onih koje se drže u skućenim, nehigijenskim uvjetima. Terapijska upotreba antibiotika se ne dovodi u pitanje, ali se razlikuju stavovi naučnika o upotrebi antibiotika kao

promotora rasta kod životinja, te se i dalje vodi rasprava o tome da li će zabrana ovih supstanci imati pozitivne efekte na ljudsko zdravlje.



Slika 15. Distribucija najčešće korištenih skupina antibiotika koji se koriste kao veterinarski lijekovi, a detektirani su u hrani (Chàfer-Pericàs i sur., 2010)

U Evropskoj uniji, *virginiamicin* (*Streptogramin A*), *bacitracin* (također se koristi u humanoj medicini), tilozin i spiramicin (makrolidi) su zabranjeni kao promotori rasta. Zbog potencijalnog toksičnog utjecaja na ljude, te mogućnosti pronalaska metabolita, u jestivim tkivima, primjena hloramfenikola u životinja, čiji su proizvodi namijenjeni ljudskoj upotrebi, zabranjena je u Evropskoj Uniji. Evropska Unija uspostavila je i tzv. „zero tolerance“ te je hloramfenikol uvršten u skupinu supstanci za koje se maksimalno dozvoljena količina u namirnicama životinjskog porijekla ne može odrediti iz toksikoloških razloga.

Uprkos zabrani, ostaci hloramfenikola se pronalaze u svim vrstama proizvoda životinjskog porijekla (Tabela 21), što izaziva veliku zabrinutost potrošača.

Tabela 21. Koncentracija hloramfenikola (ng/kg) u mesu goveda, svinja, peradi i mesnim proizvodima određene tokom 2010. godine
(Bilandžić i sar., 2011.)

Vrsta mesa	Broj uzoraka	Minimum	Maksimum	Srednja vrijednost	Standardna greška
Govedina	109	0,108	202,9	15,8*	2,65
Svinjetina	46	0,263	92,7	11,3*	2,41
Perad	33	1,01	139,2	15,5*	15,5
Proizvodi	21	0,177	17,9	3,54	0,965

* $p < 0,05$

Primjena antibiotika u stočarstvu dovela je do suzbijanja mnogih zaraznih bolesti a njihova upotreba stvorila je mnoge probleme u mljekarstvu. Iako antibiotici mogu dospjeti u mlijeko nakon terapije raznih oboljenja, ali i kao posljedica dodatka stočnoj hrani, vrijeme izlučivanja antibiotika varira kod pojedinih životinja, što zavisi od vrste lijeka, unesenim količinama, načinu aplikacije, dobi životinje, zdravstvenom stanju, stadiju laktacije, te individualnim osobinama životinja. Zbog široke primjene antibiotika u liječenju životinja, rezidue istih su česta pojava u mlijeku.

Antibiotici u mlijeku

Nakon završetka tretmana, oboljele životinje, antibiotici se zadržavaju u vimenu i izlučuju mlijekom. Najčešći izvor rezidua antibiotika u mlijeku jeste intra mamarna aplikacija lijeka, tokom liječenja mastitisa (upale vimena), tako da tkivo apsorbira dio lijeka, pri čemu se određena količina izlučuje mlijekom. Antibiotički agensi dopijevaju u mlijeko i preko parenteralne, peroralne, intrauterinarnе, intravenozne i intramuskulurane upotrebe. Koncentracija izlučenih antibiotika u mlijeku u velikoj mjeri zavisi od zdravstvenog i fiziološkog stanja životinje, te pored toga zavisi i o količini i vrsti upotrebljenog antibiotika, količini proizvedenog mlijeka i načinu unošenja u organizam. U pravilu bez obzira na način unošenja lijeka u organizam, veće količine unesenog antibiotika imaju za posljedicu veću količinu rezidua u mlijeku.

Prisutnost antibiotika u mlijeku štetna je zbog slijedećih razloga:

- dovodi do antibiotske rezistencije,
- ima alergijski i anafilaktički učinak (npr. penicilinski preparati),
- ima toksični učinak (npr. streptomycin oštećuje sluh i bubrege, hloramfenikol oštećuje jetru i koštanu srž)
- uzrokuje poremećaje u probavi,
- dovodi do hormeze (adaptivni odgovor na niske razine stresa),
- ima imunosupresivno djelovanje,
- utiče na metabolizam hranjivih tvari,
- djeluje negativno s tehnološkom aspekta proizvodnje fermentiranih mliječnih proizvoda.

Antibiotici u mlijeku ispoljavaju inhibitorna svojstva prilikom upotrebe starter kultura, koje se koriste tokom fermentacije mlijeka, za dobijanje raznih fermentiranih proizvoda (jogurt, sir, kefir i dr.). Mnogim istraživanjima je utvrđeno da, koncentracija antibiotika već od 0,05 IU/ml mlijeka može u tehnološkom smislu izazvati čitav niz problema. Koagulacija mlijeka, ovisno o koncentraciji antibiotskih ostataka, produžuje se za 1 do 3 sata, ili posve izostaje

Preventivne mjere za smanjenje rezidua antibiotika

U tom smislu, važnu kariku u lancu proizvodnje zdravstveno ispravne hrane čine i farmeri i ostali subjekti u poslovanju, koji moraju poštivati pravila struke i dobre proizvođačke (poljoprivredne) prakse, kako bi se svi rizici od rezidua veterinarskih lijekova sveli na minimum. Prateći opšti trend prilagođavanja legislativi Evropske unije i BiH propisi o reziduama nisu iznimka, što je još jedan korak dalje za svrsishodnu i efikasnu zaštitu zdravlja potrošača.

Da bi garantovali da je mlijeko slobodno od bilo kakvih rezidua antibiotika sprovode se sistematske mjere i podržavaju od strane državnih organa, međunarodnih organizacija i na kraju od strane industrije mlijeka i samih proizvođača. Kvalitetno gazdovanje u pristupu sprečavanja rezidua

antibiotika u proizvodnji mlijeka na farmama počinje od sirovog mlijeka i ide do krajnjeg proizvoda.

Kvalitet kontrolnog sistema u industriji mlijeka u svrhu kontrole rezidua antibiotika, u osnovi se zasniva na dva principa:

- 1) Procjena kvaliteta mlijeka na farmi od koje zavisi cijena što ima direktan uticaj na proizvođače mlijeka.
- 2) Procjena dovezenog mlijeka u fabriku mlijeka prije istovara u cisterne. Dalje kontrole pri preradi mlijeka mogu se vršiti na nivou cisterne ili za vrijeme prerade. Krajnji proizvodi također podliježu kontroli od strane mljekarske industrije i državnih inspekcijskih službi. Ovi sistematski načini kontrole u toku procesa proizvodnje od sirovog mlijeka do krajnjih proizvoda ("od paše do čaše") trenutno su utvrđeni i primjenjuju se u većini mljekarskih industrija razvijenih zemalja.

Analitičke tehnike za određivanje rezidua veterinarskih lijekova u hrani

Rezidue veterinarskih lijekova u namirnicama animalnog porijekla stvorile su potrebu njihovih dokazivanja u mesu, mlijeku, jajima i drugim biološkim supstratima. Poznato je više metoda dokazivanja prisustva i količine lijekova u namirnicama životinjskog porijekla, a najvažnije su:

Mikrobiološke metode koje su prikladnije za rutinski rad, jer ne zahtijevaju skupu i komplikovanu opremu, a dovoljno su osjetljive. Mikrobiološke metode detekcije antimikrobnih (inhibitornih) materija su vrlo raširene u praksi, jer su relativno brze, jednostavne za izvođenje, ne zahtijevaju skupu opremu i daju pouzdane rezultate. Zajednička osobina svih mikrobioloških analiza je inhibicija rasta test mikroorganizma u prisustvu inhibitora. Test se može izvoditi u čvrstim i tečnim hranjivim podlogama. Testovi na čvrstim podlogama se zasnivaju na difuziji inhibitora u podlogu zasijanu test mikroorganizmom, a kao test mikroorganizmi najčešće se koriste: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus subtilis* var. *mycoides* ATCC 9634, *Sarcina lutea* ATCC 9341, *E. coli* i drugi.

Hemijske i fiziko-hemijske metode i pored svoje osjetljivosti nisu našle veću primjenu u praksi iz razloga što zahtijevaju veoma skupu opremu, složene

su za izvođenje i sporije u odnosu na mikrobiološke. Generalno, hemijske metode nisu dovoljno specifične, jer se pri njihovom izvođenju mogu javiti nespecifične reakcije sa nekim sastojcima tkiva ili ostacima drugih hemijskih materija.

Mnogo više se koriste fiziko-hemijske metode kolorimetrije, spektrofotometrije, tankoslojne hromatografije (TLC), gasne i tečne hromatografije (HPLC). Postoji i metoda florescencije koja se može uspješno koristiti kod detekcije tetraciklina, pri kojoj se kao izvor svjetlosti koristi UV lampa.

Enzimsko-imunološki testovi - svaka imunološka tehnika je zasnovana na metodama koje povećavaju osjetljivost analize. U zavisnosti od vrste obilježavanja, imunotehnike mogu biti: ELISA (imunoadsorpciona enzimska analiza), RIA (radioimunološka analiza), IRMA (imunoradiometrična analiza) i FPIA (imunoanaliza bazirana na fluorescentnoj polarizaciji).

3.3. LITERATURA

1. Amvrazi, E.G. (2011): Fate of Pesticide Residues on Raw Agricultural Crops after Postharvest Storage and Food Processing to Edible Portions. From the edit volme: *Pesticides - Formulatiione, Effects, Fate*, 575-589.
2. Attallah, E.R., Barakat, D.A., Maatook, G.R., Ashour Badawy, H.A. (2012.): Validation of a quick and easy (QuEChERS) method for the determination of pesticides residue in dried herbs. *Journal of Food Agriculture Environ.* 10, 755–762.
3. Bajwa, U., Sandhu, S. K. (2014): Effect of handling and processing on pesticide residues in food- a review. *Journal of Food Science and Technology* 51, 201-220.
4. Bavcon Kralj, M., Černigoj, U., Franko, M., (2007): Trebše, Comparison of photocatalysis and photolysis of malathion, isomalathion, malaaxon and commercial malathion-products and their toxicity studies, *Water Res.* 41, (19)4504–4514. DOI: [10.1016/j.watres.2007.06.016](https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.06.016)
5. Bericha, D., Begolli, B., Nuro, A., (2013): Study of Organochlorinated Pesticide Residues and PCBs in Vegetable and Fruit Samples from market in Peja- Kosovo. *ILIRIA International Rewiev* 3(2:409).
6. Beyene, J. (2016): Veterinary Drug Residues in Food-animal Products: Its Risk Factors and Potentia Effects on Public Health. *Journal od Veterinary Scence andi Technology*, Vo. 7, No 1, pp:1-7.
7. Bilandžić, N., Varenina, B., Solomun Kolanović (2010): Kontrola kloramfenikola u uzorcima mesa, mesnih proizvoda i ribe. *Meso*, Vo. XIII, No 3, pp: 161-166.
8. Bursić, V. (2011.): Optimizacija hromatografskih metoda i određivanje ostataka fungicida u plodovima krastavca. *Doktorska disertacija. Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu. Novi Sad.*
9. Chàfer-Pericàs, C., Maquieira, A., Puchades, R. (2010): Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples. *Trends in Analytical Chemistry* 29, 1038-1049.

10. Chang, Q., Wang, W., Regev-Yochay, G., Lipsitch, M., Hanage, WP. (2014): Antibiotics in agriculture and the risk to human health: how worried should we be? *Evolutionary Applications*, 8: 240-247.
11. Core, J. (2003.): Quechers method catches pesticide residues. *Agricultural research magazine*. 51: 7-9.
12. Coupe, R.H., Blomquist, J.D. (2004): Water-soluble pesticides in finished water of community water supplies, *Journal-American Water Works Association*. 96: 56–68.
13. Desalegne, A., Kelay, B, Girma, Z. (2014): Detection and determination of Oxytetracycline and Penicillin G antibiotic residue levels in bovine bulk milk from Nazareth dairy farms, Ethiopia. *Ethiop Vet. J.* 18: 1-15.
14. El-Saeid M., Selim M.T. (2016): Effect of Food processing on Reduction of Pesticide Residues in Vegetables. *Journal of Applied Life Sciences International* 8: 1-6.
15. Ergin-Kaya, S., Filazi, A. (2010): Determination of Antibiotic Residues in Milk Samples, Research article, *Kafkas Univ Vet Fak Derg, Ankara, Turkey*, page 31-35. DOI:10.9775/kvfd.2009.1174.
16. Hajšlova, J. (2014): Challenges to further increase effectiveness and throughput of food safety control: integration of pesticide residues and natural toxins analysis into a single run. *The World Mycotoxin Forum - 8th Conference, Mycotoxin control: the systems approach. Abstracts of lectures and posters*: 147. 9.
17. Halilović, E. (2015): Određivanje sadržaja pesticida u svježem i zamrznutom bobičastom voću. *Master rad, Poljoprivredno-prehrambeni fakultet, Univerzitet u Sarajevu*.
18. Đorđević, T., Đurović-Pejčev, R. (2016): Food processing as a means for pesticide residue dissipation. *Pesticides and Phytomedicine* 31: 89-105.
19. Jašić, M. (2009): "Bezbednost hrane i zdravlje ljudi" *Tehnološki fakultet Univerziteta u Tuzli, Univerzitetska 8, Tuzla*.
20. Jurić, A., Kukolj, E. (2010): Uticaj mutacija metil-transferaze NpmA na bakterijsku rezistenciju na antibiotike. *Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu*. pp; 5.
21. Keithmaleesatti, S., Varanusupakul, P., Siri Wong, W., Thirakhupt, K., Robson, M., Kitana, N. (2009): Contamination of organochlorine

- pesticides in nest soil, egg, and blood of the snail-eating turtle (*Malayemys macrocephala*) from the Chao Phraya River Basin, Thailand. *Proc World Acad Sci Eng Technol*, 40, pp 459-464.
22. Kohanski, M. A., Dwyer D. J., Collins J. J., (2010): How antibiotics kill bacteria: from targets to networks, *Nat Rev Microbiol.*, str. 423-435
 23. Kolanović-Solomun, B., Bilandžić, N., Đokić, M. (2011): Mehanizam djelovanja, biosinteza i identifikacija beta-laktamskih antimikrobnih lijekova, *Croat. J. Food Sci. Technol., Pregledni rad*, page 65-75.
 24. Lesueur, C., Maestroni, B. (2014.): Comparioson of QuEChERS-based methods for the analysis of 600 pesticides in common fruit and vegetables with GC-MS/MS and LC-MS/MS. 10th European Pesticide Residue Workshop. Dublin, Ireland, 30th June-3rd July. *Programme and book of abstracts*: 130. 11.
 25. Marković, S., Kos, B., Šušković, J., Bilandžić, N. (2014) Tetraciklinski antibiotici i određivanje njihovih rezidua u hrani. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* 9, 7-16.
 26. Maurya, P., K., Malik, D., S. (2016): Bioaccumulation of xenobiotics compound of pesticides in riverine system and its control technique: A critical rewiev. *Journal of Industrial Pollutjon Control* 32/2). pp 580-594
 27. Miloš, S. (2012.): Ostaci sredstava za zaštitu bilja i procjena rizika unošenja hranom. *Doktorska disertacija. Poljoprivredni fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Srtossmayera u Osijeku. Osijek.*
 28. Murati, T., Šimić, B., Kniewald, J., Pleadin, J., Kmetič, I. (2014): Organoklorovi insekticidi – mehanizam toksičnog djelovanja. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutritjon* 9,97-109.
 29. Panseri, S., Bjondi, P. A., Vigo, D., Communod, R., Chiesa, L. M. (2013): Occurrence of Organochlorine Pesticides Residues in Animal Feed and Fatty Bovine Tissue. *From Food Industry.*
 30. Saldanha, H., Sejerøe-Olsen, B., Ulberth, F., Emons, H., Zeleny, R. (2012): Feasibility study for producing a carrot/potato matrix reference material for 11 selected pesticides at EU MRL level: Material processing, homogeneity and stability assessment, *Food Chemistry, Volume 132, Issue 1*, 567-573.

31. Šarkanj, B., Kipčić, D., Vasić-Rački, Đ., Delaš, V., Galić, K., Katalenić, M., Dimitrov, N., Klapac, T. (2010): Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani, *Hrvatska agencija za hranu, Osijek*, 2010.
32. Šalković-Petrišić, M., Bradamante, V. (2010): Beta-laktamski antibiotici, *Medicinar, Katedra za farmakologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu*.
33. Velagić-Habul, E., Omanović-Miklićanin, E. (2011): Hemijska kontaminacija hrane, *Poljoprivredno-prehrambeni fakultet Univerziteta u Sarajevu Sarajevo, BiH*.
34. Vuković, G. (2012.): Određivanje ostataka pesticida u dečijoj hrani upotrebom gasne i tečne hromatografije sa masenom spektrometrijom. *Doktorska disertacija. Poljoprivredni fakultet. Univerzitet u Novom Sadu. Novi Sad*.
35. Vuković, G., Stereva, D., Bursić, V., Mladenova, R., Lazić, S. (2012a): Application of GC-MSD and LC-MS/MS for the determination of priority pesticides in baby foods in Serbian market. *LWT – Food Science and Technology*. 49: 312-319.

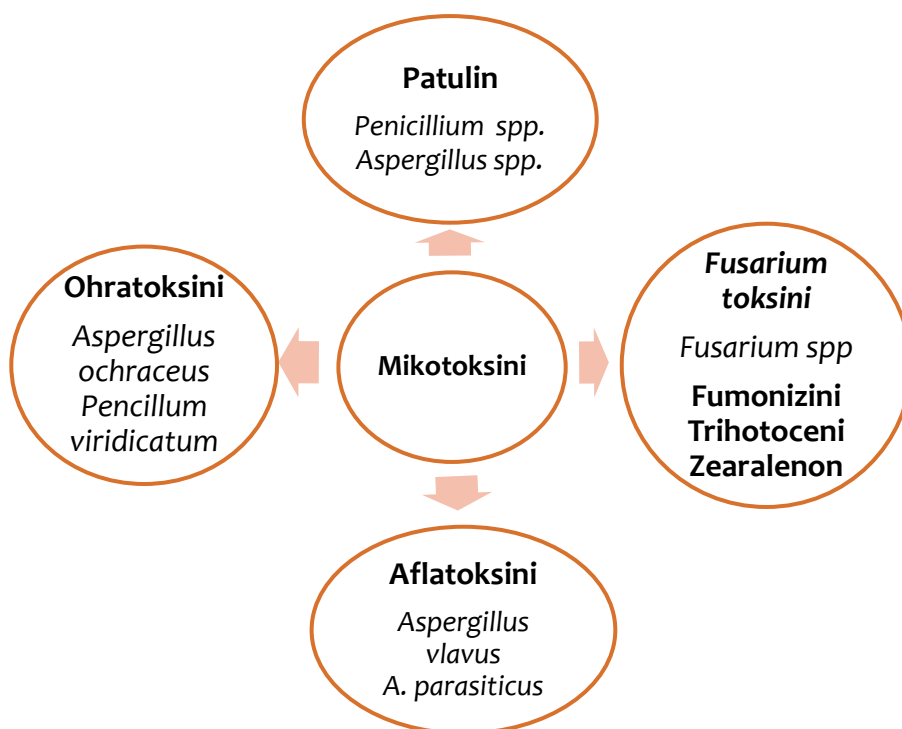
4. BIOLOŠKI TOKSINI

U današnjim, ekološki narušenim uslovima života, problem mikrobne kontaminacije hrane (namirnica), primarno patogenim mikroorganizmima, odnosno njihovim toksinima, kao i toksinima nekih vrsta plijesni, tokom čitavoga prehrambenoga lanca (od polja do stola), na svjetskom nivou poprima sve veći značaj. Razlog tome ježastija zdravlja u ljudi i životinja, zaštita ekonomije i trgovine, uz dosljedno pridržavanje zakonske regulative. Najznačajniji biološki rizici, koji su povezani s takvom hranom obuhvaćaju toksikotvorne bakterije i njihove toksine, te fungalne toksine.

4. 1. MIKOTOKSINI

Mikotoksini su sekundarni metaboliti većeg broja saprofitskih plijesni koji u organizam životinja i ljudi najčešće dospijevaju putem kontaminirane hrane infestirane sporama konidijama i/ili fragmentima micelijuma. Tokom hranjenja, plijesni ispuštaju enzime u hranjivu masu radi razgradnje složenih sastojaka u jednostavnije, koji su pogodniji za probavu. Probavljeni nutrijenti koriste se za stvaranje primarnih i sekundarnih metabolita. Primarni metaboliti sadrže celulozu i druge sastojke koji se iskorištavaju za rast i reprodukciju plijesni, a sekundarni metaboliti, mikotoksini, koriste se za odbranu od drugih mikroorganizama, uključujući i druge plijesni.

Danas je poznato više od 400 vrsta mikotoksina, ali njihov broj se stalno povećava. Plijesni koje imaju značaj za prehrambenu industriju, zbog potencijalne proizvodnje mikotoksina, uključuju najinteresantnije članove rodova: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* (Slika 16), čije su vrste potencijalni proizvođači aflatoksina, ohratoksina, zearalenona, trihotecena, patulina i drugih toksičnih metabolita.



Slika 16. Plijesni i njihovi mikotoksini koji su od značaja za prehrambenu industriju

Organizacija za hranu i poljoprivredu (eng. *Food and Agriculture Organizatjon*; FAO) procijenila je da je, na globalnom nivou, 25% usjeva u konačnici namijenjenih prehrani ljudi ili hranidbi životinja onečišćeno mikotoksinima. Procjenjuje se da ekonomski gubici izazvani kontaminacijom mikotoksinima iznose na stotinu milijardi dolara.

Biosinteza mikotoksina ovisi o: vrsti toksikotvorne plijesni, klimatskim i okolišnim uslovima, fizikalno-hemijskim faktorima: temperaturi (od -5 do 60°C), sadržaju vode u namirnici (13% i više), aw-vrijednosti (iznad 0,65), pH-vrijednosti (od 3 do 9), koncentraciji gasova u atmosferi i sastavu namirnice. Mikotoksini u prehrambeni lanac mogu ući:

- *direktnim putem*, konzumiranjem namirnica biljnog i/ili životinjskog porijekla (Slika 17), kontaminiranih toksinima tokom neadekvatnog tehnološkog procesa proizvodnje ili skladištenja, i

- *indirektnim putem*, konzumiranjem namirnica animalnog porijekla (meso i proizvodi od mesa, jaja i proizvodi od jaja, riba, školjke, rakovi i njihovi proizvodi, mlijeko i proizvodi od mlijeka), kontaminiranih toksinima preko hrane za ishranu pojedinih životinja.



Slika 17. Put kontaminacije stočne hrane mikotoksinima

Pored navedenog, ne smije se zaboraviti značaj kvaliteta sirovine ili dodataka za proizvodnju neke namirnice, odnosno upotrebe isključivo onih sirovina u kojima nisu konstatovane rezidue toksina, čak ni u minimalnim koncentracijama. Jedino sirovina takvog kvaliteta može biti uslov proizvodnje zdravstveno bezbjedne namirnice.

Plijesni mogu rasti i proizvoditi mikotoksine na plodovima prije žetve, nakon žetve, tokom procesuiranja i skladištenja. Prisustvo "poljskih" plijesni zavisi od primijenjenih agrotehničkih mjera, i klimatskih uslova pojedinih godina, ali prije svega od primijenjenih mjera tokom ubiranja ljetine. Sa duge strane, zabrinjava značajno prisustvo "skladišnih" plijesni koje ukazuju na greške u manipulaciji i neadekvatne uslove skladištenja.

Kada se govori o mikotoksinima, neophodno je napomenuti da se radi o metabolitima izuzetno otpornim na različite tretmane, tako da se mogu naći i u gotovom proizvodu. Od posebnog značaja je njihova otpornost prema dejstvu temperatura, kako visokih, koje se upotrebljavaju u prehrambenoj industriji (režim pasterizacije, režim sterilizacije), tako i niskih (hlađenje, smrzavanje), uslijed čega se njihova struktura ili ne razara uopšte ili je razgradnja samo djelimična. Često 1 do 2% mase proizvoda sadrži mikotoksine iznad dopuštene količine, tako da samo reprezentativan uzorak može otkriti mikotoksine i smanjiti rizik od greške

pri određivanju u seriji ili lotu. Kombinacija više toksina predstavlja izrazit problem kod detekcije mikotoksina kao i kod praćenja efekata koji oni izazivaju u organizmu ljudi i životinja.

Uzimajući u obzir da žitarice predstavljaju osnovni izvor ugljenih hidrata u ishrani ljudi širom cijele planete one su i osnovni izvor mikotoksina u hrani za ljude. Cerealije se veoma lako infestiraju gljivicama u različitim fazama proizvodnje i skladištenja. Kukuruz se smatra najzagađenijom žitaricom mikotoksinima, zatim su tu šećerna trska, pirinač, ječam i pšenica, a od sjemenja uljarica kikiriki, soja i suncokret. Treba napomenuti da se mikotoksini mogu pronaći i u vinu, pivu, voću, povrću, kafi i kakau, začинима (Sinovec i sar, 2006)

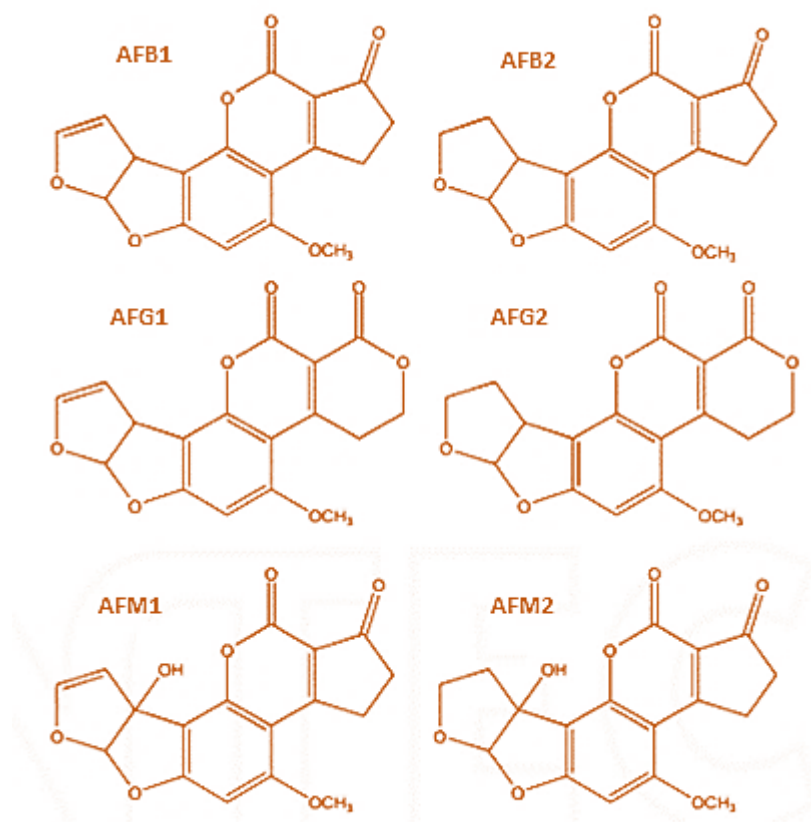
S obzirom da ne postoje limiti mikotoksina u hrani koji bi kontaminiranu hranu označili kao potpuno bezbjednu potrebno je poznavati osnovne namirnice koje najčešće mogu biti izvor intoksikacije. Takve namirnice često organoleptički izgledaju kao potpuno ispravne te se zato mikotoksini i nazivaju "hladnokrvne ubice".

Iz svega naprijed navedenog proizilazi da je neophodno da se, pri procjeni kvaliteta hrane i uticaja na proizvodne rezultate, promjena hranljive vrijednosti hrane kao posljedica kontaminacije plijesnima uzme u obzir zajedno sa ostalim faktorima. Iako se glavna uloga negativnog uticaja hrane vezuje za štetne efekte mikotoksina, mnogo objektivniji pristup je da se oba faktora – promjena hranljive vrijednosti i prisustvo mikotoksina – razmatraju zajedno.

4. 1. 1. AFLATOKSINI

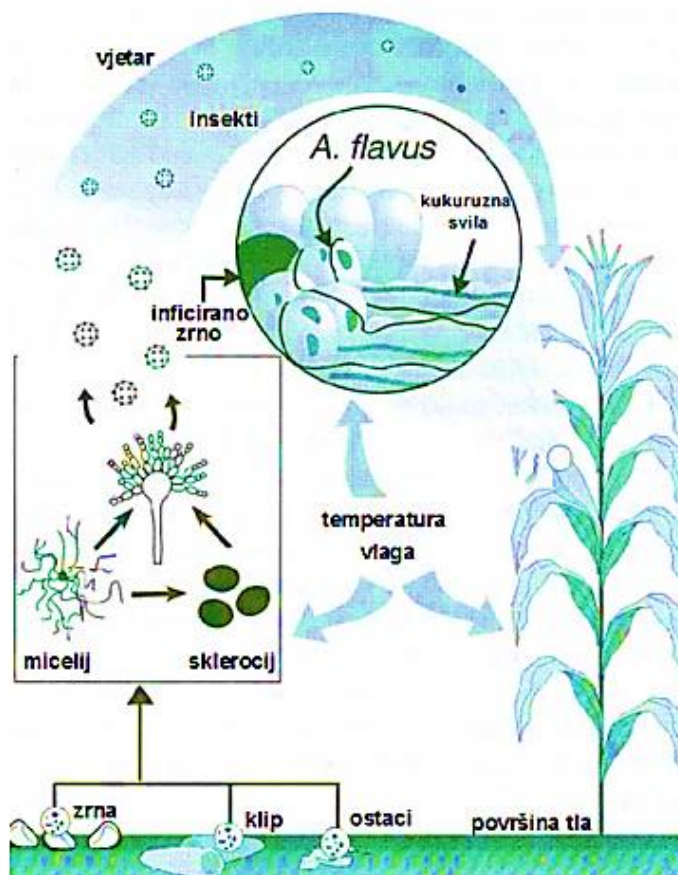
Aflatoksini su veoma toksični, kumarinski derivati, koje uglavnom biosintetišu *Aspergillus flavus* i *Aspergillus parasiticus*. Iako su relativno kasno, tek 1960-tih godina započela istraživanja, aflatoksini su skupina najistraživanijih mikotoksina. Najvažniji mikotoksin i (Slika 18) iz ove grupe su aflatoksin B1 (AFB1), aflatoksin B2 (AFB2), aflatoksin G1 (AFG1) aflatoksin

G2 (AFG2). Aflatoksini B2 i G1 su dihidroderivati aflatoksina B1 i G1, dok su aflatoksini M1 i M2 dihidroderivati aflatoksina B1 i B2.



Slika 18. Hemijske strukture najvažnijih aflatoksina

A. flavus nastanjuje zračne dijelove biljke (listovi, cvijet) i proizvodi aflatoksine skupine B, dok se *A. Parasiticus* nalazi na dijelovima biljke bliže zemljištu i proizvodi aflatoksine i B i G skupine. Životni ciklus plijesni *A. Flavus* može se podijeliti u dvije glavne faze: kolonizaciju biljnih ostataka u zemljištu i infekciju usjeva. Na početku vegetacije, kada nastanu povoljni uslovi u okolišu, sklerocije i konidije, oblici micelija koji podnose nepovoljne zimske uslove, počinju klijeti i proizvoditi brojne konidiospore koje se prenose zrakom. Novi inokulum se širi pomoću insekata ili vjetrom kako bi započela kolonizacija i infekcija svježih posađenih kultura (Slika 19).



Slika 19. Životni ciklus plijesni *Aspergillus flavus* (Battilani i sar. 2012)

Zdravstveni rizici

Kao posljedica ingestije, aflatoksina, javljaju se različiti poremećaji zdravlja koji se po stepenu, karakteru i intezitetu ispoljavaju različito, a u zavisnosti od količine i vrste unijetog aflatoksina, dužine unošenja, opšteg stanja organizma, kao i starosne kategorije ljudi. Akutno trovanje aflatoksinima naziva se aflatoksikoza i nastaje konzumiranjem izrazito kontaminirane hrane gdje se dnevni unos aflatoksina mjeri u miligramima, pa su stoga dosta rijetke. Akutnu aflatoksikozu obilježavaju povraćanje, anoreksija, ascites i edem donjih ekstremiteta, te je primijećeno da se javlja 2 puta

češće kod muškaraca nego kod žena. Smrt nastupa naglo, a prethodi joj krvarenje iz probavnog trakta. Utvrđeno je da subletalne doze aflatoksina izazivaju perzistentne hepatitise koji traju i po nekoliko godina. Dugotrajna izloženost aflatoksinima, kroz hranu, smatra se važnim rizičnim faktorom za nastanak hepatocelularnog karcinoma, posebno u osoba izloženih hepatitisu B.

Međunarodna agencija za istraživanje raka klasificirala je 4 aflatoksina (aflatoksin B₁, B₂, G₁, G₂) u Grupu 1 karcinogena, dok je aflatoksin M₁ klasificiran kao mogući karcinogen u ljudi (Grupa 2B).

Pojavljivanje u hrani

Aflatoksini, zbog njihove izrazite toksičnost, i učestale prisutnosti u brojnim žitaricama, te namirnicama životinjskog porijekla predstavljaju najveći rizik u prehrambenom lancu, budući da onečišćena krmiva koje se koriste u hranidbi životinja sa farmi predstavljaju glavni izvor AFB₁.

Putem hrane, ljudi su najčešće izloženi dejstvu aflatoksina na tri načina:

- Ingestijom namirnica biljnog porekla (pretežno kukuruza i kikirikija) kontaminiranih aflatoksinom (pretežno AFB₁);
- Ingestijom kontaminiranog mlijeka i mliječnih proizvoda uključujući sir i mlijeko u prahu (pretežno AFM₁) i
- Ingestijom rezidua aflatoksina iz mesa i proizvoda od mesa, kao i jaja (u manjem obimu od prethodna dva načina).

Do onečišćenja sa AFB₁ može doći tokom žetve, transporta i skladištenja žitarica i proizvoda, kao i prilikom neprimjerenog rukovanja usjevima nakon žetve. Ranija istraživanja ukazuju na to da pojava onečišćenja sa AFB₁ u značajnoj mjeri ovisi o regiji u kojoj se žitarice uzgajaju. Utvrđeno je da na stvaranje aflatoksina u različitim biološkim materijalima utječu faktori poput: temperature, pH, vrste supstrata, sadržaja vlage u supstratu, vrijednost aktiviteta vode, prisutnosti aflatoksikogenih plijesni, prisutnosti mineralnih materija, te mehaničkog oštećenja zaštitne ovojnice zrna. Primjera radi, optimalna aktivnost vode (aw), za razmnožavanje plijesni i stvaranje aflatoksina je 0.99, a u uslovima niske aktivnosti vode (0,83)

samo je utvrđeno stvaranje aflatoksina B₁. U novijim ekološkim studijama, izvedenim sa *Aspergillus flavus*, izolovanim iz kukuruza utvrđeno je da se ova plijesan najbolje razmnožava pri temperaturama 25°C i 30°C, a aflatoksin B₁ stvara pri temperaturi od 25°C.

Žitarice se mogu kontaminirati za vrijeme vegetacije, uskladištenja i prerade. U razdoblju prije žetve, najveći rizik za razvoj aflatoksina je u vrijeme ekstremne suše. Kada je temperatura zraka visoka, a istovremeno vlažnost zemljišta je ispod normalne granice, u zraku se povećava broj spora gljivica *Aspergillus*, koje „uđu“ u biljku na mjestima oštećenja uzrokovanih insektima i/ili ekstremnim vremenskim uslovima. Infekciji pogoduje: stres biljke, visoka temperatura (25-38°C), visoka relativna vlaga zraka (80-90%), oštećenja zrna insektima u polju i skladištu. Osjetljivija su krupnija i oštećena zrna (mehaničko oštećenje, oštećenja od parazita (insekata) i ptica. Kontaminaciji zrna pogoduje i deficit minerala u toku razvoja, neprimjerena vlaga i toplota tokom rasta i zrenja.

Žitarice kod kojih plijesni nisu vidljive mogu da sadrže visok nivo aflatoksina. Visoka vlažnost i temperatura u silosima pogoduju stvaranju aflatoksina tokom skladištenja. Općenito, usjevi uskladišteni duže od nekoliko dana potencijalni su izvori rasta plijesni, a time i nastanka mikotoksina, a na prvom mjestu podložnosti onečišćenju aflatoksinima su kukuruz i proizvodi od kukuruza.

Aflatoksini su stabilni hemijski spojevi koje postupci prerade hrane uglavnom ne mogu uništiti, a s obzirom da su žitarice čest izvor AFB₁ posljedično su onečišćeni i gotovi proizvodi na bazi žitarica. Međutim, onečišćenje aflatoksinima ponekad je i neizbježno, što nameće potrebu za uvođenjem pogodnih postupaka prerade hrane i hrane za životinje kojima bi se mogao inaktivirati toksin. U tabeli 21. su predstavljeni nivoi aflatoksina u nekim vrstama hrane.

Tabela 21. Pregled pojave aflatoksina (AFs)(*Pleadin i sar., 2017*)

Vrsta robe	N/Np	$\bar{x} \pm SD$	Proizvodnja
Sirovo mlijeko	647/558	0,308±0,356	2013
Toplotno tretirano mlijeko	389/343	0,144±0,114	2013
Organsko mlijeko	6/6	0,026±0,018	2013
Infant formula	22/1	0,020	2013
Komercijalni bijeli sir	23/10	0,110	2013
Tvrdi sir	10/10	0,640	2013
Sirovo mlijeko	79/30	0,035±0,013	2014
Toplotno tretirano mlijeko	165/71	0,024±0,012	2014
Jogurt	56/42	0,081±0,092	2013/14
Sladoled	21/14	0,071±0,061	2013/14
Bijeli sir	47/39	0,146±0,170	2013/14
Tvrdi sir	27/21	0,379±0,509	2013/14
Sirovo mlijeko	2695/1555	0,160±0,95	2015
Toplotno tretirano mlijeko	468/364	0,027±0,030	2015
Kukuruz (AFs/AFB ₁)	180/103	12,700±17,300	2015
Razne žitarice za doručak	54/6	0,100±0,0400	2015
Sirovo mlijeko	3646/3094	0,069±0,120	2016
Toplotno tretirano mlijeko	765/753	0,039±0,020	2016
Infant formula	349/23	0,011±0,003	2015/16
Mlijeko u prahu	94/25	0,018±0,010	2015/16
Mliječni napici	58/13	0,034±0,040	2015/16

N- broj uzoraka; NP- Broj pozitivnih uzoraka; SD- standardna devijacija

Imajući u vidu činjenicu da je u dijelovima svijeta u kojima vlada tropska ili suptropska klima rizik od onečišćenja AFB₁ općenito prepoznat kao visok, dominantan je nadzor nad AFB₁ u krmivima kao što su kukuruz, pogače kikiriki i suncokret, ekstrahirani kopar, gluten porijeklom iz kukuruza, rižine

posije, sjeme pamuka, ljuske palme i sojino zrnje, uvezenim iz trećih zemalja, za koje je utvrđeno da su glavni izvori AFB₁.

Aflatoksini u mlijeku

U mlijeku krava hranjenih hranom, onečišćenom aflatoksinom B₁(AFB₁), može se nalaziti aflatoksin M₁ (AFM₁) poznati hepato-kancerogeni spoj AFM₁, metabolit AFB₁, koji je produkt biološke transformacije u mikrosomima jetre, a izlučuje se u mlijeko kroz mliječne žlijezde sisavaca hranjenih krmom koja je sadržavala spomenuti aflatoksin B skupine. Dakle, prisustvo mikotoksina u mlijeku i proizvodima od mlijeka (Tabela 22) je ozbiljan problem bezbjednosti hrane, prije svega za novorođenčad i djecu koji su najosjetljiviji na mikotoksine, a ujedno i najizloženiji ovom izvoru trovanja.

Tabela 22. Količine aflatoksina u nekim mliječnim proizvodima (Miličević, 2017)

Vrsta robe	N/Np	$\bar{x} \pm SD$	Proizvodnja
Infant formula	349/23	0,011±0,003	2015/16
Mlijeko u prahu	94/25	0,018±0,010	2015/16
Mliječni napici	58/13	0,034±0,040	2015/16

Istraživanjima, provedenim s ciljem ispitivanja količine mikotoksina u sirovom mlijeku, dokazano je da su prisutne veće količine AFM₁ u mlijeku skupljenom tokom zime, u odnosu na mlijeko koje se skuplja tokom ljeta (Tabela 23). Viši nivo kontaminacije mlijeka, aflatoksinom AFM₁, tokom zimskog perioda može se objasniti, time, da su zimi krave hranjene krmom koja je mogla biti kontaminirana mikotoksinima, kako u polju prije ili tokom žetve, tako i u transportu, te tokom skladištenja. S druge strane, niska učestalost kontaminacije uzoraka mlijeka sa AFM₁, vjerovatno se odnosi na

činjenicu da su krave bile više na ispaši i hranile se zelenom travom. Uopšteno, AFM₁ može se dokazati u mlijeku 12 do 24 sata nakon konzumacije aflatoksinom B₁, a najviše se koncentracije dostižu nakon nekoliko dana. Nakon prestanka unosa AFB₁ u organizam, koncentracija aflatoksina M₁ se smanjuje unutar 72 sata do količine kada se više ne može dokazati. Mnogi istraživači su objavili da postoji linearna veza između količine AFM₁ u mlijeku i AFB₁ u krmivu.

Tabela 23. Koncentracija AFM₁ u uzorcima sirovog mlijeka (Markov i sar., 2010)

Godišnje doba	Broj uzoraka	Pozitivni uzorci		AFM ₁ (ng/L)		
		n	%	n	%	Raspon
Ljeto	30	24	80	9	37,5	0,17-4,3
				11	45,83	5,40-9,89
				2	8,33	10,55 – 11,33
				2	8,33	26,47 -36,52
Zima	30	28	93,33	7	25,0	8,84 -17,5
				17	60,71	21,62 - 42,17
				3	10,71	53,57 – 59,12
				1	3,57	87,8
Ukupno	60	52	86,66			

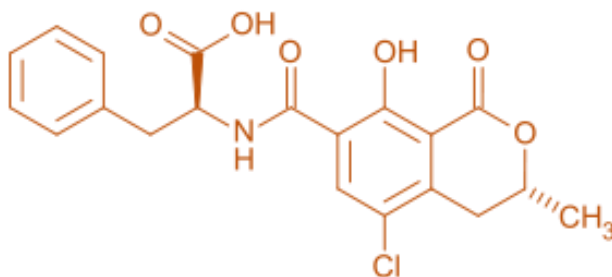
Aflatoksina M₁ je neravnomjerno raspoređen između surutke i grude kao posljedica njegovog vezivanja za proteine mlijeka, uglavnom kazein. Najveća koncentracija ovog mikotoksina je u grudi (približno 60%), bez obzira na postupak proizvodnje sira. Koncentracija aflatoksina M₁ je 2,5 do 3,3 puta veća u mekim sirevima, i 3,9 do 5,8 puta veća u tvrdim sirevima, nego u mlijeku od kojeg su sirevi proizvedeni. Prema tome, koncentracija aflatoksina M₁ u siru zavisi od tipa sira, sadržaja vode u siru i postupka proizvodnje sira.

Aflatoksin M1 je otporan na režime toplotne obrade koja se koristi pri preradi mlijeka u proizvode. U pasterizovanom mlijeku, *gotovo da ne dolazi do smanjenja koncentracije aflatoksina M1*. Utvrđeno je neznatno smanjenje aflatoksina M1, u sterilizovanom mlijeku, nakon dužeg skladištenja. Većina zemalja je uspostavila granicu za aflatoksin M1 u siru od 0,25 µg/kg, što odgovara pretpostavci da je sir napravljen od mlijeka, koje je u skladu sa propisima (npr.: kontaminacija mlijeka na nivou ispod 0,05 µg/kg), a da se pri tome, zbog dehidracije, koncentracija aflatoksina M1 poveća do 5 puta. U Italiji da bi zaštitili proizvodnju parmezana granica za aflatoksin M1 je postavljena na 0,45 µg/kg tvrdog sira.

4. 1. 2. OHRATOKSINI

Ohratoksini su metaboliti koje sintetiziraju neke vrste plijesni iz roda *Aspergillus* (*A. ochraceus*, *A. melleus*, *A. ostianus*, *A. sulphurues*). Kao potencijalni proizvođači ohratoksina, također, se navode *Pencillium* vrste (*P. viridicatum* *P. aurantiogriseum*). Neki autori navode da ove metabolite mogu biosintetisati i crne gljive roda *Aspergillus* (*A. niger* i *A. carbonarius*) kao i *A. albertensis*, *A. auricomus* *A. wentii*. Kako su ove vrste plijesni jako raširene, mogućnost kontaminacije ohratoksinima je velika.

Ohratoksine čine ohratoksin A (OTA), ohratoksin B (OTB), ohratoksin C (OTC), 4-hidroohratoksin A i ohratoksin α. Iz ove grupe najznačajniji i najtoksičniji je ohratoksin A (Slika 20).



Slika 20. Hemijska struktura ohratoksina A.

Ohratoksin A ima široku rasprostranjenost, obzirom da se kontaminacija ovim mikotoksinom može desiti u područjima veoma toplih i vlažnih klimatskih uslova, kao i u područjima gdje vladaju niske temperature. *A. Ochraceus* sintetizira ovaj mikotoksin pri temperaturama od 12°C do 37°C i a_{aw} 0,80 (81) dok psihrofilne *Penicillium spp.* mogu proizvoditi OTA pri temperaturama od 4°C do 31°C.

Zdravstveni rizici

Ohratoksin A se smatra nefrotoksičnim, teratogenim i imunotoksičnim, te je od strane IARC klasificiran kao mogući kancerogen za ljude (Grupa 2B). Sumnja se da je njegovo prisustvo odgovorno za nastanak fatalne bolesti koja nosi naziv Balkanska Endemska Nefropatija (BEN), a javlja se u područjima jugoistočne Europe, tačnije u ruralnim područjima Hrvatske, Bosne i Hercegovine, Srbije, Bugarske i Rumunije. Procijenjeno je da približno 20.000 ljudi, ili pati od navedene bolesti, ili se sumnja da je oboljelo od iste. Glavne karakteristike i simptomi ove teške bolesti su primarno hronična lezija bubrežne kore ili korteksa, tubularna degeneracija, intersticijalna (međuprostorna) fibroza i hijalinizacija glomerula.

Kod velikog broja eksperimentalnih životinja utvrđena je embriotoksičnost i teratogenost ovog mikotoksina. OTA inhibira sintezu proteina kod prokariota i eukariota, utiče na glukoneogenezu, transportni lanac u mitohondrijama i respiraciju.

Pojavljivanje u hrani

Kontaminacija ohratoksinom A uglavnom se odnosi na žitarice i njihove proizvode, uključujući hranu i piće za ljudsku upotrebu. Detektovan je u kukuruzu, pšenici, zobi pasulju, kikirikiju, voću, povrću, vinu, pivu koji imaju gljivične infekcije, kao i u siru i mesnim proizvodima kod životinja koje su konzumirale hranu kontaminiranu ohratoksinima. Obzirom da se svinjska krv i plazma, kao i različite vrste začina koriste u pripremi kobasica, ovi proizvodi, također, mogu sadržavati OTA.

Vino, nakon žitarica, smatra se drugim najvažnijim izvorom ljudske izloženosti OTA. Crvena vina su često više kontaminirana ovim miktoksinom u odnosu na desertna, bijela i roze vina. Te razlike se objašnjavaju tehnologijama proizvodnje vina, proizvodnim područjima (Tabela 24) i vremenskim uslovima tokom uzgoja grožđa.

Iako se ovaj mikotoksin pojavljuje u hrani širom svijeta, glavna područja od interesa su Evropa, a za neke namirnice Afrika. *A. ochraceus* je pronađen u osušenoj hrani kao što su osušena i dimljena riba, osušenom voću, soji, grašku, grahu, i orašastim plodovima. Žitarice se mogu kolonizirati i *Aspergillus* i *Penicillium* plijesnima koje usjeve napadaju uglavnom nakon žetve. Obzirom da su glavni abiotički faktori koji utječu na rast ovih plijesni i proizvodnju OTA dostupnost vode i temperatura, žitarice, nakon žetve, treba brzo sušiti i nivo vlage tokom skladištenja održavati na nivou od 14,5%.

Tabela 24. Nivoi OTA u američkim vinima prema proizvodnim područjima (De Jesus i sar., 2018)

Država	Regija	> LOQ (%)	$\bar{X}$ $\mu\text{g L}^{-1}$	Raspon ¹ $\mu\text{g L}^{-1}$
Kalifornija (24)	Središnja obala (2)	21 (87,5%)	1,0	0,3-2,1
		2 (100,0%)	0,9	0,7-1,1
	Središnja dolina	3 (75,0%)	1,0	0,6-1,4
	(4)	16 (88,9%)	1,0	0,3-2,1
Kansas (1)	Sjeverna obala (18)			
		1 (100,0%)	1,4	≤1,4
Sjeverna Karolina (1)		1 (100%)	1,0	≤1,0
Njujork (3)		1 (33,3%)	0,5	≤0,5
Oklahoma (2)		1 (50%)	8,6	≤8,6
Oregon (3)		2 (66,7%)	1,4	1,3-1,5
Vašington (3)		3 (100%)	0,9	0,6-1,1

¹ Za regije sa samo jednim vinom iznad LOQ-a, daje se samo ta izmjerena koncentracija (kao maksimalna koncentracija).

Jugoistočna Španija, jugoistočna Francuska, jugoistočna Italija i Grčka su identificirani kao područja viškog rizika. Vina koja duže fermentiraju obično sadrže niže koncentracije OTA. Sirće koje je proizvedeno od grožđa također je često kontaminirano sa OTA-om. Dakle, glavni put unosa kod ljudi je preko kontaminiranih žita, te lješnika, riže, kafe, ali i preko proizvoda od mesa.

FAO/WHO (engl. *Food and Agriculture Organization/World Health Organization*) ekspertski komitet za dodatke u hranu su ustanovili nedeljni tolerantni nivo unosa OTA od 100 ng/kg TM. Radna grupa nordijskih zemalja i Naučnog komiteta za hranu propisali su znatno manji unos ovog mikotoksina od 5ng/kg TM.

4. 1. 3. FUZARIUM TOKSINI

Fusarium toksini predstavljaju sekundarne metabolite vrste roda *Fusarium*, koji često napadaju žitarice uzrokujući bolesti poput paleži klasa pšenice i ječma i truleži klipa kukuruza. Ovim gljivicama su potrebne niže temperature za rast i proizvodnju mikotoksina nego *Aspergillus* vrstama, te je stoga *Fusarium* mikotoksikoza povezana s kontaminacijom žitarica u zemljama sa umjerenom klimom.

Do danas je izolirano oko 150 mikotoksina iz roda *Fusarium*, među kojima su najznačajniji:

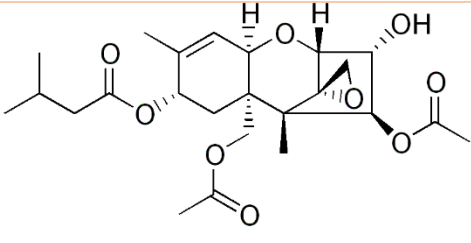
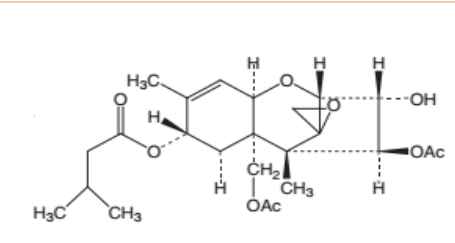
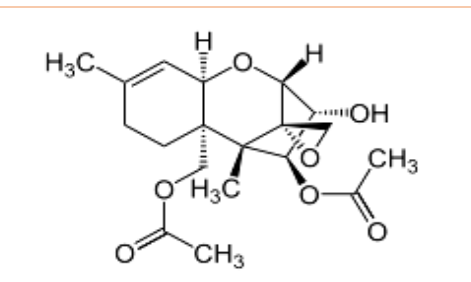
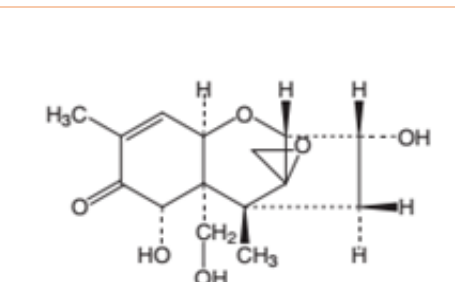
- trihoteceni
- fumonizini
- zearalenon

Trihoteceni

Trihoteceni su najveća grupa mikotoksina iz skupine *Fusarium* toksina. Prvi put su izolirani iz *Trchothecium roseum* 1949. godine. Za rast *Fusarium* spp. i biosintezu trihotecena pogoduje visoka vlažnost i niže temperature (21°C). Na osnovu hemijske strukture moguće ih je podijeliti u četiri grupe: A, B, C

i D. U hrani su najčešće zastupljeni trihoteceni tipa A i tipa B, koji su značajni i sa toksikološkog stajališta. Od trihotecena tipa A (Slika 21) najznačajniji su T-2 toksin, HT-2 toksin, i diacetoksiscirpenol (DAS), dok tip B uključuje nivalenon (NIV) i vomitoksin/deoksinivalenon (DON), koji je i najviše proučavani mikotoksin. HT-2 toksin je metabolit T-2 toksina i najčešće se nalaze zajedno u kontaminiranoj hrani.

F. graminearum je najvažniji proizvođač DON-a, nakon čega slijedi *Fusarium culmorum*. Druge vrste kao što su *Fusarium sporotrichioides* ili *Fusarium langsethiae* također proizvode DON. Optimalna temperatura za rast i razvoj *Fusarium graminearum* je između 24 i 26°C, minimalna vrijednost a_w je 0,90, što znači da je dominantniji u toplijim područjima (Sjeverna Amerika i Kina), dok *F. Culmorum* (psihotrofični soj, optimalna temperatura za rast i razvoj 21°C) je zastupljeniji u hladnijim predjelima (sjeverna Evropa). Glavna vrsta odgovorna za proizvodnju T-2 toksina je *F. sporotrichioides*. Pojava ove plijesni je karakteristična za Aziju, Afriku, Južnu Ameriku, Evropu i Sjevernu Ameriku.

	
HT-2 toksin	T-2 toksin
	
DAS toksin	DON toksin

Slika 21. Hemijska struktura trihotecena

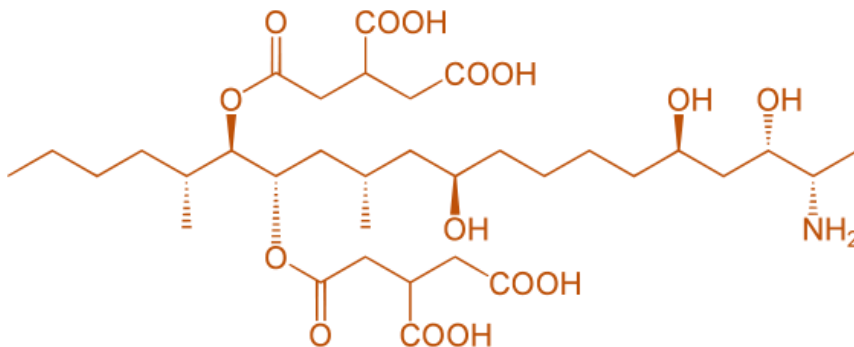
Zdravstveni rizici

Istraživanja su još nepotpuna, ali smatra se kako su trihoteceni hemotoksični i imunotoksični. T-2 toksin inhibira sintezu proteina, a u većim dozama DNK i RNK. Djelovanje T-2 toksina povezuje se s pojavom alimentarne toksične aleukije (značajno smanjenje broja leukocita).

Vomitoksin ili DON se smatra jednim od manje toksičnih trihotecena, ali je izrazito važan jer je odgovoran za kontaminaciju hrane i krmiva širom svijeta. Međunarodna agencija za istraživanje raka (IARC) klasificirala je DON u Grupu 3, jer nije pokazao kancerogeno djelovanje kod ljudi. Akutni sindrom karakteriziraju gastrointestinalni znakovi kao što su nelagodnost u stomaku, proljev, povraćanje i anoreksija. Najčešći klinički znakovi hronične izloženosti DON-u su gubitak težine i anoreksija. Međutim, osjetljivost i simptomi povezani s izlaganjem DON-u variraju ovisno o vrsti bolesti.

Fumonizini

Fumonizini su skupina ne-fluorescentnih mikotoksina, koji su otkriveni 1988. godine. Predstavljaju skupinu sekundarnih produkata metabolizma koje proizvode različite vrste plijesni iz roda *Fusarium* (*F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. nygamai*) kao i *Alternaria alternata* var. *lycopersici*. Do danas je izolirano 28 fumonizina koji su podijeljeni u 4 serije (A, B, C i P). U prirodi preovladava B serija fumonizina (B_1 , B_2 , B_3 i B_4) od kojih je Fumonizin B_1 (Slika 22) zastupljen do 70% od ukupnog nivoa fumonizina.



Slika 22. Hemijska struktura fumonizina B₁

Ovi mikotoksini su najčešće rasprostranjeni kao kontaminanti zrna žita, kao i hrane za ljude i životinje bazirana na žitaricama u Africi, Kini, Francuskoj, Indoneziji, Italiji, Filipinima, Južnoj Americi, Tajlandu i SAD-u. Detektovani su u kukuruzu, zobu, sirku, riži, brašnu, pšenični rezanci, slatkom krompiru, orasima, lješnjaku i nekim sirevima. U namirnicima životinjskog porijekla (jaja, meso i mlijeko) nisu pronađene količine koje bi imale značajan negativan efekat na zdravlje ljudi. Posljednjih godina se pojavljuju izvještaji o kontaminaciji evropskog, afričkog, azijskog, južno američkog kukuruza i životinjske hrane fumnozinom B₁ kao najčešćim uzrokom kontaminacije

Temperatura, vlažnost kao i oštećenja od strane insekata su glavni faktori koji utiču na infekciju *Fusarium spp.* i sintezu toksina. Najintenzivniji rast plijesni roda *Fusarium* odvija se pri relativnoj vlažnosti zraka većoj od 70% i temperaturi od 18°C do 24°C, a za aktivaciju enzima uključenih u sintezu toksina potrebna je niža početna temperatura.

Zdravstveni rizici

FB₁ uzrokuje regenerativnu hiperplaziju hepatocita i promotor je tumora uprkos značajnoj proapoptotičnoj aktivnosti. Iako su istraživanja na kulturama ćelija ukazivala na to da je oksidativni stres mehanizam genotoksičnosti FB₁, u novijim se istaživanjima došlo do zaključka da je

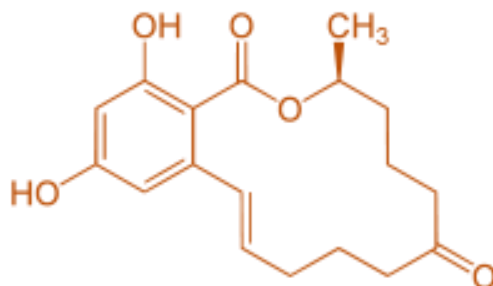
oksidativni stres posljedica, a ne uzrok toksičnosti FB₁. Izloženost mikotoksinu FB₁ povezuje se s povećanom učestalošću karcinoma jednjaka u južnoafričkoj pokrajini Transkei i u sjevernoj Italiji.

IARC je zbog nedovoljnih epidemioloških istraživanja na ljudima i zbog dovoljnih dokaza kancerogenosti za životinje. uvrstio FB₁ u skupinu mogućih kancerogenih spojeva za ljude (Grupa 2B). Nekoliko je studija izvijestilo da je FB₁ povezan s povećanom prevalencijom jednjaka i karcinoma jetre u ljudi. Štaviše, utvrđeno je da ovaj mikotoksin ima toksično djelovanje protiv nekoliko organa i aparata (nervnog i kardiovaskularnog sistema, jetre, pluća, bubrega) u životinja. Odgovori inducirani s FB₁ su specifični za vrstu i spol: na primjer, FB₁ može inducirati hepatokarcinomi nefrokarcinom kod štakora, ali nisu povezani s rakom jednjaka kod životinja. Kompleksni mehanizam djelovanja FB₁ zasniva se na inhibiciji sfingozin (sfinganin) N-acetiltransferaze (ceramidnasintaza). FB₁ je kompetitivni inhibitor u odnosu na oba supstrata ceramidsintaze.

Zearalenon

Zearalenon (ZEA), nekad zvan F-2 toksin (Slika 23), je nesteroidni estrogenski mikotoksin. U posljednje vrijeme privukao je pažnju usljed zabrinutosti da okolišni estrogenski imaju potencijal, odnosno mogućnost da poremete funkciju seksualnih steroidnih hormona. Nastaje metabolizmom plijesni iz roda *Fusarium*, prvenstveno *F. graminearum* i nekih izolata *F. moniliforme*, *F. oxysporium*, *F. culmorum*, *F. tricinctum*, *F. avenaceum*, *F. equiseti*, *F. graminearum* i drugih, a prvobitno je izdvojen iz kulture *Giberellazeae*; spolnog stadija plijesni *F. graminearum*.

Redukcijski produkt zearalenona je zearalenol, koji ima dva stereo izomera; alfa i beta, od kojih je samo α -zearalenol prisutan u prirodi i četiri puta je aktivniji od zearalenona, dok je β -zearalenol samo neznatno aktivniji.



Slika 23. Hemijska struktura zearalenona

Zdravstveni rizici

Zearalenon i njegovi metaboliti poznati su po estrogenim i anaboličkim osobinama jer uzrokuju inhibiciju hipotalamusa i prednjeg režnja hipofize te atrofiju jajnika, sjemenika, prostate i sjemenskih vezikula, a smatra se da zearalenon djeluje i kao fungalni spolni hormon. Odgovoran je za morfološke i funkcionalne poremećaje reproduktivnih organa i oštećenje spolnih ćelija kod domaćih životinja što dovodi do hiper estrogenizma goveda, svinja i peradi, a najosjetljivije su svinje. Mehanizam djelovanja ZEA i njegovih derivata jest vezanje za estrogene receptore u citoplazmi stanica spolnih organa, pri čemu nastaje fiziološki odgovor ćelija sličan djelovanju prirodnog estrogena 17- β -estradiola čije se vezanje za receptore citosola uterusa inhibira. ZEA je hepatotoksičan, hematotoksičan i remeti proces koagulacije u štakora. Simptomi izloženosti ZEA su upala rodnice (vulvovaginitis), a u životinja koje nisu spolno zrele prolaps rektuma i rodnice. Kod muških životinja može uzrokovati atrofiju sjemenika i povećanje mliječnih žlijezda. Na pokusnim je životinjama dokazano da ZEA prolazi kroz placentu u fetus. Osim estrogenog djelovanja, ZEA inhibira lučenje folikulstimulirajućeg hormona (FSH) zbog čega potiskuje razvoj folikula ovarija i inhibira proces ovulacije te ima luteotropan efekat, pa izaziva retenciju žutog tijela, pseudotrudnoću i anestriju. Od strane IARC-a klasifikovan je kao kancerogen Grupe 3.

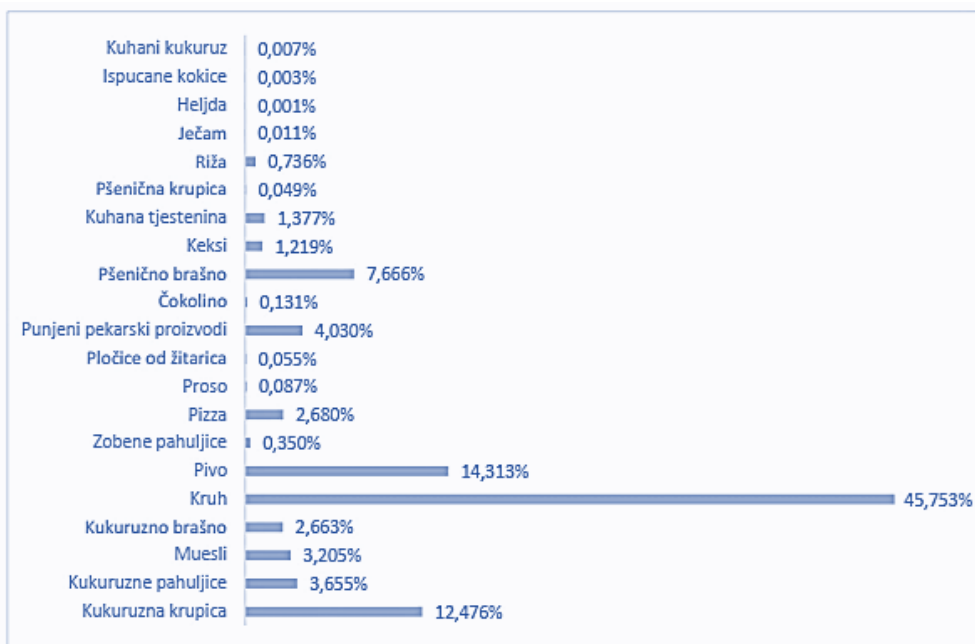
Pojavljivanje u hrani

Fusarium vrste su najčešće rasprostranjeni kao prirodni kontaminanti zrnja kukuruza, pšenice, ječma, raži, zobi, riže, soje i sezama, kao i u brokuli, hmelju i kupusu. Do kontaminacije dolazi na polju, ali se rast plijesni i formiranje toksina nastavlja i tokom skladištenja, osobito ako je ono neprikladno. Istraživanja su pokazala da problem kontaminacije *Fusarium* mikotoksinima nastaje posebno tokom kišne godine, karakterizirane značajnim temperaturnim promjenama.

Trihoteceni se nalaze u žitaricama: kukuruzu, pšenici, ječmu, ali su pronađeni i u soji, pivu, bananama, sjemenkama senfa, suncokretu. Mogu ući u hranidbeni lanac putem mlijeka, mesa i jaja, dobijenih od stoke koja je hranjena kontaminiranom hranom. Rizik izloženosti ljudi kroz potrošnju hrane animalnog porijekla, mnogo je manji od direktne konzumacije kontaminiranih zrna. Najvažniji izvor DON-a i njegovih derivata u prehrani je hljeb (45,75 %), zatim slijede pivo (14,31 %), kukuruzna krupica (12,48 %), pšenično brašno (7,67 %), dok kokice, kuhani kukuruz, heljda i ječam najmanje doprinose unosu DON-a i njegovih derivata (0,01 % i manje) (Grafikon 2).

Fumonizini su najčešće rasprostranjeni kao kontaminanti zrna žita, kao i hrane za bazirana na žitaricama u Africi, Kini, Francuskoj, Indoneziji, Italiji, Filipinima, Južnoj Americi, Tajlandu i SAD-u. Detektovani su u kukuruzu, zobi, sirku, riži, brašnu, pšenični rezanci, slatkom krompiru, orasima, lješnjaku i nekim sirevima. U namirnicima životinjskog porijekla (jaja, meso i mlijeko) nisu pronađene količine koje bi imale značajan negativan efekat na zdravlje ljudi. Posljednjih godina se pojavljuju izvještaji o kontaminaciji evropskog, afričkog, azijskog, južno američkog kukuruza i životinjske hrane fumnozinom B₁ kao najčešćim uzrokom kontaminacije.

Zearalenon i produkti njegova metabolizma karakteristični su za pšenicu, kukuruz, ječam, kikiriki, proizvode fermentacije kukuruza kao što je pivo, ali i u hrani životinjskog porijekla (mesu, mlijeku i sirevima). Obzirom da se ZEN može naći kako u žitu i proizvodima od žita, tako i u mlijeku, i dječija hrana može biti kontaminirana ovim mikotoksinom.



Grafikon 2. Doprinosi pojedinih vrsta hrane ukupnoj izloženosti DON-u i njegovim derivatima u srednjim vrijednostima koncentracija (HAH, 2018)

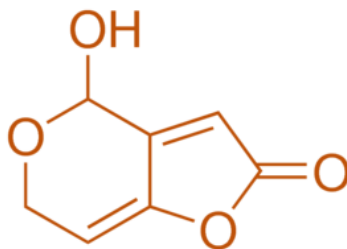
DON, ZEA i FUM se također, mogu naći i u plijesnima onečišćenoj silaži i stočnoj hrani. Nivo kontaminacije zavisi od metoda i uslova skladištenja, a varira u različitim geografskim područjima (Tabela 25) i klimatskim regijama, pod utjecajem formiranja plijesni, nivoa vlage, temperature, aeracije, prisustva insekata i mehaničkih oštećenja pohranjenih žitarica (Placintaet al., 1999; Pleadinet al., 2015). U namirnicima životinjskog porijekla nisu pronađene količine koje bi imale značajan negativan efekat na zdravlje ljudi.

Tabela 25. Mikotoksini iz roda *Fusarium* u hrani za životinje uzorkovani u različitim regijama Hrvatske tokom 2015. godine (*Pleadin i sar., 2017*)

Mikotoksin	Regija	N	% pozitivnih	$\bar{x} \pm SD$ ($\mu\text{g/kg}$)	Raspon pozitivnih ($\mu\text{g/kg}$)
DON	Centralna	18	82	3,112 $\pm$ 3,561	24,1-9,256
	Istočna	25	84	4,293 $\pm$ 4,591	27,3-13,407
	Zapadna	10	68	2,022 $\pm$ 2,897	46,2-9,302
	Sjeverna	24	72	2,625 $\pm$ 3,225	26,3-11,402
	Ukupno	77	77	3,013 $\pm$ 3,569	24,1-13,407
ZEA	Centralna	18	75	1,516 $\pm$ 2,011	8,2-9,431
	Istočna	25	71	1,214 $\pm$ 1,731	10,1-11,424
	Zapadna	10	56	1,112 $\pm$ 1,093	5,7-425
	Sjeverna	24	62	1,377 $\pm$ 1,735	7,1-4,546
	Ukupno	77	66	1,305 $\pm$ 1,643	5,7-11,424
FUM	Centralna	18	85	925 $\pm$ 1,231	33,1-5,612
	Istočna	25	82	1,138 $\pm$ 1,278	52,4-6,300
	Zapadna	10	72	631 $\pm$ 614	33,8-2,147
	Sjeverna	24	79	715 $\pm$ 856	40,7-4,793
	Ukupno	77	80	852 $\pm$ 995	33,1-6,300

4. 1. 4. PATULIN

Patulin (PAT) je otkriven 1943. godine. Molekula (Slika 24) je prvo ispitivana kao potencijalni antibiotik, ali naknadna istraživanja su pokazala njegova toksikološka svojstva. Proizvodi ga nekoliko vrsta *Aspergillus*, *Pencillium*, *Paecilomyces* i *Byssoschlamys*, među kojima je najrelevantniji *P. expansum*.



Slika 24. Hemijska struktura patulina

Gotovo, svi *P. expansum*, izolati su proizvođači patulina. Iako *P. expansum* može dobro da raste na 0 °C ili niže (-2/3 °C), brža sporulacija i rast micelije su uočeni kada je temperatura skladištenja postavljena na 20–25 °C.

Zdravstveni rizici

Zdravstveni rizici patulina za ljude uključuju akutne i hronične simptome i štetne efekte na ćelijskom nivou. Najčešće izaziva gastrointestinalne poremećaje. Uglavnom je njegovo dejstvo proučavano na štakorima gdje je pokazano da uzrokuje gubitak težine, promjene želuca i crijeva, kao i promjene u funkciji bubrega. Neka istraživanja su pokazala da patulin ometa sintezu DNK.

Pojavljivanje u hrani

U prirodi, patulin se češće nalazi u jabukama i proizvodima od jabuka (Tabela 26), jer su fizičko-hemijska svojstva plodova jabuke pogodna za rast *P. expansum*. Sa aktivnošću vode (*a_w*) od 0,98 do 0,99, plodovi jabuke zadovoljavaju minimalni nivo *a_w* za klijanje spora *P. expansum* i biosintezu patulina, koji su oko 0,83–0,85 i 0,99, respektivno. Raspon pH jabuke (od 3.1 do 4.2) također zadovoljava kolonizaciju *P. expansum* i proizvodnju patulina (pH 2,5–6). Osim ova dva faktora, različite genetičke pozadine i uslovi rasta oblikuju fizičke i hemijske osobine plodova jabuke, koje na kraju određuju sposobnost zarastanja rane, kao i podložnost plavoj plijesni i proizvodnji patulina u divljim ili kultivisanim jabukama.

Čvrstoća mesa je važna senzorska osobina svih sorti jabuke, posebno domaćih, što je povezano sa otpornošću ploda na plavo raspadanje plodova i proizvodnju patulina. Kod sazrijevanja ploda, tekstura mesa postaje mekša, što dovodi do većeg rizika od infekcije patogena [62]. Generalno, prijavljena je negativna korelacija između čvrstoće mesa i ozbiljnosti plave plijesni u jabukama. Osim čvrstoće, osobine kao što su veličina ploda, boja kože, debljina kore i kutikularni vosak, također djeluju kao implicitni faktori koji utječu na nivo tolerancije kultivara prema patogenu koji napada i proizvodi patulina. Uglavnom fizički nasledene, ove fizičke osobine su također pod uticajem izlaganja suncu i nivou etilena, koji ima jaku vezu sa uslovima okoline i hemijskom konstitucijom.

Tabela 26. Učestalost patulina u svježim jabukama i proizvodima na bazi jabuke (Hammami i sar., 2017)

Uzorak	Broj uzoraka	Broj pozitivnih uzoraka	Raspon Patulina (µg/kg)	(µg/kg) $\bar{X} \pm SD$
Svježa jabuka	12	5	ND–17,3	3,71±0,6
Sok od jabuke	20	20	5,8–82,2	35,37±1,66
Sok od jabuke za bebe	6	6	7,7–61,3	30,67±6,7
Kompot od jabuke za bebe	7	7	1,02–24,57	10,92±1,21

Kontaminacija u drugim izvorima hrane i proizvodima značajno je niža nego u prerađevinama od jabuka. Visoke količine patulina u soku od jabuka ukazuje na potrebu unapređivanja proizvodnih tehnika po sektorima proizvodnje. Količina patulina može se smanjiti nakon uklanjanja trulog ili oštećenog voća, ali ne i potpuno otkloniti, jer mikotoksin difundira i u zdrave dijelove ploda. Najveće količine patulina pronađene su unutar 1 cm od oštećenog područja. Nijedan mikotoksin nije detektiran na udaljenosti od 2 cm od područja koje je inficirano *P. expansum*. Posebna pažnja,

također, se mora posvetiti čišćenju spremnika. Što se tiče uslova u kojima se jabuke skladište, općenito *P. expansum* pokazuje psihotrofske karakteristike, zapravo je u stanju proizvoditi PAT i u hladnjaku. Različiti sojevi pokazuju drugačije kapacitete za proizvodnju patulina u različitim uslovima skladištenja (rashladna/kontrolirana atmosfera). Osnova je uklanjanje pljesnivog voća tokom skladištenja. Suprotno veća količina patulina može se pronaći u izvedbenim proizvodima. Također je pronađeno da se količina patulina u jabuci povećava sa periodom skladištenja.

Preventivne mjere

Zbog činjenice da prisutnost plijesni i/ili mikotoksina u hrani može biti opasna po ljudsko zdravlje, i predstavljati problem enormnih razmjera, sve je veći naglasak na razvoj metoda redukcije mikotoksina kojima bi se omogućila proizvodnja zdravstveno ispravne hrane. Metode nadzora nad zdravstvenom ispravnošću hrane u ovom području, moguće je svrstati u dvije kategorije:

- 1) metode sprječavanja onečišćenja plijesnima i rasta plijesni i
- 2) metode dekontaminacije onečišćenih proizvoda.

Najbolji pristup za uništavanje mikotoksina u hrani je sprječavanje rasta plijesni u svim fazama proizvodnje, prikupljanja, transporta, obrade, skladištenja i prodaje. Genetički inženjering i razvoj hibridnih sorti otpornih na infekciju, različitim sojevima plijesni iz roda *Aspergillus*, *Fusarium* i *Pencillium*, vjerojatno predstavljaju nove načine smanjenja onečišćenja mikotoksinima u razdoblju prije žetve, barem kada su u pitanju neke vrste žitarica. Rizik od oštećenja zaštitne ovojnice i posljedičnog stvaranja mikotoksina moguće je smanjiti ubiranjem samo onih usjeva u čijem zrnju sadržaj vlage iznosi približno 24%.

Kontrolu nad usjevima, podložnih onečišćenju sa mikotoksinima u razdoblju nakon žetve, moguće je postići kontrolom nad faktorima koji utiču na rast plijesni, na primjer uspostavljanjem kontrole nad udjelom i aktivnošću vode, temperaturom okoline, plinovima u atmosferi, te upotrebom insekticida ili konzervansa. Pri skladištenju zrnja žitarica i

orašastih plodova pažnju je potrebno usmjeriti na održavanje aktiviteta vode na nižem nivou od onog koji pospješuje rast plijesni.

U slučaju onečišćenja sirovina, potrebna je primjena ciljanih mjera redukcije, odnosno dekontaminacije, koje bi trebale efikasno inaktivirati ili u potpunosti ukloniti mikotoksin, a da pritom ne naruše nutritivna i tehnološka svojstva proizvoda, te ne stvaraju reaktivne toksične produkte. Metode dekontaminacije onečišćenih proizvoda mogu se podijeliti na hemijske, biološke i fizikalne.

Hemijske metode redukcije uključuju primjenu različitih hemijskih sredstava, poput: kiselina, baza, reducirajućih sredstava, hloridnih sredstava, oksidanata i formaldehida, i neke druge hemikalije koje reaguju s mikotoksinima. Ukoliko je odobreno, nivoe AFB₁ u namirnicama namijenjenim hranidbi životinja, moguće je reducirati korištenjem agensa kao što su adsorptivne gline, te amonizacijom. Amonizacija je jedini proces hemijske inaktivacije koji se pokazao efikasnim u razaranju AFB₁ u sjemenu pamuka i pogači od pamukova sjemena, kikirikiju i pogači od kikirikija, te kukuruzu. Glavna svrha amonizacije je uklanjanje AFB₁ iz krmiva namijenjenih hranidbi krava muzara. Generalno, hemijske metode redukcije mikotoksina se smatraju nepraktičnim i nepoželjnim, zbog uslova pritiska i temperature pri kojima se reakcije provode, škodljivosti uslijed stvaranja toksičnih ostataka, te negativnog utjecaja na nutritivna, senzorska i funkcionalna svojstva proizvoda. Stoga su, do danas, odobrene isključivo za korištenje u svrhu smanjenja prisutnosti AFB₁ u krmivima.

Biološke metode redukcije mikotoksina temelje se na upotrebi različitih mikroorganizama, uključujući bakterije, kvasce i plijesni, koji mogu metabolizirati i inaktivirati mikotoksin, Biosintezu aflatoksina inhibiraju i bakterije mliječne kiseline *Bacillus subtilis*. Pokazalo se da proces industrijske fermentacije ne dovodi do razgradnje aflatoksina, no dokazano je da se nakon destilacije u alkoholnoj frakciji ne nalazi toksin, te da se obično aflatoksini koncentriraju u tropu. Kada se onečišćeni proizvod koristi u procesu fermentacije, važno je utvrditi u koju će svrhu onečišćeni nusprodukti u konačnici biti upotrijebljeni. Specifični spoj koji se pokaže učinkovitim dekontaminantom, obično je i s biološkoga stajališta i sa

stajališta isplativosti bolje dodati direktno. U literaturi se navodi da je efikasnost bioloških metoda, koje su pokazale mogućnost dekontaminacije, obično ovisna o specifičnim spojevima koje proizvode odabrani mikroorganizmi, te kompeticiji za nutritivne materije potrebne za stvaranje toksina.

U istraživanjima mnogih autora dokazano je vezanje aflatoksina s pomoću bakterija mliječne kiseline (BMK). Uz dokaze o korisnoj aktivnosti BMK, sposobnost vezanja aflatoksina im daje značajan potencijal za primjenu u funkcionalnoj hrani. Nivo termostabilnih trihotecena se može smanjiti tokom tehnoloških postupaka dobijanja prehrambenih proizvoda, kao što su prečišćavanje zrna, suha i mokra meljava, fermentacija u proizvodnji piva, pečenje ili kuhanje. Dodatkom preparata na bazi zeolita, kao i antioksidanata, također se može smanjiti ili eliminisati trihoteceni tipa A.

Inaktivacija mikotoksina fizikalnim metodama uključuje ekstrakciju pomoću otapala, adsorpciju, te toplinsku inaktivaciju ili inaktivaciju ozračivanjem. Količine AFB₁ u uskladištenim namirnicama moguće je smanjiti fizikalnim metodama kakve su kolorno sortiranje, flotacija i sortiranje prema gustoći, blanširanje i prženje. Ozračivanje hrane postaje metoda široke komercijalne primjene kojom se postiže sterilnost prehrambenih proizvoda. Gama zračenje, upotrebjeno u svrhu sterilizacije, je postupak prolaska energije velike prodorne moći kroz različite materijale, koje pri tom uzrokuje direktno oštećenje deribonukleinske kiseline (DNK) putem jonizacije, te nastanak mutacija i smrt pojedinih stanica. U literaturi se mogu naći brojna izvješća o povećanom, smanjenom ili pak nepromijenjenom intenzitetu sinteze mikotoksina nakon ozračivanja plijesni u različitim uslovima. Stručni odbor FAO/IAEA/WHO ukazao je da ozračivanje bilo koje hrane prosječnom ukupnom dozom do 10 kGy, s toksikološkog, nutritivnog, odnosno mikrobiološkog stajališta ne predstavlja opasnost za ljudsko zdravlje, te je odobrila ovu dozu kao maksimalnu prosječnu dozu koju ozračena hrana smije apsorbirati.

Fuminozini su relativno stabilni mikotoksini za koje još nije pronađen efikasan način detoksikacije. Procesuiranje hrane na temperaturama višim od 150°C može uticati na smanjenje količine fumonizina. Postupkom

amonizacije u kombinaciji sa visokom temperaturom moguća je uspješna dekontaminacija fumonizina. Tretman kukuruza kombinacijom H_2O i NaHCO_3 ili $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ smanjuje se njihova količina i do 100%. U rastvoru metanola nakon šest nedelja čuvanja pri temperaturama 4, 25 i 40°C dolazi do razgradnje FB_1 i FB_2 od 5,35 do 60,0%.

Kako bi se poboljšali uslovi skladištenja i spriječio rast i razvoj gljivica koje proizvode patulin, mogu se upotrijebiti sredstva za dezinfekciju, prirodni i biološki agensi ili njihovo kombiniranje. Druga alternativa, tokom skladištenja i transporta, je upotreba polietilenskih paketa, sa ili bez kontrolirane atmosfere. Mogućnost smanjenja kontaminacije, uskladištenih jabuka, patulinom je faza pranja jabuka vodom iz slavine, vodom sa aktivnim hlorom ili sa vodom pod visokim pritiskom. Smanjenje postotka ovisi o početnoj količini ovog mikotoksina. Patulin se iz soka može ukloniti miješanjem ili filtriranjem kroz granulirani aktivni ugalj, a efikasnost ovisi od vrste uglja, vrste aktivacije (fizička ili hemijska, sadržaja čvrstih dijelova soka, kao i od vremena kontakta.

Analitičke tehnike za određivanje mikotoksina u hrani

U svrhu određivanja mikotoksina koriste se različite orijentacijske (*screening*) i potvrdne analitičke metode, a koje se nadalje mogu podijeliti na kvalitativne i kvantitativne. Orijentacijske metode uključuju analitičke postupke za koje se može na dokumentirani sljedivi način pokazati da su vrijednovane, te da im je na nivou koncentracije od interesa postotak lažno negativnih rezultata manji od 5%.

Najčešće se u određivanju mikotoksina najčešće koristi imunoenzimaska (*imunoadsorpciona enzimaska analiza ELISA*) metoda. ELISA ima brojne prednosti pred drugim analitičkim metodama. Te se prednosti poglavito odnose na brzinu izvedbe metode, mogućnost analize velikog broja uzoraka u kratkom razdoblju, visoku specifičnost, jednostavnost, nisku cijenu koštanja i korištenje neškodljivih reagensa.

Druge metode određivanja mikotoksina uključuju tekuću hromatografiju visoke djelotvornosti (*eng. High Performance Liquid Chromatography-*

(HPLC), plinsku hromatografiju (eng. Gas Chromatography - GC), tekuću hromatografiju/masenu spektrometriju (eng. Liquid Chromatography/Mass Spectrometry - LC/MS), odnosno plinsku hromatografiju/masenu spektrometriju (eng. Gas Chromatography/Mass Spectrometry - GC/MS;). Ove metode za razliku od orijentacijskih iziskuju korištenje sofisticirane laboratorijske opreme. Savremena analitika uvelike se oslanja na HPLC u okviru koje se, ovisno o hemijskoj strukturi različitih sastojaka koriste različiti adsorbensi. Najčešće korišteni HPLC detektori su fluorescentni detektori (FLD), a u posljednje vrijeme često se kombinuje i sa masenom spektrometrijom (MS). MS omogućava izrazito tačnu i specifičnu detekciju, pri čemu ograničavajuće faktore predstavljaju visoka cijena potrebne opreme, te složenost postupaka ekstrakcije i odjeljivanja, te detekcije i kvantifikacije ovih jedinjenja. U određivanju mikotoksina rjeđe su zastupljene metode kapilarne elektroforeze, te metode s biosenzorima kojima se isti određuju prema intenzitetu fluorescencije.

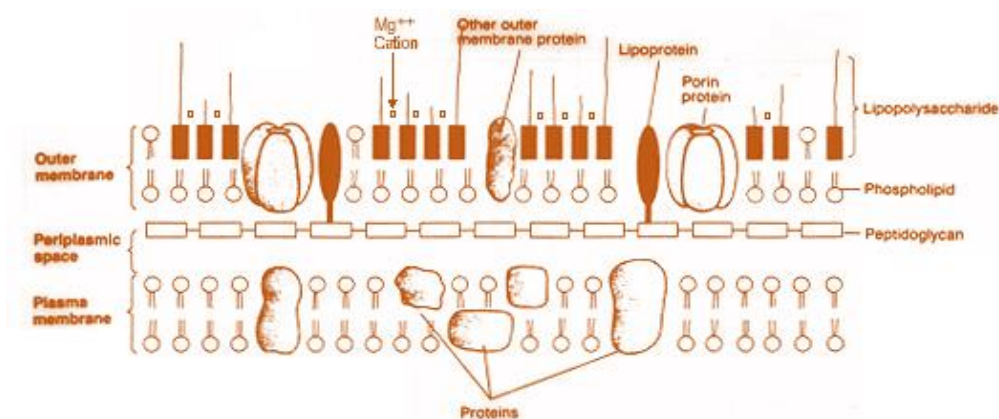
4. 2. BAKTERIJSKI TOKSINI

Bakterijski toksini se dijele u dvije grupe: egzotoksini i endotoksini. Egzotoksini se izlučuju izvan bakterijskih stanica, dok su endotoksini dio ćelijskog zida Gram- negativnih bakterija.

Toksigeneza je sposobnost proizvodnje toksina, a navedeno predstavlja osnovni mehanizam pomoću kojeg bakterijski patogeni uzrokuju oboljenja. Na hemijskoj razini postoje dva glavna tipa bakterijskih toksina, endotoksini-lipopolisaharidi, koji su povezani sa ćelijskim zidom Gram-negativnih bakterija, dok se egzotoksini-proteini oslobađaju difuzijom iz bakterijskih ćelija i mogu biti prisutni u hrani u kojoj nije dokazano prisustvo specifične patogene bakterije.

Endotoksini

Endotoksini su materije vezane za bakterijsku ćeliju i smatraju se strukturnim komponentama Gram-negativnih bakterija, obzirom da su pozicionirani u dijelu vanjske membrane ćelijskog zida ovih bakterija. Endotoksini su strukturne komponente i patogenih i nepatogenih sojeva Gram-negativnih bakterija, a po svojoj strukturi su lipopolisaharidi (LPS) ili lipooligosaharidi (LOS). Iako se pojam "endotoksin" povremeno koristi za označavanje bilo kojeg bakterijskog toksina povezanog sa ćelijom, u bakteriologiji je propisano da se pojam endotoksin odnosi na kompleks lipopolisaharida povezan s vanjskom membranom Gram-negativnih patogena kao što su *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis* i *Vibrio cholerae*. Obzirom da se radi o strukturnim komponentama ćelija, topivi endotoksini mogu biti oslobođeni tokom rasta bakterijskih ćelija, ali i iz ćelija koje liziraju kao posljedica djelotvornih mehanizama odbrane domaćina, a ponekad i djelovanjem određenih antibiotika. Aktivnost endotoksina je uvijek povezana sa prisustvom patogene bakterije i njenim rastom u organizmu domaćina. Veza endotoksina (lipopolisaharida) sa površinom bakterijske ćelije prikazana je na Slici 23. Na slici je prikazan peptidoglikanski sloj ćelijskog zida Gram-negativnih bakterija koji je smješten u periplazmatskom prostoru (prostor koji se nalazi između citoplazmatske membrane i vanjske membrane). Peptidoglikanski sloj je vezan kovalentnim vezama sa lipoproteinima vanjske membrane. Unutrašnja strana vanjske membrane i citoplazmatska membrana su građene od fosfolipida, dok je vanjska strana vanjske membrane prvenstveno građena od lipopolisaharida, a u manjem obimu sadržava fosfolipide.



Slika 25.Struktura ćelijskog zida Gram-negativnih bakterija (npr. *E. coli*), (Todar, 2012)

Lipopolisaharidna struktura endotoksina je veoma važna za njihovu biološku aktivnost, iako vanjska membrana ćelijskog zida Gram-negativnih bakterija pored lipopolisaharida sadržava i različite proteine vanjske membrane, lipoproteine i porin proteine. Pomenuti proteini imaju ulogu u virulenciji Gram-negativnih bakterija, ali se ne smatraju endotoksinima.

Biološka aktivnost endotoksina je povezana sa lipopolisaharidnom (LPS) komponentom, dok je toksičnost povezana sa lipidnom komponentom (lipid A), a imunogenost sa polisaharidnim komponentama. Antigeni ćelijskog zida (O antigeni) su dijelovi lipopolisaharidnih komponenti (LPS-a) Gram-negativnih bakterija. Lipopolisaharidi uzrokuju različite upalne reakcije u organizmu domaćina, jer predstavljaju aktivne agense infekcija porijeklom iz patogenih Gram-negativnih bakterija. Postoji vjerojatnoća da u fazama rasta (in vivo), Gram-negativne bakterije oslobađaju male količine endotoksina. Navedeno može biti značajno za jačanje imuniteta prirodnim putem, jer je u laboratorijskim istraživanjima dokazano da se samo mala količina rastvorljivih endotoksina oslobađa u logaritamskoj fazi rasta bakterija. Ovim je potvrđeno da endotoksini ostaju uglavnom vezani za ćelijski zid Gram-negativnih bakterija do autolize ćelije.

U poređenju sa bakterijskim egzotoksinima, endotoksini imaju manji potencijal kada je riječ o trovanjima hranom. Navedeno se obrazlaže usko

specifičnim djelovanjem svakog endotoksina obzirom da ne djeluju enzimatski. U hrani su endotoksini termostabilni (kuhanje u trajanju od 30 minuta ne može destabilizirati endotoksin), međutim mogu ih neutralizirati pojedina oksidirajuća sredstva (superoksid, peroksid i hipoklorit). Antigeni endotoksina se ne mogu pretvoriti u toksoide. Karakteristike bakterijskih endotoksina i klasičnih egzotoksina su prikazane u Tabeli 30.

Egzotoksini

Egzotoksini se obično pojavljuju u hrani, nakon što prethodno budu izlučeni iz bakterijske ćelije, pri čemu prisustvo za toksin specifične patogene bakterijske vrste u hrani ne mora biti dokazano. Egzotoksine obično izlučuju bakterije tokom eksponencijalne faze rasta, ali se u pojedinim slučajevima egzotoksini oslobađaju isključivo autolizom bakterijske ćelije (odumiranjem). Egzotoksine proizvode različite Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije, a po hemijskom sastavu su to proteini i rjeđe polipeptidi. Geni za proizvodnju egzotoksina se često nalaze u plazmidima bakterijskih ćelija, a u pojedinim slučajevima ih prenose bakteriofagi kao u slučaju difterijskog toksina, kolera-toksina ili botulina.

Egzotoksini se izlučuju iz bakterijske ćelije zahvaljujući postojanju specijaliziranih struktura koje se nazivaju sekrecijski sistemi. Neki sekrecijski sistemi izlučuju egzotoksine u izvanćelijski prostor, dok ih drugi izlučuju direktno u ćelije domaćina (sisara).

U prvom slučaju egzotoksini se mogu neutralisati nakon izlaganja protutijelima (antitijelima), dok se u drugom slučaju kod direktnog izlučivanja u ćelije sisavaca znatno veća učinkovitost. Poznato je šest sekrecijskih sistema kod bakterija, ali tip III je posebno važan za virulenciju bakterija i još se naziva injektos. Pomenuti sekrecijski sistem je poznat po stvaranju izdanka poput igle na površini bakterijske ćelije, preko koje se egzotoksini transportiraju izravno u ćeliju domaćina. Često Gram-negativne bakterije posjeduju sekrecijski sistem tipa III.

Tabela 27. Karakteristike bakterijskih endotoksina i klasičnih egzotoksina (Todar, 2008)

Karakteristika	Endotoksin	Egzotoksin
Hemijska struktura	Lipopolisaharid (mw = 10kDa)	Protein (mw = 50-1000kDa)
Veza sa bakterijskom ćelijom	Dio vanjske membrane	Izvan ćelije, difuzija
Denaturacija kuhanjem	Ne	Obično
Antegen	Da	Da
Formira toksoid	Ne	Da
Snaga (potencijal)	Relativno nizak (>100ug)	Relativno visok (1 ug)
Specifičnost	Niskog nivoa	Visokog nivoa
Enzimska aktivnost	Ne	Često
Pirogenost	Da	Povremeno

Zahvaljujući svojoj peptidnoj strukturi (antigeni), egzotoksini djeluju enzimski ili direktno na ćelije domaćina te na taj način induciraju proizvodnju protektivnih protutijela koja se nazivaju antitoksini (antitijela). Antitoksini imaju primjenu u medicini tako što preveniraju i liječe oboljenja kao što je botulizam ili tetanus. Zbog svoje proteinske strukture lako se inaktiviraju povišenom temperaturom (60 do 80°C) ili formaldehidom. Proteini se denaturiraju, što znači da se narušava njihova tercijarna i sekundarna struktura, važna za funkcionalne osobine (dok primarna struktura ostaje ista), pri čemu pojedini dijelovi strukture više nisu u međusobnoj interakciji. Zbog navedenog protein postaje nefunkcionalan, ali ipak zadržava imunogeničnost. Nefunkcionalni toksini se nazivaju toksoidi ili anatoksini te se koriste u aktivnoj imunizaciji/vakcinaciji/cijepljenju.

Mnogi egzotoksini građeni su od dvije podjedinice i nazivaju se A-B toksini. Aktivna (A) podjedinica odgovorna je za toksičnu aktivnost, dok B

podjedinica (od eng. binding) veže egzotoksin za specifične receptore na membranama ćelija ljudskog organizma. Važni egzotoksini koji su građeni na ovom principu su toksin difterije, kolera-toksin, tetanus-toksin, botulin i enterotoksin bakterije *Escherichia coli*. Bakterijski egzotoksini se ubrajaju u najtoksičnije poznate supstance, čije letalne doze za ljude mogu biti manje od 1µg. Prema mjestu djelovanja, egzotoksini su podijeljeni na neurotoksine, citotoksine i enterotoksine, u zavisnosti od toga je li mjesto njihovog djelovanja neuron, koža ili crijevo.

Neurotoksini oštećuju nervni sistem, uzrokujući simptome kao što su neobuzdano grčenje mišića i paraliza. Neurotoksinima pripadaju tetanus-toksin i botulinum-toksin (botulin), a u oba slučaja se radi o smrtonosnim intoksikacijama. Egzotoksin bakterije *Clostridium botulinum* (botulin) je letalan za čovjeka u količini od svega 1µg te se ubraja u najtoksičnije poznate supstance.

Citotoksini oštećuju razne tipove ćelija tako što liziraju ili ometaju osnovne ćelijske procese. Jedan od najpoznatijih predstavnika je toksin difterije, kojeg proizvodi bakterija *Corynebacterium diphtheriae*. Drugi važan citotoksin je shiga-toksin, kojeg proizvodi *Shigella dysenteriae* i neki enterohemoragični sojevi vrste *Escherichia coli*, serotip O157:H7. Virulentni sojevi *Shigella dysenteriae* posjeduju veliki plazmid koji je ključan za prihvatanje i ulazak bakterije u ćelije domaćina. Dijelovi crijeva domaćina bez epitela su u tom slučaju upaljeni, prekriveni gnojem i krvare, a simptom je dizenterija (učestala krvava stolica).

Grupa enterohemoragičnih *E. coli*, serotipa O157:H7, u svom genomu sadrži dodatne sekvence DNK, koje nisu prisutne u nepatogenim sojevima *E. coli*, nego se zapravo radi o ugrađenim bakteriofagima porijeklom iz sojeva *Shigella dysenteriae*. Posljedica je ozbiljno oboljenje koje se manifestuje krvavim proljevima.

Enterotoksini uzrokuju poremećaje u probavnom sistemu, kao što su proljev i povraćanje. Enterotoksinima pripadaju toksin kolere, kojeg sintetizira bakterija *Vibrio cholerae*, potom toksini nekih sojeva *Escherichia coli* ukoliko se nađu na nepoželjnim mjestima u tijelu kao što su mokraćovod, prostata i vaginalna sluznica. Enterotoksinogeni sojevi *E. coli*

se pričvrste na crijevni epitel, gdje se razmnožavaju izlučujući jedan ili oba enterotoksina: termostabilan toksin (ST) i termolabilan toksin (LT), od kojih je zadnji gotovo identičan toksinu kolere po djelovanju (infekcija rezultira proljevom).

Proizvodnja toksina je specifična za određenu bakterijsku vrstu koja uzrokuje oboljenje povezano sa specifičnim toksinom (npr. samo *Clostridium tetani* proizvodi toksin tetanusa; samo *Corynebacterium diphtheriae* proizvodi toksin difterije). Virulentni sojevi određene bakterijske vrste proizvode toksin, a sojevi koji nisu virulentni ne proizvode, iz čega proizilazi da je toksin glavna determinanta virulencije (npr. tetanus i difterija). U početku se smatralo da je proizvodnja egzotoksina uglavnom ograničena na Gram-pozitivne bakterije, dok nije postalo jasno da i pojedine Gram-negativne bakterije proizvode egzotoksine a glavna determinanta egzotoksina je proteinska struktura.

4.2.1. BAKTERIJE UZROČNICI TROVANJA HRANOM

U prehrambenim proizvodima mogu biti dokazane različite vrste toksina, od kojih su najpoznatiji bakterijski toksini, toksini gljiva (mikotoksini), toksini algi ili biljni toksini. Prisustvo naprijed pomenutih bioloških kontaminanata u hrani animalnog ili biljnog porijekla kod uživaoca (konzumenta) dovodi do pojave oboljenja (bolesti).

Bolesti koje se prenose hranom se dijele u dvije grupe: trovanja (intoksikacije) i infekcije (toksikoinfekcije).

- Trovanja nastaju nakon unosa hemijskih ili bioloških toksina, uključujući i toksine koje proizvode patogene bakterije, pri čemu prisustvo toksina može biti dokazano u hrani i u slučajevima kada u istoj nema dokaza o prisustvu živih ćelija patogenih (toksikogenih) bakterija.

- Infekcije nastaju nakon konzumiranja hrane koja sadrži žive ćelije patogenih bakterija. Toksikoinfekciju uzrokuju bakterije koje se unose hranom u organizam, nakon čega iste rastu i proizvode toksin u organizmu (crijevima) domaćina.

Tabela 28. Patogene bakterije koje uzrokuju infekcije porijeklom iz hrane, modificovano (Hernandez-Cortez i sar., 2017)

Bakterija	Oboljenje	Vrste kontaminirane hrane
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typh ii <i>Salmonella enterica</i> serovar Paratyphi	Tifus i paratifus	Nedovoljno termički obrađena svinjetina, govedina te meso peradi, kontaminirana jaja i mlijeko.
<i>Salmonella</i> spp. (<i>S. typhimurium</i> , <i>S. enteritidis</i>)	Salmoneloza	Nedovoljno termički obrađeno meso peradi, karfiol i paradajz.
<i>Vibrio vulnificus</i>	Septikemija kod osoba koje imaju hronična oboljenja ili oslabljen imunitet te kod osoba koje uzimaju lijekove ili steroide.	Plodovi mora, obično kamenice.
<i>Mycobacterium bovis</i>	Cervikalna limfadenopatija, crijevne lezije, hronična tuberkuloza kože.	Kontaminirano mlijeko
<i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i>	Crohnova bolest	Pasterizovano mlijeko
<i>Listeria monocytogenes</i>	Meningitis, encefalitis, sepsa kod trudnica, cervikalna infekcija ili infekcija maternice kod trudnica, koja može uzrokovati pobačaj ili rođenje mrtvog djeteta.	Sirova govedina, svinjetina, perad, povrće, mlijeko, sir, sladoled, dimljena i sirova riba.

Mikroorganizmi prisutni u hrani u idealnim uslovima rastu, razmnožavaju se i proizvode toksine. Konzumiranjem kontaminirane hrane, toksini se apsorbiraju preko sluzokože crijeva i uzrokuju lokalno oštećenje tkiva. U nekim slučajevima toksini dopijevaju do organa kao što su bubrezi, jetra, centralni nervni sistem ili periferni nervni sistem i uzrokuju oštećenja.

Najčešći klinički simptomi bolesti koje se prenose hranom su proljev (dijareja), povraćanje, glavobolja, mučnina, grčevi i bol u abdomenu, temperatura, mučnina, mukozan (sluzav) i krvav proljev (dizenterija) i osjećaj nepotpunog pražnjenja crijeva. Najvažniji mikroorganizmi uzročnici trovanja hranom su predstavljeni u tabelama 27–30. Oboljenja se dijagnosticiraju na osnovu simptoma i kliničkih podataka oboljelih pacijenta.

Rod *Salmonella*

Rod *Salmonella* široko je rasprostranjen u prirodi. Morfološke osobine roda: Gram-negativni, nesporogeni, aerobni ili fakultativno anaerobni štapići, veličine 0,7-1,5x2,5µm, katalaza pozitivni, oksidaza negativni, fermentiraju glukozu te proizvode H₂S. Bakterija roda *Salmonella* su pokretni oblici bakterija zahvaljujući prisustvu peritrihnih flagela izuzimajući dvije nepokretne vrste *Salmonella pullorum* i *Salmonella gallinarum*.

Najvažniji rezervoar različitih sojeva (serovar-a) ovog roda predstavlja intestinalni trakt toplokrvnih, ali i mnogih drugih životinja (reptila, insekata), izuzimajući ribe, mekušce i rakove koji mogu biti kontaminirani salmonelom nakon ulova. Od toplokrvnih životinja, najvažniji rezervoar su pilići, guske, purani i patke. Veliki rizik od prenošenja na djecu mogu predstavljati kućni ljubimci: psi, mačke, kornjače i ptice. Prirodna staništa sojeva roda *Salmonella* se dijele u tri grupe na osnovu specifičnosti domaćina i kliničkog obrasca bolesti:

1) Vrste i sojevi najviše prilagođeni ljudskoj populaciji: *Salmonella Typhi* i *Salmonella Paratyphi* A, B i C, uzrokuju tifusnu i paratifusnu groznicu;

2) Vrste i sojevi najviše prilagođeni životinjama: *Salmonella dublin* (bovine), *Salmonella choleraesuis* i *Salmonella typhimurium* (svinja), *Salmonella pullorum* i *Salmonella gallinarum* (ptice), uzrokuju paratifus kod životinja.

3) Treća grupa obuhvata većinu serovara koji mogu inficirati ljude i životinje, a nazivaju se zoonotskim salmonelama. Ova grupa je odgovorna za najveći broj trovanja širom svijeta, a mogu biti izolovane iz većine životinja čije se meso koristi u ishrani, kako divljih tako i domaćih.

Kontaminacija hrane vrstama roda *Salmonella*

Salmoneloza je zoonoza, jer su zaražene životinje glavni uzročnik infekcija kod ljudi. Broj infekcija uzrokovanih vrstama roda *Salmonella* značajno se smanjio od 2008. godine do 2013.godine, da bi na području Evropske Unije najznačajniji pad broja oboljelih bio dokumentovan u 2017. godini (91.662 trovanja). Dokumentovani slučajevi podrazumijevaju prijavljene i potvrđene slučajeve infekcije istim uzročnikom.

U Evropskoj Uniji (EU), u periodu 2013.-2016., potvrđen je povećan broj ljudi zaraženih serotipovima *S. enteritidis*. Najveći broj uzoraka hrane pozitivnih na vrste roda *Salmonella*, analizirala su nadležna tijela većine država članica EU prema Uredbi (Legislativi EU) br. 2073/2005. Zbirni podaci za zemlje članice EU nastaju kao rezultat organizovanog praćenja pojedinih lanca hrane i uzorkovanja u svim fazama (maloprodaja, klaonice, prerada, aktivnosti granične inspekcije itd.), a analizirani su jedinični, sporadični uzorci i serije uzoraka. Proporcionalno, najveći broj pozitivnih u odnosu na ukupan broj analiziranih uzoraka odnosio se na meso i mesne prerađevine namijenjene termičkoj obradi prije konzumiranja. Procentualni udio *Salmonella* pozitivnih uzoraka je iznosio: sirovo meso brojlera (4,85%); sirova puretina (4,18%); sirovo meso peradi izuzimajući brojlere (2,66%); sirova svinjetina (1,58%); termički obrađeno i spremno za konzumaciju mljeveno meso, mesne prerađevine, i prerađevine od svinjskog mesa (0,50%); termički obrađeno i spremno za konzumaciju mljeveno meso, mesne prerađevine od govedeg, ovčijeg i kozjeg mesa (0,17%); termički obrađeno i spremno za konzumaciju meso brojlera (0,14%).

Manja kontaminacija ciljanim serovarima roda *Salmonella* zabilježena je u uzorcima peradi (tov koka, nesilice, tov brojlera, tov purana) tokom 2017. godine u poređenju sa periodom 2013.-2016.godina. Kontaminacija serovarom *S. infantis* (najčešći serovar izoliran kako iz životinja tako i iz uzoraka mesa) povećala se u lancu proizvodnje i prerade brojlera. Primijećena je veća učestalost kontaminacije sojevima roda *Salmonella* kod trupova svinja prilikom kontrole rukovođene od strane nadležnih službenih tijela u poređenju sa internom kontrolom proizvođača.

Od ukupno analiziranih uzoraka konzumnih jaja u EU, *Salmonella* pozitivni su bili zastupljeni sa 0,3%, a od zemalja članica EU kontaminacija jaja je zabilježena u Italiji, Slovačkoj, Španiji i Rumuniji. Živi školjkaši su u 0,2% slučajeva bili kontaminirani salmonelom, a o pozitivnim analizama izvijestile su Holandija, Portugal i Španija. Ostali prehrambeni proizvodi (uglavnom biljnog porijekla) su bili kontaminirani salmonelom u 1,06% slučajeva, pri čemu je na godišnjem nivou ukupno uzorkovano 946 uzoraka. Granična inspekcija Holandije i Kipra je u 2017. godini dokazala prisustvo sojeva roda *Salmonella* u uzorcima sušenih sjemenki, a veća kontaminacija sušenih sjemenki (8,0%) je na području EU zabilježena u 2016. godini. U Velikoj Britaniji je dokumentovana najveća kontaminacija povrća salmonelom u maloprodaji, a na području EU ukupan procenat kontaminiranih u odnosu na broj analiziranih uzoraka je u 2017. godini bio 1,19%. Samo jedan uzorak voća je bio pozitivan na salmonelu, dok je kod začina i ljekovitog bilja dokazana kontaminacija 0,42% od ukupno analiziranih uzoraka. Prisustvo roda *Salmonella* je dokazano u gotovoj hrani pripremljenoj za konzumiranje (ready-to-eat) u 0,2% od ukupno analiziranih uzoraka.

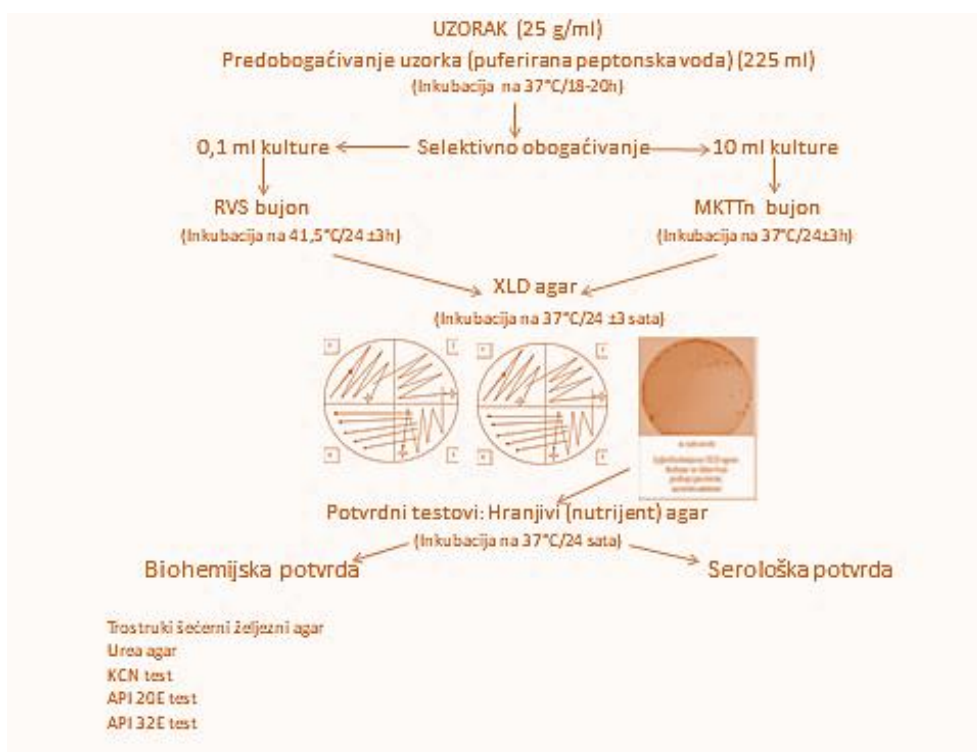
Izolacija i identifikacija Salmonella spp. iz uzoraka hrane, EN-ISO 6579-1:2017.

Za dokazivanje prisustva *Salmonella* vrsta u različitim namirnicama, u industrijskim uslovima, koristi se dvostepeni plan uzorkovanja, obzirom da se radi o striktnom patogenu. Broj analiziranih uzoraka iz jedne proizvodne linije (serije) zavisi od vrste namirnice i procjene rizika od kontaminacije *Salmonella* vrstama. Međunarodna organizacija za standardizaciju (ISO)

objavila je 2017. godine novi Pravilnik ISO 6579-1, u kojem je precizirana horizontalna metoda za dokazivanje *Salmonella* spp. u lancu proizvodnje hrane. Kao i prethodna metoda ISO 6579:2002., sa usvojenim izmjenama 6579-1:2007, nova metoda ISO 6579-1:2017 obuhvata ispitivanje hrane (proizvoda) namijenjenih ishrani ljudi, hrane za životinje te uzorke iz agroekosistema koji su direktno vezani za proizvodnju i rukovanje hranom. Pored navedenog, dopunjeno izdanje EN ISO 6579-1:2017 uključuje ispitivanje mlijeka i mliječnih proizvoda, kao i uzoraka iz primarne faze proizvodnje, poput životinjskog izmeta i prašine. (Slika 26). Prvi korak u izolaciji i identifikaciji *Salmonella* vrsta je nasijavanje 25 g/ml uzorka u 225 ml podloge za predobogaćivanje.

- 1) Predobogaćivanje uzorka se radi puferiranom peptonskom vodom: U sterilnu Stomacher vrećicu odvaga se 25 g (ml) uzorka i dopuni sa 225 ml puferirane peptonske vode. Inkubacija na 37°C/18-20 sati.
- 2) **(A)** Prvo selektivno obogaćivanje zahtijeva primjenu *Salmonella* bujona za obogaćivanje–Rappaport and Vassiliadis broth (RVS bujon): 0,1 ml pred obogaćenog uzorka sa puferiranom peptonskom vodom prenosi se sterilnom pipetom u 10 ml RVS bujona. Inkubacija na 41,5°C/24 ±3 sata.
(B) Drugo selektivno obogaćivanje (izvodi se u isto vrijeme sa prvim) uz primjenu Muller-Kauffmann Tetrathionate-Novobiocin broth (MKTTn) bujona: 1 ml predobogaćenog uzorka se prenosi u epruvetu sa MKTTn bujonom. Inkubacija na 37°C/24±3 sata.
- 3) Selektivna izolacija na Xylose Lysine Deoxycholate Agar-u (XLD agar): Iz oba selektivna bujona RVS i MKTTn sterilnom mikrobiološkom ezom se dio suspenzije precjepkuje na XLD agarnu podlogu (Slika 26.). Inkubacija na 37°C/24 ±3 sata. Porast na podlozi se manifestuje katabolizmom ksiloze, laktoze i saharoze i stvaranjem kiseline koja dovodi do promjene boje podloge (indikator fenol-crveno u žuto). Kolonije bakterija iz roda *Salmonella* se odlikuju prisustvom crno-obojenog precipitata Fe-sulfida čiji nastanak je iniciran reakcijama soli Na-tiosulfata i Fe(III) amonijevog citrata sadržanih u agarnoj podlozi.

- 4) Potvrda: Iz svake Petri kutije se dodatno presijava (analizira) kolonija karakteristične morfologije, a ukoliko je izolacija negativna, neophodno je dodatno analizirati četiri netipične kolonije i presijati iste na (nutrijent) agar. Inkubacija na 37°C/24 sata. Dalje slijede biohemijski ili serološki potvrdni testovi uporedo sa molekularnom identifikacijom.
- 5) Nakon uzgoja na selektivnim hranjivim podlogama, kolonije sumnjive na *Salmonella* vrste se boje po Gram-u i dokazuju serijom biohemijskih testova (Kliglerov dvostruki ili trostruki šećer, Urea-test, KCN-test, Indol-test, test sa metilnim crvenilom, test sposobnosti rasta u prisustvu kalijum cijanida, Voges-Proskauer test, API 20 E ili API 32E testovi) te ponovo inkubiraju (Slika 26).



Slika 26. Obogaćivanje i izolacija *Salmonella* spp. iz uzoraka hrane

Serološkim testovima je identificirano preko 2560 različitih serovara vrste *Salmonella enterica*. Svi serovari mogu da uzrokuju infekcije kod ljudi. Diferencijacija između serovara vrste *Salmonella enterica* zasnovana je na razlikama u prisustvu O-antigena i H-antigena. O-antigeni su polisaharidne domene u lipopolisaharidnom kompleksu ćelijskog zida vrsta iz roda *Salmonella* (Gram negativne), dok su H-antigeni domeni proteina flagelina koji je osnovna strukturna jedinica lokomotornih organela-flagela. Da bi se tačno identificirao određeni serovar *Salmonella* spp. primjenjuju se metode za određivanje biokemijskih osobina kao i serološka tipizacija upotrebom specifičnih antiseruma anti-O i anti-H kao i upotrebom anti-V i antiseruma nakon izolacije kulture. Ovaj tradicionalan način izolacije, identifikacije i potvrde je kompleksan, skup i zahtjevan. Stoga se u serološkoj identifikaciji koristi Kauffmann-White-ova šema prema kojoj su vrste roda *Salmonella* podijeljene na osnovu somatskih antigena u 67 O grupa, ali najčešći uzročnici oboljenja ljudi pripadaju grupama A, B, C₁, C₂, D, E. Dalja podjela u serotipove se vrši prema H ili flagelarnim antigenima faze 1 i faze 2.

Rod *Vibrio*

Bakterije roda *Vibrio* pripadaju porodici *Vibrionaceae*. To su mali, zakrivljeni, pokretni, fakultativno-anaerobni, nesporogeni Gram-negativni bacili, koji fermentiraju glukozu i većinom su oksidaza pozitivni. Rod *Vibrio* obuhvata oko 30 vrsta, od kojih nekoliko vrsta uzrokuju infekcije kod ljudi: *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* i *V. vulnificus*. Iako su ove bakterije prirodno prisutne u vodi, njihova koncentracija se dodatno povećava ispuštanjem otpadnih voda, jer su bakterijama iz roda *Vibrio* iste izvor nutrijenata. Vrsta *V. cholerae* može se često izolirati iz vode saliniteta 2-25‰ temperature 15-35 °C, a infekcija se najčešće širi konzumacijom kamenica uzgojenih u kontaminiranoj vodi za vrijeme toplijih mjeseci. Uzročnici kolere su sojevi vrste *V. cholerae* koji proizvode kolera-toksin iz serogrupa O₁ i O₁₃₉ (Tabela 28). Period inkubacije traje od nekoliko sati do 5 dana, tokom kojeg bakterija nastanjuje tanko crijevo i proizvodi kolera toksin. Simptomi kolere

su povraćanje i dijareja, a teži simptomi uključuju dehidraciju, te probleme s bubrezima, grčeve u stomaku i nogama uz nesvjesticu.

Vrsta *V. parahaemoliticus* obično naseljava okeane i priobalne vode. Dokazivanje prisustva (nivo ili prag detekcije) ove bakterijske vrste uslovljen je temperaturom vode, pri čemu se sojevi ove vrste ne mogu izolirati dok temperatura vode ne dostigne 19-20°C. U velikom broju istraživanja je dokazano da organizmi prežive zimu pričvršćeni na zooplankton skriven u sedimentima vodenih kanala, a u okenskoj vodi *V. parahaemoliticus* ima tendenciju pričvršćivanja na školjke. Vrsta *V. parahaemoliticus* može rasti u prisustvu 1-8% NaCl-a, a optimalan rast ostvaruje u rasponu 2-4%NaCl-a, dok ne preživljava temperature vode ispod 4°C. U prehrambenim proizvodima je dokazan rast *V. parahaemoliticus* na temperaturi 9.5-10°C, dok je u otvorenim vodama minimalan rast na 10°C.

Simptomi infekcije vrstom *V. parahaemolyticus* su mučnina, povraćanje i bolovi u stomaku. Gastroenteritis uzrokovan vrstom *V. parahaemoliticus* javlja se isključivo kao posljedica unosa morskih plodova u organizam. Drugi prehrambeni proizvodi se vrstom *V. parahaemoliticus* mogu kontaminirati unakrsnom kontaminacijom sa plodova mora. *V. parahaemoliticus* pored gastroenteritisa izaziva ekstra intestinalne infekcije ljudi, a uzročnik se povezuje i sa srčanom aritmijom. Bolest obično prolazi sama nakon 3 do 4 dana. Vrsta *V. vulnificus* često izaziva sepsu, a simptomi se obično javljaju tokom 24 sata i uključuju temperaturu, drhtavicu, mučninu i nizak krvni pritisak. Također može izazvati sekundarne lezije na rukama i nogama koje ponekad završavaju amputacijom (tabela 28).

Kontaminacija hrane vrstama roda *Vibrio*

Morski organizmi poznatiji kao plodovi mora (dagnje, kamenice i druge vrste školjki, škampi, ribe, rakovi) sve više se uzgajaju u kavezima, a sve manje izlovljavaju iz mora. Intenziviranjem proizvodnje morskih organizama povećali su se rizici od kontaminacije istih patogenim bakterijama tokom uzgoja, ali i nakon izlovljavanja. *V. parahaemoliticus* se

pominje kao najčešći uzročnik gastroenteritisa kod ljudi koji su konzumirali morsku hranu. Upoređivanjem koncentracija izolovanih bakterija roda *Vibrio* iz morske hrane ustanovljeno je veliko prisustvo *V. parahaemolyticus* u namirnicama porijeklom iz Jadrana, iako su ove bakterije poznati kontaminanti morskih plodova širom svijeta (Azija, Okeanija, Sjeverna Amerika). Kultura konzumiranja termički obrađenih morskih namirnica u velikoj mjeri sprječava oboljenja ljudi.

Izolacija vrsta roda Vibrio iz uzoraka hrane

Za izolaciju se koristi alkalna peptonska voda (pH 8,6 –9,0) kao medij za obogaćivanje, a period inkubacije mora biti ograničen na 8h kako bi se spriječio prekomjerni rast vibrija. Nakon inkubacije se kulture precjepljuju na selektivne i diferencijalne agarne podloge koje sadržavaju tiosulfat, citrat, žučne soli i saharozu (TCBS). Na ovom mediju se mogu razlikovati zelene kolonije *V. parahaemolyticus*, *V. mimicus* i *V. vulnificus* od žutih kolonija *V. cholerae*, zbog mogućnosti ove bakterije da fermentira saharozu. Diferencijacija između pojedinih vrsta se radi biohemijskim testovima.

Listeria monocytogenes

Vrsta *L. monocytogenes* je jedini ljudski patogen iz roda *Listeria*, iako se unutar roda nalazi ukupno šest trenutno dokazanih vrsta. Pored *L. monocytogenes* rijetko se vrste *L. seeligeri*, *L. welshimeri* i *L. ivanoviise* povezuju sa oboljenjima ljudi. *L. monocytogenes* je Gram-pozitivna, štapičasta, fakultativno anaerobna, nesporogena, katalaza pozitivna, oksidaza negativna bakterijska vrsta. Štapičasti oblik ove bakterijske vrste je karakterističan zbog zaobljenih krajeva, mikroskopski gledano ćelije mogu biti raspoređene kao pojedinačne, po dvije u obliku slova V, ali i više štapića paralelno, a pokreću se peritrihnim flagelama. *L. monocytogenes* ima veliku sposobnost adaptacije i preživljava u širokom rasponu pH vrijednosti i temperatura 0-42°C, s tim da je optimalna temperatura rasta između 30 i 35°C. *L. monocytogenes* ima sposobnost razmnožavanja na

izuzetno niskim temperaturama. Rast svih sojeva vrste *L. monocytogenes* je inhibiran pri pH vrijednostima nižim od 5,5.

L. monocytogenes ne preživljava temperaturu pasterizacije (D_{60} -nekoliko minuta i D_{70} -nekoliko sekundi), ali je dokazana sposobnost rasta u 10% rastvoru NaCl-a. *L. monocytogenes* može biti izolovana iz velikog broja prirodnih staništa: slatke i slane vode, tla, kanalizacionog mulja, truhle vegetacije i silaže. Svega 5-10% ljudske populacije su asimptomatski nosioci ove vrste u mikroflori crijeva. Često se nalazi i u digestivnom traktu sisara, ptica i riba.

Infekcija uzrokovana vrstom *L. monocytogenes* je poznata kao listerioza, a obično se razvija nakon konzumiranja hrane kontaminirane ovom vrstom. Infekcija pogađa uglavnom trudnice, novorođenčad, starije i imunokompromitirane osobe, a rijetko se simptomi oboljenja pojavljuju izvan navedenih grupa. Listerioza je blaga bolest kod trudnica, ali je ozbiljna za fetus i novorođenčad. Kod ljudi iznad 65 godina ili kod imunokompromitiranih osoba uzročnik može dospjeti u krvotok (sepsa) ili u mozak (meningitis ili encefalitis). Infekcija ponekad dugoročno utiče na pravilno funkcionisanje kosti i zglobova, grudnog koša i abdomena. Listerioza može izazvati groznicu i dijareju sličnu onoj koju izazivaju drugi bakterijski patogeni koji se prenose hranom, iako često prođe i nedijagnosticirana (ne utvrdi se stvarni uzročnik oboljenja). Trudnice sa listeriozom imaju groznicu, osjećaju umor i bol u mišićima (simptome slične gripi), a posljedica navedenog može biti pobačaj, preuranjeni porođaj, infekcija novorođenčeta i u najtežim slučajevima letalni ishod za novorođenče. U ostalim rizičnim grupama simptomi su glavobolja, ukočenost vrata, konfuzija, gubitak ravnoteže, napadi, povišena temperatura i bol u mišićima. Bolest se obično dijagnosticira uzgojem bakterije iz tkiva ili tekućina kao što su krv, cerebrospinalna tekućina ili posteljica.

Kontaminacija hrane vrstom *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes može biti prisutna u mnogim prehrambenim proizvodima, a kontaminacijom su obuhvaćeni uglavnom mliječni proizvodi, meki sirevi, sirevi proizvedeni od nepasteriziranog mlijeka, povrtlarske kulture (celer, kupus, paradajz, salata), ali i sladoled, hot-dog i termički obrađeno meso. Sposobnost rasta sojeva vrste *L. monocytogenes* u blago-kiselim namirnicama pH>5,5 omogućava ovim bakterijama da nasele prehrambeni lanac u kojem se u povoljnijim uslovima sredine brzo razmnožavaju.

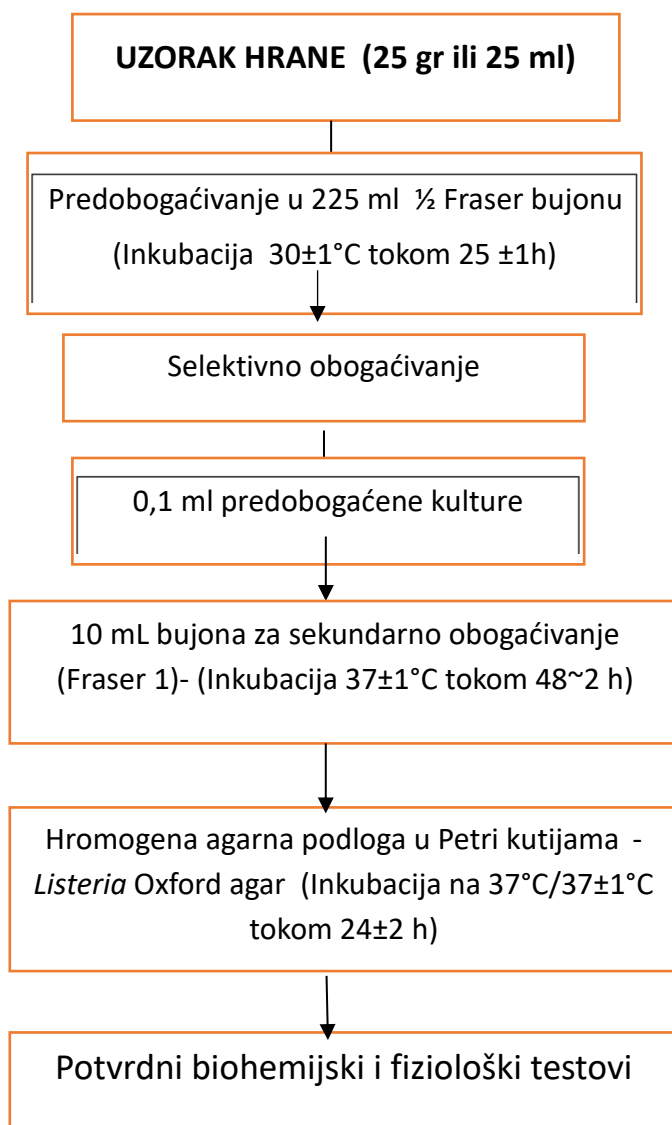
U velikom broju zemalja EU dokazana je učestala izolacija *L. monocytogenes* serotipa 1 iz mesa i prerađevina od mesa (svinjska kobasica, pureće hrenovke, piletina, puretina), dok u namirnicama biljnog porijekla dominiraju drugi sero tipovi. Epidemije listerioze su uglavnom povezane sa konzumacijom mliječnih proizvoda, prvenstveno sirovog i pasterizovanog mlijeka, te mekih sireva. *L. monocytogenes* slabo preživljava u mekim sirevima kao što su kiselinski sirevi, ali dobro u sirevima kao što su Camembert i Brie. Tokom procesa zrenja, upotreba laktata i oslobađanje amina povećavaju površinsku pH i omogućavaju listeriji povoljne uslove za razmnožavanje.

Izolacija Listeria monocytogenes iz uzoraka hrane, EN ISO 11290-1: 2017³ i ISO 11290-2: 2017⁴

Za dokazivanje prisustva vrste *Listeria monocytogenes* u različitim namirnicama u industriji se koristi dvostepeni plan uzorkovanja, obzirom da se radi o striktnom patogenu. Broj analiziranih uzoraka iz jedne proizvodne serije zavisi od vrste namirnice i procjene rizika od kontaminacije vrstom *Listeria monocytogenes*.

Prvi korak u izolaciji i identifikaciji je nasijavanje 25 g/ml uzorka u 225 ml bujona za predobogaćivanje (½ Fraser bujon). Ovaj bujon sadržava polovinu standardne koncentracije nalidiksične kiseline i akriflavina koja je neophodna za selektivnu izolaciju *Listeria monocytogenes*. Inkubacija na

30±1°C tokom 25 ±1h. U drugom koraku se uzima 0,1 mL predkulture iz primarnog ½Fraser bujona i inokulira u 10 mL bujona za sekundarno obogaćivanje (Fraser 1), koji sadržava punu koncentraciju selektivnih komponenti nalidiksične kiseline i akriflavina. Inkubacija 37±1°C tokom 48~2h. Poslije drugostepenog obogaćivanje bakterijska kultura (10µL) iz Fraser 1 bujona se sterilnom mikrobiološkom ezom nanosi na površinu *Listeria* hromogene agarne podloge u Petri kutijama-*Listeria* Oxford agar. Petri kutije se u obrnutom položaju inkubiraju na 37±1°C tokom 24±2 sata i ukoliko je neophodno dodatnih 24 ± 2 sata do pojave pojedinačnih kolonija. Nakon inkubacije se na selektivnim podlogama izdvajaju tipične kolonije *L.monocytogenes* koje imaju crni oreol. Slijede potvrdni testovi: bojenje po Gramu, fermentacija manitola, ramnoze i ksiloze te test pokretljivosti. *Listeria monocytogens* se dokazuje CAMP ogledom kojeg odlikuje rast u obliku kišobrana u testiranju osjetljivosti sa *Staphylococcus aureus* i *Rodococcus equi*.



Grafikon 3. Laboratorijski protokol za selektivnu izolaciju vrste *Listeria monocytogenes* iz uzoraka hrane

Rod *Bacillus*

Vrste roda *Bacillus* pripadaju Gram-pozitivnim štapićastim sporogenim bakterijama, iako ponekad pokazuju Gram-negativnu ili promjenljivu reakciju. Uglavnom su aerobni ili fakultativno anaerobni organizmi te imaju

veoma složenu nomenklaturu koja podliježe brojnim revizijama. Rod sadržava oko 80 vrsta, a jedina vrsta prepoznata kao uzročnik trovanja hranom je *Bacillus cereus*, mada su brojne vrste filogenetski usko povezane sa *B. cereus* i *B. subtilis*.

Bacillus cereus posjeduje karakteristične veoma duge vegetativne ćelije, uobičajene dužine oko 1,0 mm (100 µm), a dužina lanaca je 3,0-5,0 mm. Vrsta *Bacillus cereus* raste u širokom rasponu temperatura 8°-55°C sa optimum 28°-35°C, ne toleriše niske pH vrijednosti sredine (min. 5,0-6,0), a minimalna vrijednost aktiviteta vode neophodna za rast vegetativnih ćelija je 0,95. Spore *B. cereus* su centralno pozicionirane unutar vegetativne ćelije, elipsoidnog su oblika i veoma su rasprostranjene u prirodi (tlo, voda, vegetacija), zbog čega nepromijenjene mogu proći kroz gastrointestinalni trakt ljudi. Različiti sojevi (serotipovi) vrste *B. cereus* se odlikuju neuporedivim stepenima rezistencije na termičke tretmane, zbog čega se termo rezistencija smatra soj specifičnim svojstvom. Poređenjem različitih sojeva uzgojenih u fosfatnom puferu, utvrđeno je da rezistencija spora prilikom termičke obrade na 95°C u velikoj mjeri varira, što je izraženo preko D vrijednosti od 1 min do 36 min.

B. cereus je vrsta odgovorna za dva različita tipa trovanja:

- a) dijarejni sindrom kod kojeg se simptomi bolesti javljaju relativno kasno nakon konzumiranja i
- b) emetički sindrom kod kojeg se simptomi trovanja javljaju ranije.

Simptomi dijarejnog sindroma slični su simptomima trovanja uzrokovanim vrstom *Clostridium perfringens*, a pojavljuju se 8-16h nakon konzumiranja hrane. Karakteristični simptomi dijarejnog sindroma su bol u abdomenu, obilan vodenast proljev te pojačana osjetljivost i disfunkcionalnost rektuma koja traje od 12 do 24h.

Tabela 29. Patogeni koji uzrokuju intoksikacije, (modifikovano prema Hernandez-Cortez i sar., 2017.)

Bakterija	Oboljenje	Vrste kontaminirane hrane
<i>Clostridium botulinum</i>	Paraliza mišića ruku, nogu, trupa i disajnih organa.	Mješavina ulja i neoljuštenog bijelog luka, krompir kuhan na visokim temperaturama i druga termički obrađena hrana.
<i>Bacillus cereus</i>	Dijarejni sindrom Emetički sindrom	Riža kuhana na visokim temperaturama, umaci, supe i pudinzi.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Sindrom toksičnog šoka	Meso i proizvodi od mesa kuhani na visokim temperaturama, meso peradi i salate s majonezom.

Emetički sindrom po simptomima bolesti nalikuje trovanju uzrokovanim vrstom *Staphylococcus aureus*. Kod emetičkog sindroma je kraći period inkubacije u poređenju sa dijarejnim sindromom, obično 30 min-5h, a karakterišu ga mučnina i povraćanje u trajanju 6 -24h.

U znatno manjoj mjeri se kao uzročnici trovanja hranom pominju vrste *B. licheniformis*, *B. pumilis* ili *B. subtilis* koje su filogenetski srodne vrsti *B. cereus*, a smatra se da diferencijalni testovi nisu dovoljno pouzdani za dokazivanje prisustva *Bacillus* spp. u ostacima hrane i/ili kliničkim uzorcima. U zemljama Sjeverne Evrope, najveći broj trovanja se može pripisati *Bacillus* spp., u Norveškoj je u periodu 1988.-1993., od ukupnog broja registrovanih bakterijskih trovanja hranom 33% bilo uzrokovao vrstom *B. cereus*, dok je na Islandu (1985.-1992. godine) isti uzročnik zaslužan 47% trovanja.

Dijarejni i emetički sindrom uzrokuju različiti enterotoksini. Simptom kao što je dijareja je povezan sa proizvodnjom dva enterotoksina u probavnom traktu. Prvi je hemolitički enterotoksin HBL koji se sastoji od tri proteina B, L1 i L2, a drugi je nehemolitički enterotoksin NHE. Pojedini sojevi *Bacillus cereus* proizvode HBL i NHE, dok drugi sadrže gene za proizvodnju samo jednog. Toksini, koji su osjetljivi na termičke tretmane i proteolitičke enzime (tripsin i pepsin) proizvode se u kasnoj eksponencijalnoj fazi rasta ili u ranoj stacionarnoj fazi rasta vrsta *Bacillus* spp. u organizmu domaćina.

Precizni mehanizmi djelovanja ovih toksina su različiti, ali je u osnovi njihovo djelovanje slično kao kod toksina *C. perfringens*, tj. vezuju se na epitelne stanice i ometaju funkciju epitelne membrane. Pretpostavlja se da je primarno proizvodnja toksina u crijevima odgovorna za simptome trovanja, iako je dokazana proizvodnja toksina i u hrani. Zbog velike osjetljivosti na niske pH vrijednosti i proteolitičke enzime želuca, toksinima stvorenim u hrani se ne mogu pripisati simptomi trovanja obzirom na relativno dugo vrijeme inkubacije koje se vezuje za pojavu prvih simptoma trovanja.

Kontaminacija hrane vrstama roda Bacillus

Spore vrste *B. cereus* su otporne na različite nepovoljne faktore sredine (sušenje, termički tretmani –pasterizacija, kuhanje), stoga je neizostavno prisustvo spora u velikom broju namirnica. Uglavnom, ove spore ne dominiraju u ukupnoj mikroflori hrane odnosno nemaju veliku procentualnu zastupljenost, a samim tim ne mogu uzrokovati trovanje. Pasterizacijom ili drugim načinima termičke obrade dolazi do selekcije spora na one koje prežive termičku obradu i one koje se uništavaju termičkom obradom. Dokazana je veća učestalost prisustva vegetativnih formi vrste *B. cereus* u pasteriziranim ili na drugi način termički obrađenim mliječnim proizvodima (obično 35-48% pozitivnih uzoraka) u poređenju sa sirovim mlijekom (9% pozitivno). Brojnost *B. cereus* u pasteriziranom mlijeku ne prelazi (10^3 cfu/ml). Neadekvatno skladištenje pasteriziranog mlijeka ili krema (kajmaka) u neadekvatnim rashladnim uređajima dovodi do rasta populacije i uzrokuje kvarenje poznato pod nazivom "slatki gutljaj" (eng. sweet curdling ili bitty cream).

Mlijeko i mliječni proizvodi rijetko se povezuju sa trovanjima uzrokovanim vrstom *B. cereus*. Iako je mlijeko tečnost koja predstavlja izvrstan medij za rast ovog organizma, postoji objašnjenje zašto je takav medij nepovoljan za proizvodnju toksina. U Švedskoj su rađena istraživanja koja su potvrdila nemogućnost formiranja toksina u mlijeku koje nije dovoljno aerirano, a odnosi se prvenstveno na statička pakovanja mlijeka (tetrapak). Sposobnost spora da preživljavaju isušivanje osigurava

prisustvo sporogenih oblika u suhim proizvodima kao što su žitarice, brašno i mlijeko u prahu.

U norveškim epidemijama korištena je kukuruzna krupica za zgušnjavanje sosa od vanilije. Umjereno zagrijavanje tokom pripreme nije bilo dovoljno za deaktivaciju spora, a pošto je sos naknadno skladišten duže vrijeme na sobnoj temperaturi, visok a_w u sosu pogodio je klijanju spora i rastu bakterija. Emetički sindrom je posebno povezan sa škrobnim proizvodima kao što su riža i tjestenina. U Velikoj Britaniji je dokazana veza između emetičkog sindroma i kuhane riže, a nazvana je soubriquet „sindrom kineskih restorana“. Uobičajni scenarij je priprema većih količina riže unaprijed. Termostabilnije spore *B. Cereus* serotipa 1 preživljavaju prethodno kuhanje, klijanje, rastu i proizvode emetički toksin u proizvodu tokom skladištenja. Navedenu pojavu bi spriječilo hlađenje na temperaturi ispod 8°C, međutim brzina hlađenja u središnjem dijelu veće količine kuhane riže može biti nedovoljno efikasna da spriječi rast i proizvodnju toksina, čak i ukoliko se riža skladišti u frižiderima. Ponovno zagrijavanje riže prije posluživanja neće inaktivirati emetički toksin i doprinijeti mikrobiološkoj ispravnosti proizvoda.

Sa pojavom dijarejnog sindroma se povezuju mesni proizvodi, supe, povrće, pudinzi i umaci. Suhe biljke i začini koji se koriste u pripremi hrane često sadržavaju *B. cereus*, što se navodilo kao razlog relativno visokog procenta trovanja *B. cereus* u Mađarskoj između 1960. i 1968. godine. Noviji podaci upućuju da je zastupljenost trovanja ovom vrstom smanjena, a pretpostavka je da su razlog promjene kulinarske prakse, poboljšanje higijenskih mjera te manja kontaminacija začina. Pite i paste od mesa su izvori kontaminacije drugim vrstama roda *Bacillus* koje uzrokuju trovanja hranom. Peciva, kao što su hljeb i drugi pekarski proizvodi su poznati kao uzročnici brojnih epidemija vrstom *B. subtilis*. Vrsta *B. subtilis* odgovorna je za kvarenje hljeba poznato kao končavost (nitavost) do kojeg dolazi zbog sposobnosti spora da prežive termičku obradu, a manifestuje se degradacijom unutrašnje strukture hljeba i stvaranjem sluzi. Navedeno kvarenje ne sprečava ljude da takav hljeb konzumiraju. Godine 1988. jedna pekara je pustila u prodaju hljeb za koji je tvrdila da u isti nisu dodati konzervansi, smatrajući ga zdravijim za konzumiranje. Deset minuta nakon

konzumiranja nitavog hljeba devet osoba je bilo hospitalizirano sa simptomima kao što su mučnina, povraćanje, proljev, glavobolja i groznica, a mikrobiološkim analizama je u uzorcima hljeba dokazano prisustvo više od 10^8 cfu/gvegetativnih ćelija *B. subtilis*.

Izolacija vrste B.cereus iz uzoraka hrane

Kod izbijanja trovanja hranom uzrokovanog vrstom *Bacillus cereus*, kontaminirana hrana može sadržavati veliki broj ćelija (4×10^5 cfu/g), stoga metode obogaćivanja nisu potrebne. Isto vrijedi i za uzorke fecesa ili želučanog sadržaja, stoga se za izolaciju obično koristi neselektivni medij kao što je krvni agar (ponekad uz dodatak polimixina kao selektivnog sredstva za suzbijanje rasta Gram-negativnih bakterija). *B. cereus* može biti identificiran nakon 24h inkubacije na 37°C zahvaljujući svojoj karakterističnoj morfologiji kolonija koje zauzimaju veliku površinu (3-7 mm promjera), iste su ravne ili blago izdignute, sivo-zelene boje sa karakterističnom granuliranom ili zemljano-staklastom teksturom koja obuhvata i zonu okolo kolonija ili je vidljiva zona β -hemolize. Kako bi se identificirali izolati porasli na krvnom agaru ili ukoliko se izolira mali broj ćelija vrste *B. cereus* iz hrane, potrebno je koristiti selektivniju agarnu podlogu. Predlaže se nekoliko podloga koje imaju veliki broj zajedničkih sastojaka. PEMBA (polimiksin/piruvat/žumance jajeta/manitol/bromotimol-plavilo/agar) se najviše koristi u navedene svrhe, pri čemu je polimixin selektivni sastojak koji ponekad ne može u potpunosti inhibirati rast kvasaca i plijesni iz uzoraka hrane, zbog čega se dodaje aktidion. Na PEMBA agaru, *B. cereus* proizvodi tipične kremaste kolonije koje zadržavaju tirkizno plavu boju pH indikatora (bromotimol plavila), koja je posljedica nemogućnosti fermentacije manitola. Navedene kolonije su okružene zonom precipitata žumanjka zahvaljujući aktivnosti enzima lecitinaze koji je karakterističan za vrstu *B. cereus*. Piruvat u mediju poboljšava reakciju taloženja žumanjka dok nizak sadržaj peptona poboljšava sporulaciju. Nakon izolacije na pomenutoj podlozi prisustvo *B. cereus* se dodatno potvrđuje mikroskopskim metodama i to kombinacijom metoda bojenja spora i bojenja intracelularnih lipida. Kod metode bojenja spora, spore su

obojene zelenom bojom koja čini kontrast u odnosu na crveno obojene vegetativne ćelije. Biohemijska potvrda se može temeljiti na sposobnosti izolata da proizvedu kiselinu iz glukoze, ali ne iz manitola, ksiloze i arabinoze.

Clostridium botulinum

Zbog težine i karakterističnih simptoma, botulizam je najranije opisano bakterijsko trovanje hranom. Rani izvještaji o ovom trovanju su vezani za potrošnju kuhanih, dimljenih ili barenih kobasica, kao i krvavica od svinjskog mesa. Zajedničko svojstvo kobasica je da su sadržavale dijelove crijeva ili druge komponente svinjskog mesa, a ne mišićno tkivo. Termička obrada kobasica je bila preduslov za pojavu bolesti. Kasnije je utvrđeno da pojavu botulizma uzrokuju i drugi neadekvatno termički obrađeni proizvodi (ribe, grah) te da pojava botulizma nije isključivo vezana za konzumaciju mesa i mesnih prerađevina. Vegetativne ćelije vrste *Clostridium botulinum* su Gram-pozitivne štapićaste ili blago zaobljene bakterije veličine 2-10 µm, pokretne zahvaljujući postojanju peritrihnih flagela, striktni su anaerobi, a nakon sporogeneze ovalne spore su unutar vegetativnih ćelija smještene centralno ili subterminalno. Vrsta *Clostridium botulinum* obuhvata veliki broj sojeva, koji se razlikuju po fiziološkim i biohemijskim osobinama. Ova bakterijska vrsta uzrokuje rijetko trovanje hranom-botulizam, koje nastaje kao rezultat unošenja toksina botulina proizvedenog u hrani u kojoj je vrsta *Clostridium botulinum* rasla. Najvažnije zajednička osobina većine sojeva ove vrste je proizvodnja farmakološki sličnih neurotoksina odgovornih za botulizam. Poznata je proizvodnja osam serološki različitih toksina (A, B, C₁, C₂, D, E, F i G, premda C₂ nije neurotoksin), pri čemu je uobičajeno da jedan soj *C. botulinum* proizvodi samo jednu vrstu toksina (iznimke postoje). Za pet od naprijed pomenutih toksina (A, B, E, F i G) evidentna je proizvodnja samo jedne vrste toksina. Tip C predominantno proizvodi C₁ toksin sa manjom količinom C₂ ili samo C₂, dok tip D proizvodi predominantno toksin tipa D uporedo sa manjom količinom C₂ toksina. Fiziološke razlike između sojeva unutar vrste *C. botulinum* uslovile su podjelu na četiri grupe, a navedeno je potvrđeno molekularnim metodama

zasnovanim na homologiji DNK gena i sekvenciranju ribozomalnih RNK gena.

Grupi I pripadaju sojevi *C. Botulinum* uporedo sa sojevima filogenetski usko povezane vrste *C. sporogenes*, koji su odgovorni za sve poznate vrste botulizma: botulizam uzrokovan hranom, dojenački ili infantilni botulizam i botulizam uzrokovan infekcijom rane. Grupi I pripadaju izuzetno proteolitički sojevi, a često se njihovo prisustvo u hrani može primjetiti zbog djelimične razgradnje proizvoda ili blago užegle i/ili siraste arome. Sojevi grupe I proizvode toksine dovoljne jačine u namirnicama, koji unošenjem u organizam sa hranom izazivaju trovanja. Grupa I stvara neurotoksine tipa A, B i/ili F koji se odlikuju najvećom rezistencijom na termičke tretmane, pri čemu je za proizvodnju toksina ključna neadekvatna termička obrada namirnica. U ovom slučaju pravovremeno naknadno hlađenje takvih proizvoda ne može spriječiti proizvodnju toksina u hrani.

Sojevi iz grupe II predstavljaju rizik u zaleđenim ili pothlađenim proizvodima (na temperaturama frižidera), za razliku od sojeva grupe I. Sojevi *C. botulinum* grupe II nisu proteolitički, rastu i proizvode toksin do temperature 30°C, a njihove spore nisu rezistentne na visoke temperature. Često je proizvodnja toksina inhibirana visokim koncentracijama soli u proizvodu, a usporen rast sojeva i proizvodnja toksina na nižim temperaturama je u korelaciji sa drugim ograničavajućim faktorima rasta. Ustanovljeno je, da svi sojevi grupe II posjeduju samo po jedan gen odgovoran za proizvodnju toksina i proizvode tipove neurotoksina B, E ili F. Da bi došlo do proizvodnje toksina kod sojeva grupe II, proizvod je neophodno skladištiti 1-3 mjeseca na temperaturi 3,3°C, proizvodnja toksina se može ubrzati na nešto višim temperaturama. U istraživanjima u kojima je 100 spora *C. Botulinum* grupe II inokulirano u vakuum pakovane haringe hlađene na 5° C, proizvodnja toksina je dokazana nakon 15 dana.

Sojevi iz grupe III proizvode toksine tipa C i D, koji su obično povezani sa oboljenjima životinja i ptica. Upitna je uloga toksina tipa G kao uzročnika botulizma kod ljudi, kao i njegova proizvodnja u hrani.

Sojevi iz grupe IV uporedo sa netoksigenim vrstama klostridija proizvode toksine tipa G, a isti su reklasificirani u novu vrstu *Clostridium argentinense*.

Vrsta *C. botulinum* je u osnovi saprofit koji obitava u zemljištu i zagađenoj vodi, ali je i normalni stanovnik probavnog trakta ptica i sisara. U europskim zemljištima sojevi *C. botulinum* tipa B suviše su zastupljeni od sojeva *C. botulinum* tipa A.

Botulizam uzrokovan toksinom-botulinom tipa A, B ili E je najučestaliji, dok su trovanja uzrokovana drugim tipovima botulina veoma rijetka. U kliničkoj praksi su prepoznate tri vrste botulizma: botulizam uzrokovan hranom, dojenački ili infantilni botulizam i botulizam uzrokovan infekcijom rane.

Botulizam uzrokovan hranom je primjer bakterijskog trovanja hranom u najužem smislu, a nastaje kao rezultat unošenja u organizam egzotoksina-botulina kojeg proizvodi bakterija *Clostridium botulinum* u hrani. U ogledima sa životinjama je dokazano da simptomi botulizma uzrokovanog hranom zavise od količine toksina unesenog u organizam. Jedini jasan simptom botulizma je paraliza mišića. Mehanizam dejstva botulina, zasniva se na njegovom učešću u blokadi sekrecije pojedinih neurotransmitera. Prvi simptomi botulizma se javljaju od 8h do 8 dana, a najčešće od 12 do 48h nakon unošenja hrane koja je sadržavala toksinu organizam. Rani simptomi su: povraćanje, konstipacija (zatvor), zadržavanje urina, zamućen vid i dupla slika, otežano gutanje, suhoća usta i otežan govor. Oboljela osoba izgubi svijest kad razvoj bolesti dovede do zastoja srca ili respiratornih organa, a navedeno se obično javlja 1-7 dana od pojave prvih simptoma oboljenja. Stopa smrtnosti obično je visoka (20-50%) u nerazvijenim zemljama i (5-10%) u razvijenim zemljama. Neurotoksin tipa A dovodi do većeg postotka smrtnosti od neurotoksina tipova B ili E. Toksini se proizvode tokom logaritamske faze rasta ćelija *Clostridium botulinum* u hrani, a iz ćelije se oslobađaju nakon liziranja (ugibanja) ćelija.

Dojenački ili infatilni botulizam se razlikuje od klasičnog uzrokovanog hranom obzirom da kod dojenačkog botulizma *C. botulinum* kolonizira crijeva i proizvodi toksin *in situ*. Uglavnom se bolest pojavljuje kod dojenčadi starosti od 2 sedmice do 6 mjeseci, ukoliko se koristi dohrana koja ne podrazumijeva mlijeko. U ranoj fazi razvoja dojenčeta mikroflora probavnog trakta nije u potpunosti razvijena i nije sposobna izlučiti uzročnika iz organizma. U slučaju dojenačkog botulizma, toksin nije unešen

u organizam već spore *C. botulinum*, pri čemu spore mogu dospjeti u organizam dojenčeta i iz životne sredine. Stoga je bitno dojenče hraniti dohranom koja ne podstiče rast *C. botulinum*, kao što je npr. med, smatra se nedodopustivim prehranjivati djecu mlađu od 12 mjeseci medom.

Kontaminacija hrane vrstom *Clostridium botulinum*

Minimalna pH vrijednost na kojoj vrsta *C. botulinum* može rasti u velikoj mjeri zavisi od ostalih faktora sredine kao što su temperatura, aktivitet vode, itd. Ustanovljeno je da pH vrijednost oko 4,7 predstavlja apsolutni minimum, a navedena činjenica ima praktični značaj za industriju konzervi. Ne-proteolitički sojevi *C. botulinum* su manje tolerantni na kiselu sredinu i općenito ih inhibira pH 5,0-5,2. Postoje podaci o rastu pojedinih sojeva *C. Botulinum* i proizvodnji toksina pri pH vrijednostima nižim od 4,0 u mediju koji je sadržavao visok sadržaj proteina, a navedeno nema nikakve važnosti za kiselu konzerviranu hranu koja ima nizak sadržaj bjelančevina. Pojava botulizma uzrokovana konzumiranjem konzerviranog voća je povezana sa rastom pH vrijednosti u proizvodu koji je sadržavao visoku brojnost kvasaca i plijesni. Maksimalna pH vrijednost na kojoj je moguć rast je 8,5-8,9, a toksin je nestabilan u alkalnoj sredini.

Epidemije botulizma povezuju četiri zajedničke osobine:

- 1) Hrana je kontaminirana sporama ili vegetativnim ćelijama *C. botulinum* na farmi ili tokom prerade.
- 2) Hrana se prerađuje termičkom ili nekom drugom obradom, koja sprječava rast konkurentnih mikroorganizama, a u normalnim okolnostima bi također trebala inhibirati ili kontrolirati rast *C. botulinum*.
- 3) Fizičko-hemijski faktori rasta u hrani (temperatura, pH, Eh, a_w) moraju biti prikladni su za rast *C. botulinum*.
- 4) Hrana se konzumira hladna ili nakon blage termičke obrade, koja nije dovoljna da inaktivira toksin.

Budući da jako-kisele konzervirane prerađevine mogu ispuniti sve gore navedene kriterije, industrija konzervi je uvela stroge mjere kontrole

procesa proizvodnje kako bi se osigurala stabilnost proizvoda. Ukoliko se konzerviranje hrane radi u domaćinstvu, ne primjenjuju se adekvatne mjere kontrole što može predstavljati potencijalni problem. U Sjedinjenim Američkim Državama i u Velikoj Britaniji je dokazano da je pojava botulizma vezana za konzerviranje povrća u domaćinstvima, dok je komercijalno proizvedeni hrana u zadnjih 100 godina gotovo bezbjedna. Ribe mogu biti kontaminirane s *C. botulinum* tip E iz vodene sredine, a nedovoljno termički obrađeni riblji proizvodi su vezani za nekoliko epidemija uzrokovanih *C. botulinum* tip E.

Staphylococcus aureus

Ova bakterijska vrsta je uzročnik jednog od najčešćih trovanja koja se prenose hranom. *S. aureus* je vrsta koja u povoljnim uslovima rasta proizvodi jedan ili više toksina, a period inkubacije do pojave simptoma zavisi od količine unijetog toksina. Mala koncentracija enterotoksina može izazvati trovanje, tako je na primjer, kontaminacija industrijski proizvedenog čokoladnog mlijeka sa 0,5 ng/mL enterotoksina izazvala epidemiju.

S. aureus proizvodi različite toksine. Stafilokokni enterotoksini pripadaju grupi pirogenih toksina, a obuhvataju devet termostabilnih serotipova enterotoksina (super antigeni). Pirogeni toksini mogu izazvati imunosupresiju i nespecifičnu proliferaciju T ćelija. Enterotoksini su veoma stabilni i otporni na visoke temperature i na isušivanje (što omogućava prisustvo istih u industrijskim proizvodima). Proteolitički enzimi (pepsin i tripsin) uz nisku pH vrijednost želuca ne inhibiraju enterotoksine *S. aureus*, što doprinosi učestalim trovanjima.

Mehanizam prema kojem dolazi do trovanja još nije sasvim jasan. Međutim, uočeno je da enterotoksini direktno utiču na intestinalni epitel i vagusni nerv koji izaziva stimulaciju emetičkog centra. Procjenjuje se da 0,1 µg enterotoksina može izazvati stafilokokno trovanje kod ljudi. Osim što izaziva trovanje, *S. aureus* može uzrokovati i sindrom toksičnog šoka izazvanog toksinom 1 (TSST-1) i enterotoksinom tipa B.

Simptomi trovanja uključuju mučninu, povraćanje, grčeve u stomaku, a može se javiti i proljev. Prva tri simptoma su najčešća. Obično je ovo trovanje samoograničavajuća bolest i prođe sama u periodu od 24 do 48h, ali može postati ozbiljna, posebno kod djece, starijih i imunokompromitiranih osoba. Sindrom toksičnog šoka karakteriše visoka temperatura, hipotenzija, eritematozni osip (slično šarlahu), ljuštenje kože tokom oporavka, simptomi slični gripi, povraćanje i dijareja).

Kontaminacija hrane vrstom *Staphylococcus aureus*

U stafilokokne epidemije su uključeni prehrambeni proizvodi u kojima *S. aureus* može optimalno rasti i obično se takvi proizvodi čuvaju na sobnoj temperaturi do konzumiranja (meso i prerađevine, perad i jaja, mlijeko i prerađevine, salate i pekarski proizvodi punjeni kremom, kolači i sendviči).

Drugi faktori koji se moraju uzeti u obzir su pojava sojeva koji su rezistentni na meticilin, a izolovani su iz hrane (uglavnom iz mesa i mlijeka). Oboljenja uzrokovana konzumiranjem hrane koja sadržava enterotoksin se mogu spriječiti, obzirom da je optimalna temperatura za rast i proizvodnju enzima između 6 i 46°C. Kako bi se spriječili slučajevi stafilokoknog trovanja neophodno je prehrambene proizvode termički obrađivati na temperaturama iznad 60 °C i obavezno do upotrebe hladiti u frižideru na temperaturama ispod 5 °C. Održavanje hladnog lanca tokom proizvodnje i prerade hrane može spriječiti rast *S. aureus*. Primjena dobre proizvođačke i higijenske prakse može spriječiti kontaminaciju ovom bakterijskom vrstom.

Clostridium perfringens

Clostridium perfringens je Gram-pozitivna, štapičasta, anaerobna i sporogena bakterija koja tvori ovalne subterminalne spore. Mikroskopski se razlikuje se od većine klostridija po relativno dugim štapičastim ćelijama, dužine (1,3-19µm), koje su u vegetativnom obliku inkapsulirane i nepokretne. Radi se o katalaza-negativnom anaerobnom organizmu, koji

preživljava i ponekad raste u prisustvu kiseonika. Raspon temperatura rasta 12-50°C, rast je optimalan na 43-47 °C te vrlo spor ispod 20 °C. Vegetativne ćelije nisu acido tolerantne (minimalni pH 5, optimalno 6-7,5), dok je minimalni a_w za rast 0,95-0,97 i ne raste u prisutvu 6% soli. Vegetativne ćelije su osjetljive na termičku obradu D vrijednost u govedini (60°C -nekoliko minuta), dok je D vrijednost spora soj specifična i varira na 100°C u rasponu 0,31 min-38 minuta.

C. perfringens tip A je široko rasprostranjen u okolišu, a u zemljištu se duže zadržava od ostalih tipova B, C, D i E, koji su obvezatni životinjski paraziti i imaju ograničenu distribuciju. Ovaj organizam se može izolirati iz vode, sedimenta, prašine, sirove i prerađene hrane te uobičajeno naseljava ljudski gastrointestinalni trakt, a broj spora 10^3 - 10^4 cfu/g je uobičajen u izmetu zdravih osoba.

Vrsta *Clostridium perfringens* se klasificira u pet podvrsta, koje se označavaju od A do E, a klasifikacija je zasnovana na proizvodnji četiri glavna egzotoksina, a, b, e, i osam manjih egzotoksina. *C. perfringens* tip A je uzročnik trovanja hranom i plinske gangrene, a proizvodi jedan toksin koji posjeduje lecitinaznu aktivnost (fosfolipaza C).

Sposobnost ovog toksina da hidrolizira lecitin i neke druge fosfolipide igra važnu ulogu u patogenezi plinskih gangrena, jer kada napada ćelijske membrane uzrokuje lokalni poremećaj tkiva u rani uslijed čega dolazi do apsorpcije toksina, a isti cirkuliše krvotokom uzrokujući ozbiljnu toksikonemiju. Ova pojava nema nikakvu ulogu u trovanjima hranom. *C. perfringens* tip A je drugi uzročnik bakterijskih trovanja hranom, odmah poslije roda *Salmonella* u Velikoj Britaniji. *C. perfringens* tip C proizvodi a i b toksine koji se smatraju uzročnicima nekroze unutrašnjih organa, a radi se o izuzetno teškoj i rijetkoj bolesti u kojoj b toksin oštećuje crijevnu mukozu i izaziva nekrozu. Javlja se u nerazvijenim zemljama, te kod osoba sa određenim tipovima dijabetesa.

Tabela 30. Patogeni koji uzrokuju toksiko-infekcije, (modifikovano prema Hernandez-Cortez i sar., 2017).

Bakterija	Oboljenje	Vrste kontaminirane hrane
<i>Escherichia coli</i> O157: H7	Hemoragijski kolitis, hemolitički uremijski sindrom kod djece	Hamburgeri, nepasterizovano mlijeko, kontaminirana voda, špinat i salata.
<i>Shigella</i> spp.	Hemolitički uremijski sindrom	Salate, zelena salata, sirovo povrće i mlijeko.
<i>Aeromonas</i> spp.	Meningitis, peritonitis, miokarditis, hemolitički uremijski sindrom, nekrotizirajući fascitis mekih tkiva i fascija	Meso (govedina, ovčatina, svinjetina i piletina), povrće, jaja, ribe, plodovi mora i termički obrađena hrana.
<i>Cronobacter sakazakii</i>	Trajni neurološki ili razvojni deficiti, smrtni ishod	Formule (hrana) u prahu za dojenčad
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Gastroenteritis, septikemija i infekcije rana. Teške infekcije kod osoba oslabljenog imuniteta	Sirova ili nedovoljno kuhana morska hrana, obično kamenice.
<i>Clostridium perfringens</i>	Klostridijalni nekrotizirajući enteritis	Mesni bujoni, čorbe, kuhani grah, termički obrađeno meso na visokim temperaturama.
<i>Campylobacter</i> spp.	Kampilobakterioza, artritis, meningitis, vrsta <i>Campylobacter jejuni</i> može uzrokovati Guillain-Barré sindrom	Sir proizveden od sirovog mlijeka i pileće meso
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Jersionioza, enterokolitis, upala slijepog crijeva, mezenterijski limfadenitis, infekcije rana, zglobova i urinarnog trakta, te Reiterov sindrom.	Nepasterizirano mlijeko, tofu, nehlorisana voda, nedovoljno kuhano meso, kamenice i ribe
<i>Vibrio cholerae</i> serogrupa O1 ili serogrupa O139	Kolera	Zagađena voda i sirovi plodovi mora
<i>Vibrio cholerae</i> serogrupa no-O1	Slabije izraženi simptomi oboljenja u poređenju sa kolerom; infekcije probavnog sistema, sepsa.	Sirova, polupreradena ili rekontaminirana hrana nakon kuhanja.

Kontaminacija hrane bakterijskom vrstom *Clostridium perfringens*

Vegetativni i sporogeni oblici *Clostridium perfringens* su izolovani iz mnogih namirnica, posebno crvenog mesa, mesa peradi i morske hrane. Osim povrća i voća, u koje spore dolaze iz tla, hrana životinjskog porijekla sporama se kontaminira tokom klanja. Suhe namirnice (npr. začini) su velika izvorišta *Cl. perfringens*, a do trovanja najčešće dolazi nakon konzumiranja kuhanog mesa koje je hlađeno polako ili je stajalo duži vremenski period na sobnoj temperaturi prije služenja. Trovanje uzrokovano bakterijom *Clostridium perfringens* može se spriječiti stalnim sanitarnim mjerama kao i primjenom odgovarajućih temperatura skladištenja ($<2^{\circ}\text{C}$) hrane. Namirnice koje se koriste tople treba čuvati na temperaturama višim od 60°C . Ostatke hrane trebalo bi ponovo zagrijati na $>60^{\circ}\text{C}$ prije serviranja kako bi se uništile vegetativne ćelije *Cl. perfringens*.

Izolovanje i identifikacija *Clostridium perfringens*

Za izolaciju i identifikaciju *Clostridium perfringens* uzima se 1 ml odgovarajućeg razrjeđenja uzorka hrane i u sterilnoj epruveti zagrijava 10 minuta na 80°C . Nakon toga se u epruvetu nalijeva otopljeni i na 45°C ohlađeni sulfitni agar tako da stub ne bude niži od 14cm. Podloga se inkubira na temperature od 37°C u trajanju od 3-5 dana. Sulfitni agar je selektivna podloga koja sadrži natrijum sulfit (Na_2SO_3). *Clostridium perfringens* i druge sulfo redukujuće klostridije imaju sposobnost razlaganja natrijum sulfita u natrijum sulfid (Na_2S) koji se jedini sa solima željeza, stvarajući FeS , zbog čega su kolonije ovih klostridija crno obojene. Ako se u dubini epruveta pojave crne kolonije, iste se koriste za pravljenje mikroskopskog preparata, i bojepo Gramu. Nalaz Gram pozitivnih štapićastih bakterija ukazuje na prisustvo sulfito redukujućih klostridija u uzorku hrane. Ove se kolonije također nasijavaju i na krvni agar. Odsustvo rasta na krvnom agaru je dokaz da se radi o sulfito redukujućim klostridijama.

Rod *Aeromonas*

Rodu *Aeromonas* pripadaju Gram-negativne, katalaza-pozitivne, oksidaza-pozitivne i glukoza fermentirajuće štapičaste bakterije. Pokretljivost vrstama iz ovog roda obezbjeđuju polarne flagele. Vrstu *A. hydrophila* inhibira koncentracija soli ($>0,5\%$), kisela sredina (min. pH 6,0), dok je optimalna temperatura rasta oko $28\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pojedini sojevi imaju sposobnost rasta pri jako niskim temperaturama $0,11\text{ }^{\circ}\text{C}$, a najvažnija staništa ovih organizama su vodene sredine (slatkovodna jezera, potoci, sistemi otpadnih voda). U otpadnim vodama koje su relativno bogate nutrijentima brojnost ovih organizama dostiže 10^8 cfu/ml. Vrsta *A. hydrophila* nije rezistentna na hlor, a obzirom da se razmnožava pri niskoj razini nutrijenata ponekad ju je moguće dokazati u vodi porijeklom iz gradskih vodovoda. Vrste iz roda *Aeromonas* se mogu izolirati iz velikog broja sirovih namirnica (meso, meso peradi, sirovo mlijeko, salata, voda, ribe), a obitavaju i u želucu ljudi i drugih životinja. Pothlađivanje sirovog mesa i mlijeka ne može spriječiti razvoj kvarenja, jer se aeromonadi razmnožavaju na temperaturama frižidera. Iako ne preživljavaju kuhanje, unakrsna kontaminacija hrane aeromonadima je često prisutna uslijed kontakta termički obrađene sa termički neobrađenom hranom ili kontaminiranom vodom.

Kontaminaciju hrane mogu uzrokovati vrste roda *Aeromonas* (uglavnom *A. hydrophila*, uz mali udio *A. caviae* i *A. sobria*), iako se u osnovi ove bakterije ne smatraju patogenim. Sve veća potrošnja pothlađene ili zaleđene hrane uzrokovala je povećanu zainteresovanost za bakterijske vrste koje obitavaju na niskim temperaturama. U tom slučaju je rod *Aeromonas* od drugorazrednog značaja u poređenju sa striktnim patogenim vrstama *Listeria monocitogenes*, *Plesiomonas* i *Yersinia enterocolitica* koje su primarni kontaminanti hrane pri niskim temperaturama.

Taksonomija ovog roda nije završena, ali je opšteprihvaćena podjela roda *Aeromonas* na dvije glavne grupe:

- a) Salmonicida, predstavnik ove grupe je nepokretna vrsta *Aeromonas salmonicida* uz još nekoliko podvrsta i

- b) *Hydrophila-Punctata*, obuhvata pokretne vrste, od kojih su najznačajnije *A. hydrophila*, *A. sobria* i *A. caviae*.

A. salmonicida nije patogen ljudi, već uzrokuje oboljenja slatkovodnih riba u ribogojilištima, a navedeno predstavlja važan ekonomski problem za uzgajivače. Vrste roda *Aeromonas* koje su navedene kao predstavnici grupe *Hydrophila*, uzrokuju sekundarne gastrointestinalne infekcije, koje se obično dešavaju kod osoba narušenog imuniteta ili nastaju kao posljedica nezgoda prilikom kupanja u moru kroz oštećenja na koži. Ne postoje pouzdani dokazi o sposobnosti roda *Aeromonas* da uzrokuje gastroenteritis kod zdravih pojedinaca, ali je istraživanjima na Tajlandu potvrđeno da aeromonadi mogu uzrokovati „putničku dijareju“. Navedeni epidemiološki nalazi su jedini dokazi da aeromonadi uzrokuju infekcije, dok dokazi iz drugih izvora nisu bili zadovoljavajući. U ogledu u kojem je učestvovalo 50 volontera hranjenih obrocima kontaminiranim sa 5^{10} do 10^{10} cfu/gr ćelija *A. hydrophila*, dijareja se pojavila kao indikator trovanja samo kod dva volontera, iako je akutna dijareja registrovana kod osobe koja je greškom tokom rada u laboratoriju unijela 10^9 cfu/gr ćelija *A. hydrophila*.

Sposobnost nekih sojeva da rastu pri vrlo niskim temperaturama inkubacije može dovesti do kontaminacije i prisustva velikog broja aeromonada na maloj površini u hladnjačama, što predstavlja veliku prijetnju od kvarenja pothlađenog mesa. Činjenica je da ne preživljavaju kuhanje ni pri najnižim temperaturama, ali može doći do unakrsne (sekundarne) kontaminacije sa termički neobrađenih namirnica ili iz kontaminirane vode.

A. hydrophila uzrokuje gastroenteritis kod djece mlađe od pet godina. Radi se o blagoj i samo-ograničavajućoj formi gastroenteritisa, pri čemu se javlja obilan vodenast proljev bez povraćanja. Vrste *A. hydrophila* i *A. sobria* proizvode potencijalno virulentne citotoksične i citotonične enterotoksine, dok većina kliničkih izolata ove dvije vrste proizvodi aerolizin, termolabilni, β -hemolitički, citotoksični enterotoksin, koji se odlikuje molekulskom masom od 52 kDa. Do danas su opisana tri citotonična enterotoksina čije djelovanje podsjeća na toksin kolere.

Izolacija i identifikacija Aeromonas spp.

Kada je u uzorku prisutan mali broj ćelija *Aeromonas spp.* koristi se medij za obogaćivanje kao što je alkalizirana peptonska voda, a kod velike brojnosti aeromonada u uzorku osnovno razblaženija uzorka se izravno nasijava na agrarnu podlogu. Vrste koje se nalaze unutar grupe *Hydrophila* rastu na velikom broju enteričkih medija, ali često dolazi do njihove pogrešne identifikacije pri čemu se identificiraju kao 'koliformi', obzirom da mnogi sojevi mogu fermentirati laktozu. Najveći broj sojeva fermentira ksilozu što se često koristi u diferencijalnim medijima za razlikovanje aeromonada od koliforma. Selektivnost medija se povećava dodatkom žučnih soli te ampicilina, tako je u široj upotrebi ampicilin škrobna agarna podloga i ampicilin krvni agar. Navedene kombinacije se koriste i u komercijalnim podlogama za izolaciju i identifikaciju aeromonada. Na ovim uzgojnim medijima se pojavljuju karakteristične kolonije aeromonada. Porasle kolonije se morfologijom razlikuju od ostalih kolonija i oksidaza su pozitivne, a pripadnost vrsti se utvrđuje serijom biohemijskih testova.

Faktori rizika i preventivne mjere koje se koriste kako bi se spriječili slučajevi trovanja hranom

Kod bakterijskog trovanja hranom, glavni faktor rizika je sama kontaminacija hrane patogenim i toksikogenim bakterijama. Djeca, starije osobe, trudnice i imuno-kompromitirane osobe su najviše podložni trovanju hranom. Pored navedenog za pojavu i razvoj oboljenja veliku ulogu imaju pojedinačni faktori kao što su dob, spol, mjesto stanovanja, socioekonomski status. Kontaminacija može nastupiti u bilo koje vrijeme tokom proizvodnje, prerade i potrošnje hrane (od njive do trpeze). Do kontaminacije dolazi u različitim fazama proizvodnje hrane počevši od primarne proizvodnje (ratarstva, povrtlarstva, voćarstva, stočarstva, akvakulture) preko industrijske proizvodnje (prerade, pakovanja) i marketinga (prodajna mjesta) te prilikom distribucije do krajnjeg potrošača (domaćinstva, menze i restorani). Osviješteni proizvođači u primarnoj proizvodnji mogu izbjeći kontaminaciju primjenom dobre proizvođače

prakse (GMP) kako bi se spriječila kontaminacija zrakom, vodom ili prirodnim đubrivima. Primjena neadekvatnih prirodnih đubriva ili vode kontaminirane kanalizacijom prilikom navodnjavanja može biti glavni uzrok onečišćenja sirovina fekalnim bakterijama na farmi.

Čuvanje i priprema hrane kod krajnjih potrošača (domaćinstva, menze i restorani) uključuje adekvatno skladištenje hrane, tj. slijeđenje mjera sigurnosti kod hlađenja ili zaleđivanja hrane, dok se prilikom termičke obrade mora voditi računa o temperaturi i vremenu izlaganja. Ovim se obezbjeđuje kontrola svih parametara, jer je kod pripreme hrane neophodno uzeti u obzir fizičke, kemijske i mikrobiološke karakteristike svake vrste hrane (a_w , pH, vrste mikroorganizama, broj mikroorganizama). Pored navedenog Pravilnik o mikrobiološkoj ispravnosti hrane, Sl. glasnik BiH 11/13., posebno razmatra mikrobiološke parametre kvaliteta hrane s obzirom na upotrebnu kategoriju (prerađena, pakirana ili gotova hrana) te rok trajanja.

U svim fazama prehrambenog lanca neophodno je koristiti zdravstveno ispravnu čistu vodu za piće i sanitarne uslove, jer voda može biti glavni izvor kontaminacije hrane. Ovo se posebno odnosi na pranje i pripremu hrane (rukovanje hranom), u navedenoj fazi nadležni Institut mora potvrditi da voda zadovoljava fizikalne, kemijske i mikrobiološke kriterije kvaliteta.

Do mikrobiološke kontaminacije može doći izravnim kontaktom ili kroz zrak, pribor, kontaktne površine ili ruke, iz tog razloga hrana pripremljena za jelo mora fizički odvojiti od sirove ili neprerađene hrane. Unutar prehrambenog lanca prijevoz hrane uključuje važne faktore rizika kao što su temperatura, izravno izlaganje suncu, vlažnost i strujanje zraka. U ovoj fazi, tip kontejnera i vrsta ambalaže također igraju važnu ulogu. Uslovi prijevoza bi trebali biti odabrani na osnovu karakteristika hrane koja se prevozi.

Bakterije se mogu razmnožavati u različitim uslovima sredine, zato su sveprisutne u životnoj sredini. Faktori koji utiču na brzinu razmnožavanja bakterija se dijele na unutrašnje i vanjske. Pojedini uslovi sredine pospješuju rast i razmnožavanje bakterija (prisustvo nutrijenata, visok sadržaj vlage,

niska kiselost, više temperature, duže vrijeme manipulacije/skladištenja/čuvanja i aerobni uslovi). Poznavanje i izbjegavanje tih optimalnih uslova može pomoći u kontroli rasta bakterija, širenju bakterijskih infekcija i učestalosti trovanja hranom.

4. 3. LITERATURA

1. Abarca, M.L., Bragulat, M.R. Castella, G., Cabanes, F.J.: (1994): Ochratoxin production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*, *Appl. Environ. Microbiol.* 60; 2650--2652
2. Adams, M.R., Moss, M.O. (2008) Food Microbiology. Guildford, UK: The Royal Society of Chemistry, UK.
3. Agencija za sigurnost hrane Bosne i Hercegovine (2012): Smjernice za uzorkovanje i mikrobiološko ispitivanje hrane u okviru službenih kontrola. https://www.fsa.gov.ba/old/images/izdavacka/bs-Smjernice_za_uzorkovanje_i_mikrobiolo%C5%A1ko_ispitivanje_hrane_u_okviru_slu%C5%BEbenih_kontrola.pdf.
4. Alonso, V. A., González, Pereyra, M. L., Armando, M. R., Dogi, C. A., Dalcero, A. M., Rosa, C. A. R., Chiacchiera, S. M., Cavaglieri, L. R. (2011): Silage contribution to aflatoxin B1 contamination of dairy cattle feed, U: *Aflatoxins – Detection, Measurement and Control*. DOI: 10.5772/22136.
5. Andreu, Cecilia (2021) Microbiological Aspects of Food Contamination, *Applied Microbiology: Open Access*, Vol.7 Iss.11 No:1000220.
6. Asefa, D.T., Kure, C.F., Gjerde, R.O., Langsrud, S., Omer, M.K., Nesbakken, T., Skaa, r I. (2011): A HACCP plan for mycotoxigenic hazards associated with dry-cured meat production processes. *Food Control*, 22, 831-837.
7. Ayejuyo, O. O., Olowu, R. A., Agbaje, T. O., Atamenwan, M., Osundiya, M. O. (2011): Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of aflatoxin B1 in groundnut and cereal grains in Lagos, Nigeria. *Research Journal of Chemical Sciences*, 1(8), 1-5.
8. Batt, C.A. (2014) *Bacillus cereus*, In *Encyclopedia of Food Microbiology*

(Second Edition), pp. 124-128.

9. Battilani, P, Rossi, V, Giorni, P, Pietri,, A, Gualla A, van der Fels-Klerx, HJ, Booij, CJH, Moretti, A, Logrieco, A, Miglietta, F, Toscano, P, Miraglia, M, De Santis, B, Brera, C. (2012): Scientific report submitted to EFSA. Modelling, predicting and mapping the emergence of aflatoxins in cereals in the EU due to climate change. EFSA.
10. Bennett, J. W., Klich, M. (2009): Mycotoxins. *Encyclopedia of Microbiology* (Third Editjon), 559-565.
11. Bilandžić, N., Božić,, Đ., Đokić M., Sedak, M., Solomun Kolanovi, B., Vareninan I., Cvetnić Ž. (2014): Assessment of aflatoxin M₁ contamination in the milk of four dairy species in Croatia. *Food control*, 43, 18-21.
12. Bilandžić, N., Božić, Đ., Đokić, M., Sedak, M., Solomun Kolanović, B., Varenina, I., Tanković, S., Cvetnić, Ž. (2014) : Seasonal effect on aflatoxin M₁ contamination in raw and UHT milk from Croatia, *Food Control* 40, 260–264.
13. Boudram, H., Barnouinm, J., Dragaccim, S., Morgavim, D. P. (2007): Aflatoxin M₁ and ochratoxin A in raw bulk milk from French dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 90(7), 3197–3201.
14. Brydenm, W. L. (2012): Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. *Animal Feed Science and Technology*, 173, 134-158.
15. Colak, H. (2007): Determination of Aflatoxin M₁ Levels in Turkish White and Kashar Cheeses Made of Experimentally Contaminated Raw Milk. *Journal Of Food And Drug Analysis* 15 (2), 163-168.
16. Centers for Disease Control and Prevention (2016) *Listeria* (Listeriosis). Available from: <https://www.cdc.gov/listeria/index.html>.
17. Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15, November, 2005. on microbiological criteria for foodstuffs (Text with EEA relevance).
18. Decastelli, L., Lai, J., Gramaglia, M., Monaco, A., Nachtmann, C., Oldano, F., Ruffer, M., Sezian, A., Bandirola, C. (2007): Aflatoxins occurrence in milk and feed in Northern Italy during 2004–2005. *Food Control*, 18, 1263–1266.

19. De Jesus, C.L., Bartley, A., Welch, A., Berry, J. (2018): High Incidence and Levels of Ochratoxin A in Wines Sourced from the United States. *Toxin*, 10, 1, 1-12.
20. Delaš, F. (2010): Mikrobni toksini U: Hengl. B. (ed): Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani, str. 31-49. *Hrvatska agencija za hranu, Osijek, Hrvatska*.
21. Deveci, O. (2007): Changes in the concentration of aflatoxin M1 during manufacture and storage of White Pickled cheese. *Food Control* Vol. 18, 1103–1107.
22. Dorner, J. W. (2008): Management and prevention of mycotoxins in peanuts. *Food Additives and Contaminants Part A*, 25, 203-208.
23. EC (2017) DIRECTORATE-GENERAL FOR HEALTH AND FOOD SAFETY; Overview report Mitigation Measures in Place for *Campylobacter* spp. in Poultry; *DG Health and Food Safety, Ref. Ares(2017)5924645 - 04/12/2017; pages 32-34*. http://ec.europa.eu/dgs/health_food-safety/index_en.htm.
24. European Food Safety Authority (EFSA) (2013): Technical Report. Aflatoxins (sum of B1, B2, G1, G2) in cereals and cereal-derived food products, *Supporting Publications 2013: EN-406, Parma, Italy*.
25. Frece, J., Markov, K., Kovačević, D. (2010): Određivanje autohtone mikrobne populacije i mikotoksina te karakterizacija potencijalnih starter kultura u slavonskom kulenu. *Meso XII* (2), 92-98.
26. Grass, J.E., Gould, L.H., Mahon, B.E. (2013) Epidemiology of foodborne disease outbreaks caused by *Clostridium perfringens*, Unites States, 1998-2010. *Foodborne Pathogens and Disease*;10(2):131-136. DOI: 10.1089/fpd.2012.1316.
27. Gillasp, A.F. and Iandolo, J.J. (2014) *Staphylococcus*/Introduction, In *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*, p. 482-486.
28. HAH-Hrvatska Agencija za hranu (2018): Znanstveno mišljenje o deoksinivalenolu (DON) i njegovim derivatima (3-acetil-DON. 15-acetil-DON. DON-3-glikozid) u žitaricama i proizvodima od žitarica.
29. Hammami, W., Thani, R., Fiori, S., Al-Meer, S., Atia Atia, F., Rabah, D., Migheli, Q., Jaoua, S. (2017): Patulin and patulin producing *Penicillium* spp. occurrence in apples and apple-based products including baby food. *J.Infect. Dev. Ctries*. 11(4):343-349.

30. Herzallah, S. M. (2009): Determination of aflatoxins in eggs, milk, meat and meat products using HPLC fluorescent and UV detectors. *Food Chemistry*, 114(3), 1141–1146.
31. Hildebrandt, G. (2014) Sampling Plans on Microbiological Criteria, In *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*, pp.353-359.
32. Hocking, A.D. (2014) Fungi/Foodborne Fungi, In *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*, pp. 68-75.
33. ISO 11290-1:2017 Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. — Part 1: Detection method.
34. ISO 11290-2:2017 Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. — Part 2: Enumeration method.
35. ISO 6579-1:2017 Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* — Part 1: Detection of *Salmonella* spp..
36. Jenson, I. (2014) *Bacillus cereus*/ Detection by Classical Cultural Techniques, In *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*, pp. 135-143.
37. Johnson, E.A. (2014) *Clostridium*/ *Clostridium botulinum*, In *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*, pp. 458-462.
38. Krska, R., Schubert-Ulrich P., Molinell, A., Sulyok, M., McDonald, S., Crews, C. (2008): Mycotoxin analysis: an update. *Food Additives and Contaminants Part A*, 25, 152-163.
39. International Agency for Research on Cancer (1993): Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans: some naturally occurring substances, food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins; Vol. 56, 397-344. IARC, Lyon, France.
40. Jay, J. M., Loessner, M.J., Golden, D.A. (2005): *Modern Food Microbiology, Seventh Edition*. Springer.
41. Maria Helena Iha, Cynara Baltazar Barbosa, Isaura Akemi Okada, Mary W. Trucksess (2013): Aflatoxin M1 in milk and distribution and stability

- of aflatoxin M₁ during production and storage of yoghurt and cheese. *Food Control* 29 1-6.
42. Kamkar, A, Karim, G., Aliabadi, FS., Khaksar, R. (2008): Fate of aflatoxin M₁ in Iranian white cheese processing. *Food and Chemical Toxicology* Vol. 46, 2236–2238.
 43. Kocić-Tanackov, S.D., Dimić, G.R. (2013): Gljive i mikotoksini – kontaminanti hrane, *Hem. Ind.* 67, 639–653.
 44. Jeličić, I., Božanić, R., Krčmar, N. (2009): Primjena HACCP sustava u proizvodnji UHT steriliziranog mlijeka. *Mljekarstvo* 59 (2), 155-175.
 45. Sassahara, M., Pontes Netto, D., Yanaka, E.K. (2005): Aflatoxin occurrence in foodstuff supplied to dairy cattle and aflatoxin M₁ in raw milk in the North of Paraná state. *Food Chemical Toxicology* 43, 981-984.
 46. Manetta, AC., Giammarco, M., Di Giuseppe, L., Fusaro, I., Gramenzi, A., Formigoni, A., Vignola, G., Lambertini, L. (2009): Distribution of aflatoxin M₁ during Grana Padano cheese production from naturally contaminated milk. *Food Chemistry* Vol.113, 595–599.
 47. Markov, K., Pleadin, J., Bevardi, M., Vahčić, N., Sokolić- Mihalek, D., Frece, J. (2013): Natural occurrence of aflatoxin B₁, ochratoxin A and citrinin in Croatian fermented meat products. *Food Control*, 34, 312-317.
 48. Schalch, B., Messelhäusser, U., Fella, C., Kämpf, P., Beck, H. (2014): National legislation, Guidelines&Standards governing Microbiology/European Union, In *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*, pp.907-910.
 49. Stephard, G. S., Berthiller, F., Burdaspal, P., Crews, C., Jonker, M. A., Krska, R., MacDonald, S., Malone, B., Marago, C., Sabino, M., Solfrizzo, M., Van Egmond, H. P., Whitaker (2011): Developments in mycotoxin analysis: an update for 2009-2010. *World Mycotoxin Journal*, 4, 3-28.
 50. Markov, K., Frece, J., Čvek, D., Lovrić, N., Delaš, F (2010): Aflatoksin M₁ u sirovom mlijeku i vezanje aflatoksina pomoću bakterija mliječne kiseline. *Mljekarstvo* 60 (4), 244-251.
 51. Milicevic, D.; Spiric, D.; Jankovic, S.; Velebit, B.; Radicevic, T.; Petrovic, Z.; Stefanovic, M. Aflatoxin M₁ in processed milk: Occurrence and seasonal variation with an emphasis on risk of human exposure in Serbia. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* 2017, 85.

52. Motawee, MM., McMahon, DJ. (2009): Fate of aflatoxin M1 during Manufacture and Storage of Feta Cheese. *Toxicology and Chemical Food Safety* Vol 74, No. 5, 42-45.
53. Nevin, S.(2009) The knowledge and practice of food safety by young and adult consumers. *Food Control*.;20(6):538-542.
54. Zdolec, N., Hadžiosmanović, M., Kozačinski, L., Cvrtila, Ž., Filipović, I. (2006): Ostatci biološki štetnih tvari umlijeku. *Mljekarstvo* 56 (2), 191-202.
55. Pleadin, J., Vulić, A., Perši, N., Škrivanko, M., Capek, B., Cvetnić, Ž. (2014): Aflatoxin B1 occurrence in maize sampled from Croatian farms and feed factories during 2013. *Food Control*, 40, 286-291.
56. Pleadin, J., Vulić, A., Perši, N., Škrivanko, M., Capek, B., Cvetnić, Ž. (2015): Annual and regional variations of aflatoxin B1 levels seen in grains and feed coming from Croatian dairy farms over a 5-year period. *Food Control*, doi: 10.1016/j.foodcont.2014.07.017, in press.
57. Pleadin, J., Vulić, A., Zadavec, M., Lešić, T., Benić, M., Jaki Tkalec, V., Vahčić, N. (2017): Presence of *Fusarium* mycotoxins in feedstuffs and cow milk sampled.
58. Prandini, A., Tansini, G., Sigolo, S., Filippi, L., Laporta, M., Piva, G. (2009): On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 984-991.
59. Puel, O., Galtier, P. & Oswald, I.P. (2010): Biosynthesis and Toxicological Effects of Patulin. *Toxins*, Vol. 2, pp. 613-631.
60. Sears, C.L., Kaper, J.B. (1996): Enteric bacterial toxins: Mechanisms of actions and linkage to intestinal secretion. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*.;60:167-215.
61. Stephard, G. S., Berthiller, F., Burdaspal, P., Crews, C., Jonker, M. A., Krska, R., MacDonald, S., Malone, B., Maragos, C., Sabino, M., Solfrizzo, M., Van Egmond, H. P., Whitaker, T. (2011): Developments in mycotoxin analysis: an update for 2009-2010. *World Mycotoxin Journal*, 4, 3-28.
62. Šefer, D., Radulović, S., Petrujkić, B., Marković, R., Popović, M. (2014): Mikotoksini-hazard u lancu ishrane. *Zbornik radova 4. Simpozijum – Bezbednost i kvalitet namirnica animalnog porekla*, 6.-7. novembar, Beograd, 19-30.

63. Tekinsen, KK, Eken, HS. (2008): Aflatoxin M1 levels in UHT milk and kashar cheese consumed in Turkey. *Food and Chemical Toxicology* Vol. 46, 3287–3289.
64. Todar, K. Todar's Online Textbook of Bacteriology. Bacterial Protein Toxins 2008- 2012. [Internet]. Available from: <http://textbookofbacteriology.net/proteintoxins.html> [Accessed: February 2017].
65. Völke, I., Schröer-Merker, E., Czerny, CP. (2011): The Carry-Over of Mycotoxins in Products of Animal Origin with Special Regard to Its Implications for the European Food Safety Legislation. *Food and Nutrition Sciences*, 2, 852-867.
66. Weidenbörner, M. (2013): *Mycotoxins in Foodstuffs*, Springer Science-Business Media, LLC, New York. DOI: 10.1007/978-1-4614-8727-2.
67. World Health Organization (2015): WHO Estimates of the Global Burden of Foodborne Diseases: Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group 2007-2015. Switzerland: *WHO Library Cataloguing-in-Publication Data*; 2015. pp.61-89.
68. World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations (2009): *Codex Alimentarius*. 4th ed. Rome: 2009. p. 125.
69. World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations (2017): *Codex Alimentarius*. Normas Internacionales de Alimentos [Internet]. Available from: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-home/es/> [Accessed: February 2017].

5. KONTAMINANTI KOJI NASTAJU TOPLOTNOM OBRADOM HRANE

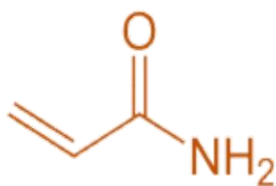
Teorijski posmatrano, sve namirnice se podvrgavaju nekakvom tretmanu. Tretman namirnica uključuje svaki postupak koji mijenja ili pretvara sirov biljni ili životinjski materijal u sigurnu, jestivu i senzorno prihvatljivu namirnicu. Različite pojave koje se odigravaju za vrijeme pripreme, prerade i čuvanja hrane su veoma složene, uslijed hemijske heterogenosti namirnica i kompleksnih reakcija koje rezultuju iz interakcija osnovnih nutrijenata. Bez prerade hrane bilo bi nemoguće zadovoljiti nutritivne potrebe urbanog stanovništva, a izbor namirnica bi bio ograničen i sezonski uslovljen.

Najstariji tradicionalni tretmani su dimljenje, sušenje na suncu, usoljavanje. Fermentisanje i smrzavanje su odavno uobičajeni tretmani. Konzervisanje, pasterizacija i sterilizacija se decenijama primjenjuju i još uvijek su značajne tehnike savremene prehrambene industrije. Novi trendovi za dobijanjem manje tretirane hrane se ogledaju u primjeni tzv. netermičkih tretmana odnosno minimalnih tehnika procesuiranja.

Toplotni tretman hrane dovodi do formiranja proizvoda koji utiču na ukus, aromu, fiziološki aktivnih jedinjenja, na smanjenje nutritivne vrijednosti namirnica, kao i na formiranje toksičnih potencijalno kancerogenih jedinjenja, kao što je akrilamid.

5.1. AKRILAMID

Proizvodnja akrilamida u industrijske svrhe započela je 1954. godine. Konvencionalni proces industrijske proizvodnje započinje hidracijom akrilonitrila sulfatnom kiselinom uz prisutnost soli bakra koje služe kao katalizatori. Kao produkt nastaje otopina akrilamid sulfat, koja se neutralizira amonijakom. Iz nastale otopine ekstrahira se akrilamid koji se potom hladi i izolira kao kristalni monomer (Slici 27).



Slika 27. Hemijska struktura molekule akrilamida

Akrilamid se već dugi niz godina primjenjuje u brojnim industrijama-kozmetičkoj, industriji za proizvodnju papira, boja, ljepila, plastike, organskih kemikalija, kao i u tretmanima obrade otpadnih i pitkih voda u svrhu uklanjanja čvrstih čestica iz vode. O akrilamidu se više počelo govoriti od 2002. godine kada je u sklopu istraživanja, koje su provodili naučnici Sveučilišta u Štokholmu, u saradnji sa Švedskom agencijom za hranu (*engl. National Food Agency, NFA*) otkrivena njegova prisutnost u hrani bogatoj škrobom obrađenoj pri visokim temperaturama.

Zdravstveni rizici

Glavno pitanje, od globalnog interesa, odnosi se na unos akrilamida putem uobičajene prehrane, a gdje bi takav unos mogao dovesti do štetnih utjecaja po ljudsko zdravlje, posebno potencijalno povećati rizik od nastanka raka. Kako se akrilamid dugi niz godina koristi kao industrijska hemikalija, njegova toksikološka djelovanja su opsežno proučavana. Zbog svoje male molekulske mase, brzo i lako se apsorbira u crijevima, te se putem krvi distribuira po organizmu. U ćeliji se metabolizira uz citohrome P450 do glicidamida, koji je pokazao kancerogenost u studijama na životinjama, prvenstveno glodavcima, uz ograničene studije na primatima, koristeći veće doze od onih koje su uobičajene za prosječnu izloženost ljudi putem prehrane, a što je i karakteristično za takve studije. Takva istraživanja na glodavcima dokazala su da je akrilamid prouzrokovao maligne promjene na štitnjači, testisima, mliječnim žlijezdama, plućima i mozgu. IARC je klasificirao akrilamid kao materiju koja je „vjerojatno

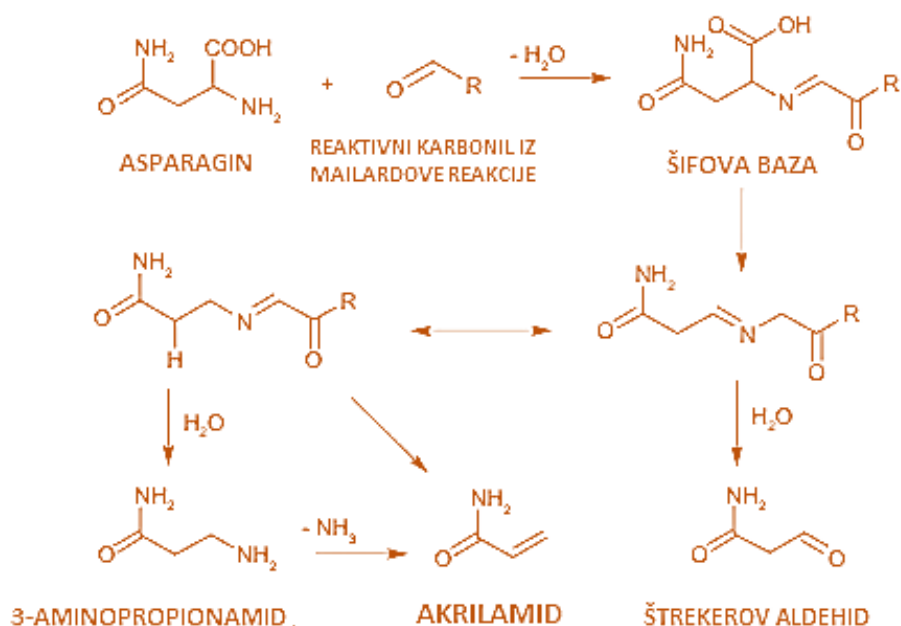
kancerogena za ljude“, a temeljem studija na životinjama. Akrilamid je pokazao genotoksičnost u nizu ispitivanja te je akutni neurotoksin. Međutim, gotovo je sigurno da je izloženost akrilamidu iz namirnica koje ga sadrže, daleko niža od izloženosti koja je potrebna da bi došlo do neurotoksičnosti. Kao što je prethodno spomenuto, primarni metabolit akrilamida je glicidamid. To je epoksid koji lako reagira s DNA. Ovo naravno podiže zabrinutost oko potencijalne genotoksičnosti. Ipak, do sada nije prikupljeno dovoljno podataka da bi se dokazala kancerogenost ili genotoksičnost kod ljudi preko količina akrilamida sadržanih u uobičajenoj prehrani. Prema Evropskoj agenciji za sigurnost hrane (EFSA), prerađeni krompir zajedno s kafom, i hrana na bazi žitarica (kolačići, krekeri, žitarice za doručak i zapečeni hljeb) glavni su izvori izloženosti akrilamidom u prehrani.

Formiranje akrilamida u hrani

Akrilamid u hranu ne dolazi kao kontaminant iz okoliša, već se u hrani formira pri povišenim temperaturama i uslovima niske vlažnosti iz njenih prirodno prisutnih sastojaka.

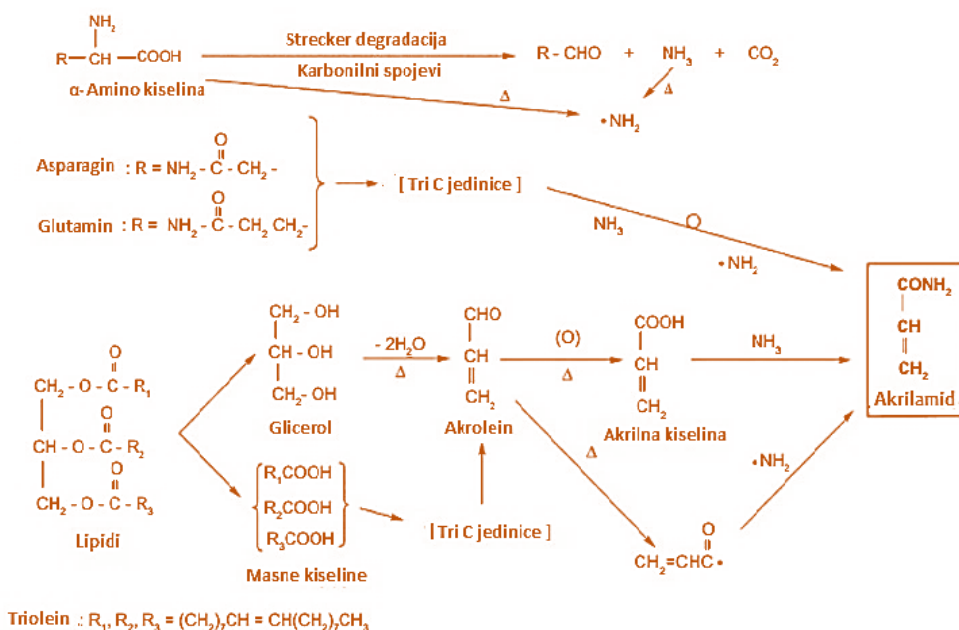
Glavnina akrilamida u hrani nastaje Maillardovom reakcijom, koja se odvija između slobodne aminokiseline (asparagin) i redukujućih šećera (uglavnom glukoze i fruktoze) tokom određenih toplotnih obrada hrane (prženje, pečenje), a koje rezultiraju pojavom melanoidnih pigmenata koji su odgovorni za smeđu boju, kod pržene i pečene hrane. Nastajanje akrilamida može se odvijati slijedećim mehanizmima:

- Kondenzacijom asparagina i glukoze, pri čemu na početku Maillard-ove reakcije nastaje N-glikozilasparagin koji se smatra prekursorom nastanka akrilamida.
- Strecker-ova reakcija asparagina i nastajanje Strecker-ovog aldehida.
- Dekarboksilacija asparagina pri čemu nastaje 3-aminopropjonamid, koji tokom zagrijavanja prelazi u akrilamid (Slika 28).



Slika 28. Predloženi mehanizam formiranja akrilamida u termički obrađenoj hrani (Vleeschouwer i sar., 2007)

Iako, formiranje akrilamida u hrani ima svoje glavne rute kroz asparagin i redukujuće šećere, u literaturi su opisani i neki drugi mehanizmi formiranja akrilamida preko akroleina, akrilne kiseline i amonijaka. U odsutnosti asparagina, akrolein i amonijak igraju važnu ulogu za formiranje akrilamida u namirnicama bogatim lipidima (Slika 29), koje su podvrgnute visokoj temperaturi. Poznato je da akrolein i akrilna kiselina nastaju degradacijom lipida, a amonijak u namirnicama nastaje deaminacijom aminokiselina ili Strecker-ovom degradacijom.



Slika 29. Predloženi mehanizam formiranja akrilamida od aminokiselina i lipida (Krishnakumar i Visvanathan, 2014)

Inicijalna istraživanja pokazala su da hrana bogata ugljikohidratima, koja je podvrgnuta visokim temperaturama (iznad 120°C) predstavlja glavni izvor akrilamida. Akrilamid se, također, formira u prženom krompiru i na temperaturama ispod 120°C, pri niskom udjelu vlage i dužem vremenu zagrijavanja. Dakle, povoljni uslovi za nastanak ove štetne supstance u hrani su visoka temperatura i niska vlažnost, a reakcija se prvenstveno odvija na površini zagrijavane namirnice. Npr. akrilamid u hljebu se prvenstveno formira u kori, uz vrlo male ili nikakve koncentracije u sredini hljeba. Kuhanje i mikrovalno zračenje dovode do nastanka znatno manjih količina akrilamida i može se reći da su tako nastale količine akrilamida zanemarive s obzirom na one nastale pečenjem i prženjem.

Količina akrilamida koji se stvara tokom procesa proizvodnje hrane ne ovisi samo o sirovini, (npr. proizvodi od bijelog brašna sadrže znatno manje akrilamida od protuvrijednosti proizvoda od integralnog brašna) nego i o metodama i stepenu prerade hrane. Posebno rizičnom hranom pokazao se krompir, zbog visokog udjela asparagina (kojeg u krompiru ima oko 40 % od

ukupnih aminokiselina, a uz to prilikom čuvanja krompira pri temperaturama ispod 10 °C dolazi do akumulacije redukujućih šećera (glukoze i maltoze). Za pržene krompire (čips, kroketi) ispostavilo se da mogu sadržavati 3000 ili čak i više od 4000 µg/kg ovog kontaminanta (Tabela 31).

Tabela 31. Otkriveni nivo akrilamida u odabranim skupinama namirnica
(Bala, 2012)

Skupina namirnica	Koncentracija akrilamida (µg/kg)
Čips od krompira	117 - 4215
Pomfrit	59 – 5200
Pekarski proizvodi i keks	18 – 3324
Hljeb	< 10- 397
Žitarice za doručak	< 10 - 1649
Čokoladni proizvodi	< 2 - 826
Pržena kafa	45 – 935
Instant kafa	87 - 1188

Osim temperature, na količinu nastalog akrilamida utječu i drugi parametri kao što su: udio suhe materije, količina prekursora (asparagina i reducirajućih šećera), samo porijeklo namirnice klimatski i agronomski uslovi rasta, skladištenje namirnica i drugi. Iz navedenih razloga, slične ili identične vrste proizvoda iz iste vrste sirovine (pogotovo krompira) mogu se velike razlikovati po sadržaju akrilamida (Tabela 32).

Tabela 32. Analitički rezultati ispitivanja koncentracije akrilamida u hrani
različitog porijekla za 2013. godinu (HAH⁷, 2014)

Prehrambeni proizvod	Zemlja porijekla	Indikativna vrijednost za akrilamid ($\mu\text{g/kg}$)	Koncentracija akrilamida ($\mu\text{g/kg}$)
Pomfrit	Hrvatska	600	177
Bijeli hljeb	Hrvatska	80	29,5
Kroketi od krompira	Nizozemska	1000	99,7
Pomfrit	Nizozemska	600	353
Kroketi od krompira	Hrvatska	1000	134
Dvopek	Hrvatska	450	73,9
Slani štapići	Hrvatska	500	148
Kukuruzni hljeb	Hrvatska	150	50,4
Pomfrit	Poljska	600	286
Ekspresso kafa	Italija	900	160
Mljevena kafa-Jubilarna	Hrvatska	450	155
Keksi sa maslacem	Njemačka	500	74,4
Kokice	Italija	1000	128
Pop Corn	Češka	1000	128
Kreker	Njemačka	500	76,6
Polubijeli hljeb	Hrvatska	80	< 10
Mješavina mljevene kafe	Hrvatska	450	180
Kroketi od krompira	Belgija	1000	197
Žitarice za doručak	Poljska	200	14,3
Čips slani	Hrvatska	1000	201
Čips slani	Austrija	1000	60
Žitni musli	Hrvatska	1000	120
Čips okus paprike	Hrvatska	1000	101
Musli fitness	Francuska	1000	86,4

Uočeni različiti udjeli akrilamida u istoj vrsti hrane, ali različitog proizvođača (npr. čips) ukazuju da udio akrilamida ovisi i o varijacijama u obradi hrane

⁷ HAH - Hrvatska agencija za hranu

kao što su: temperatura obrade hrane, vrijeme obrade hrane, porijeklo ulja ili masti, porijeklo hrane.

Moguća uloga masti u sintezi akrilamida se i danas intenzivno ispituje. Prije svega, najveće koncentracije akrilamida u namirnicama se generalno stvaraju tokom termičke obrade prženjem. Naknadne studije su se bazirale na pitanja, kako utiču različite vrste ulja na sintezu akrilamida u namirnicama. Obzirom da se ulja razlikuju prema koeficijentu provodljivosti toplote (KPT), prženjem u ulju sa većim KPT formira se deblja kora što za posljedicu ima formiranje veće količine akrilamida.

Istraživanja su pokazala da su pronađene koncentracije akrilamida u hrani daleko ispod indikativnih vrijednosti (u prosjeku za 79% niže), koje često nisu niti blizu sigurnosnog praga. Procjena izloženosti akrilamidu napravljena je u nekoliko zemalja. Tako se za Francusku, Njemačku, Nizozemsku, Norvešku, Švedsku, Veliku Britaniju i SAD odredila izloženost koja ima raspon od 0.3 do 3.2 $\mu\text{g/kg TM}^8/\text{dan}$ uz značajne varijacije u procjenama. Djeca, zbog svoje manje tjelesne mase, mogu biti izložena akrilamidu u koncentracijama većim za 2 do 3 puta s obzirom na odrasle. Iako se procjena izloženosti može napraviti na različite načine, te iako se prehrabene navike razlikuju među pojedinim državama, srednja vrijednost izloženosti se može postaviti na 0.4 $\mu\text{g/kg/TM}/\text{dan}$, a prosječna izloženost visokih konzumenata na oko 1 $\mu\text{g/kg/TM}/\text{dan}$.

Jedna švicarska studija, procijenila je unos akrilamida prema dnevnim obrocima. Tako su zaključili da se doručkom unosi 8% od ukupnog dnevnog unosa akrilamida, ručkom 21%, večerom 22%, 13% užitkom te 36% ispijanjem kave. Kasnije su rezultati ove studije korigirani, ali je i dalje ostao visok unos akrilamida putem kafe (22%) (SFOPH, 2002) Ovo ukazuje na činjenicu da, iako neka određena namirnica sadržava visoki udio akrilamida, ne mora biti glavni izvor izloženosti, ako se ne konzumira u velikim količinama.

⁸ TM – tjelesna masa

Mliječni proizvodi, meso, riba i morski plodovi su namirnice sa najmanjim sadržajem akrilamida, zbog toga što u njima nedostaje prekursor za njegovo nastajanje.

Akrilamid je uopšteno prehrambeni problem, tj. ne odnosi se samo na neke kategorije namirnica. Drugim riječima, problem izloženosti se ne može riješiti izbjegavanjem nekih namirnica. Npr., u SAD-u se procjenjuje da hrana koja sadrži akrilamid doprinosi dnevnom unosu kalorija u udjelu od 38%, 33% u udjelu ugljikohidrata, 36% u udjelu prehrambenih vlakana te više od 25% u udjelu značajnog broja mikronutrijenata. Ovo svakako treba uzeti u obzir zbog razloga što se naglasak najčešće stavlja na konzumiranje snek proizvoda (čips, grickalice i sl.) kao glavnih izvora akrilamida iz prehrane.

Preventivne mjere

Iako izmjerene koncentracije u hrani ne predstavljaju prijetnju za zdravlje ljudi, mora se obratiti pažnja na radnje koje mogu utjecati na smanjeni nastanak akrilamida u gotovom proizvodu. Reducirajući šećeri (glukoza i fruktoza), te asparagin su prirodne komponente biljaka i sirovina biljnog porijekla. Posebno su zastupljeni u žitaricama i krompirima. Dokazano je da su redukujući šećeri ograničavajući faktor u formiranju akrilamida u krompirima, dok je asparagin ograničavajući faktor u proizvodima od žitarica. Shodno tome, korištenje sorti s promijenjenim hemijskim sastavom, odnosno manjom količinom šećera, doprinosi smanjenom nastanku akrilamida. Kod odabira sorti krompira, pazi se na sadržaj šećera, a kod uzgoja se koristi više azotnog đubriva, koje pogoduje povećanju sadržaja proteina i smanjenju količine šećera.

Kod prženih prerađevina od krompira, postoji više faktora na koje se može uticati. Metoda koja se može primijeniti u industriji je blanširanje, koje, u kombinaciji s primjenom organskih kiselina, može smanjiti količinu akrilamida i do 70%. Sušenjem krompira prije prženja također se smanjuje količina akrilamida, jer se smanjuje vrijeme potrebno za prženje.

Ključna tačka u kontroli količine akrilamida je temperatura prženja, pa je maksimalna preporučena temperatura 175°C. Ako je moguće, preporučuje se vakuum prženje, koje snižava temperaturu prženja, a samim time i sadržaj akrilamida. Nadalje, odgovarajućim odabirom ulja i dodataka u ulju moguće je smanjiti količinu akrilamida (dokazano je da polifenoli u ulju pogoduju smanjenju sadržaja akrilamida u gotovom proizvodu). Utjecaj antioksidansa na formaciju akrilamida, manifestuje se u „hvatanju“ slobodnih radikala, tj. intermedijera Maillardovih reakcija. Dodatak prirodnih vodenih ekstrakata zelenog čaja, origana i cimeta (1 g/L), tokom 1 minute, utječe na smanjenje stvaranja akrilamida, u prženom krompiru za 17%.

Kod proizvoda od žitarica, kod kojih količina asparagina ima znatno veću ulogu u nastajanju akrilamida, moguće je korištenje žitarica sa smanjenom količinom proteina. U preradi kod fermentiranih proizvoda od žitarica (kruh, peciva), preporučuje se produženje perioda fermentacije ili vođenje kisele fermentacije, što može smanjiti količinu akrilamida i do 70%. Kod biskvita i krekeri, preporučuje se zamjena amonij hidrogen karbonata (NH_4HCO_3) s natrij hidrogen karbonatom (NaHCO_3) te zamjena šećernih sirupa (glukozni ili fruktozni) sa saharozom.

Analitičke tehnike za određivanje akrilamida u hrani

Tokom godina razvile su se nove laboratorijske metode otkrivanja nivoa koncentracija akrilamida u hrani, s povećanom osjetljivošću uz precizno i brzo detektiranje količina akrilamida u hrani. Većina analitičkih metoda za akrilamid usvaja sličan pristup: ekstrakcija u čvrstoj fazi i određivanje pomoću gasne hromatografije spojene sa masenom spektroskopijom (GC / MS) nakon bromiranja, ili direktnim mjerenjem tekućom hromatografijom povezanom s masenom spektroskopijom (LC / MS).

5.2. HETEROCIKLIČNI AROMATSKI AMINI

Heterociklični aromatski amini (HAAs) su štetna jedinjenja, koja se nalaze u toplotno obrađenom mesu, i mesnim proizvodima. Zbog velikih varijacija u prehrambenim navikama, metodama pripreme i učestalosti konzumacije mesa, značajno je procijeniti tačnu količinu HAAs, u mesu i proizvodima od mesa, u svrhu razumijevanja povezanosti unosa obrađenog mesa i zdravstvenih rizika.

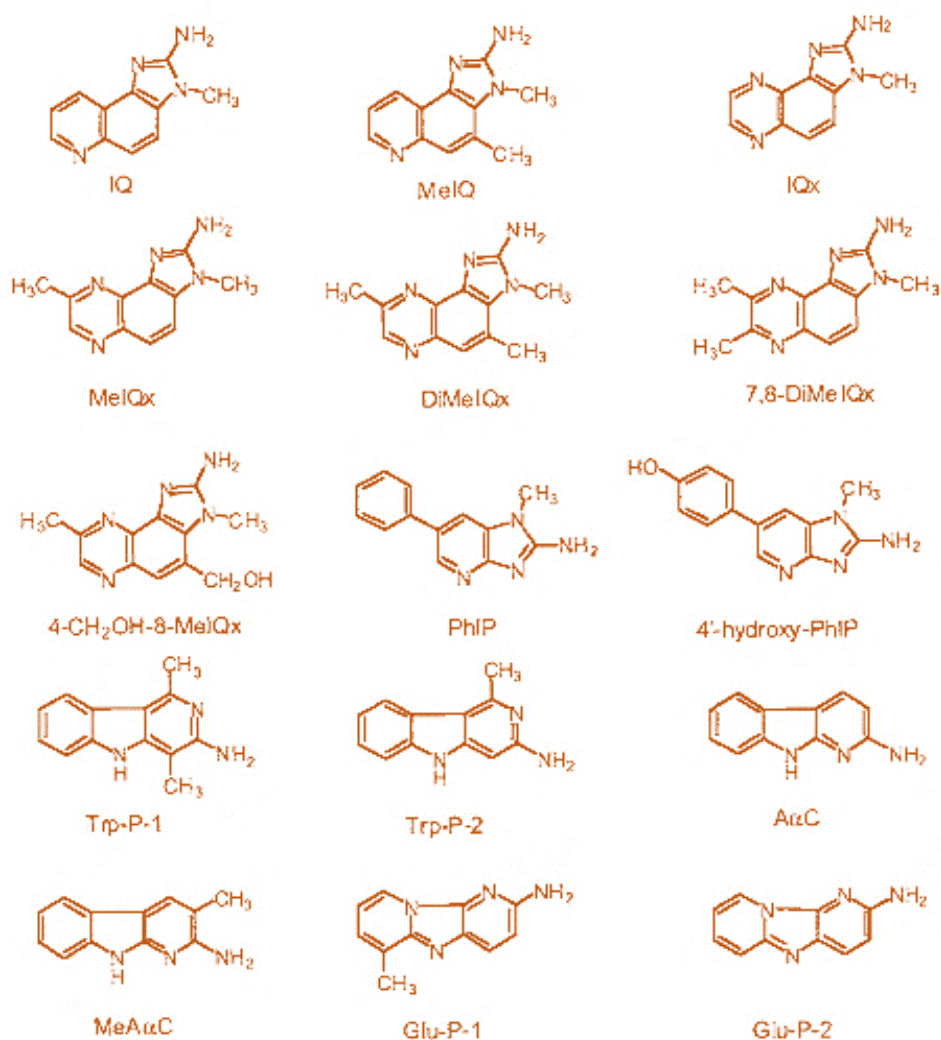
Ovu skupinu toksičnih jedinjenja prvi put su otkrili Japanski naučnici 1977. godine u ugljenisanoj površini pečene i grilovane ribe, a mogu se na sličan način detektovati u kišnici, kondenzatu dima cigareta. Neki individualni HAAs detektovani su i u česticama iz ispušnih plinova.

Postoje dvije klase HAAs: aminoimidazoazoreni (AIAs) i aminokarbolini (ACs) (Tabela 33). Prema hemijskom ponašanja HAAs, su grupisani kao polarni (AIAs zajedno s γ -karbolinima: Glu-P-1 i Glu-P-2) i nepolarni (svi ostali) HAAs.

Generalno, HAAs se formiraju tokom toplotne obrade hrane, uglavnom životinjskog porijekla, koja sadrži izvore azotnih jedinjenja (proteini i kreatin). HAAs koji se formiraju na temperaturama između 100 i 300 °C se nazivaju „termički“ HAAs, tipa IQ (AIA). Iznad 300°C dolazi do pirolize proteina i pojedinačnih aminokiselina i nastaju HAAs koji su poznati kao „pirolitički“ HAAs ili HAAs ne-IQ-tipa.

Tabela 33. Klase HAAs

<i>Skraćenica</i>	<i>Ime jedinjenja</i>
<u>AMINOIMIDAZOAZARENI (AIA) ILI „TERMIČKI“ HAAs</u>	
IQ	2-amino-3-metilimidazo [4,5-f]-kinolin
MeIQ	2-amino-3,4-dimetilimidazo [4,5-f]-kinolin
IQ[4,5-b]	2-amino-1-metilimidazo [4,5-b]- kinolin
IQx	2-amino-3-metilimidazo [4,5-f] -kinoksalin
MeIQx	2-amino-3,8-dimetilimidazo [4,5-f] -kinoksalin
4,8-DiMeIQx	2-amino-3,4,8-trimetilimidazol [4,5-f] -kinoksalin
7,8-DiMeIQx	2-amino-3,7,8-trimetilimidazo [4,5-f] -kinoksalin
4,7,8-TriMeIQx	2-amino-3,4,7,8-tetrametilimidazo [4,5-f] –kinoksalin
4-CH ₂ OH-8-MeIQx	2-amino-4-hidroksimetil-3,8-dimetilimidazo [4,5-f]-kinoksalin
IgQx	2-amino-1-metilimidazo [4,5-g] –kinoksalin
7,9-DiMeIQx	2-amino-1,7,9-trimetilimidazo [4,5-g] –kinoksalin
PhIP	2-amino-1-metil-6-fenilimidazo [4,5-b] –piridin
4'-OH-PhIP	2-amino-1-metil-6- (4-hidroksifenil) -imidazo [4,5-b] –piridin
DMIP	2-amino-1,6-dimetilimidazo [4,5-b] –piridin
TMIP	2-amino-3,5,6-trimethylimidazo [4,5-b] –piridin
IFP	2-amino-1,6-dimethylfuro [3,2-c] imidazo [4,5-b] –piridin
<u>AMINOKARBOLINI (Acs) ILI „PIROLITIČKI“ HAAs</u>	
AaC	2-amino-9H-pirido [2,3-b] indol
MeAaC	2-amino-3-metil-9H-pirido [2,3-b] indol
Trp-P-1	3-amino-1,4-dimetil-5H-pirido [4,3-b] indol
Trp-P-2	3-amino-1-metil-5H-pirido [4,3-b] indol
Harman	1-metil-9H-pirido [3,4-b] indol
Norharman	9H-pirido [3,4-b] indol
Glu-P-1	2-amino-6-methyldipyrido [1,2-a: 3', 2'-d] imidazol
Glue-P-2	2-aminodipyrido [1,2-a: 3', 2'-d] imidazol
Phe-P-1	2-amino-5-fenilpiridin
Orn-P-1	4-amino-6-metil-1H-2,5,10,10b-tetraazafluoranthene
Lys-P-1	3,4-ciklopenten-pirido [3,2-a] karbazol
Cre-P-1	4-amino-1,6-dimetil-2-metilamino-1H, 6H-pirol- [3,4-f] benzimidazol-5,7-djon



Slika 30. Hemijske strukture nekih HAAs

Zdravstveni rizici

HAAs su jedinjenja s visokim mutagenim i kancerogenim potencijalom. Dokazano je, da su HAAs i njihovi metaboliti prisutni u tjelesnim tekućinama i tkivima čovjeka. HAAs koji su obično prisutni u toplotno obrađenom mesu

[čak, i pri jako malim količinama (ppb)] do uobičajenih središnjih temperatura, se lako vežu na DNK.

HAAs pripadaju u skupinu indirektnih mutagena, kojima je za postizanje mutagenih svojstava potrebna metabolička aktivacija. Bioaktivacijom HAAs postaju jaka mutagena jedinjenja, što je dokazano brojnim *in vitro* i *in vivo* eksperimentima. Mutagenost HAAs je ovisna o hemijskoj strukturi i njihovoj mogućnosti formiranja hipotetičnog reaktivnoga nitrenium (R_2N^+) jona. Ukoliko mutagenost HAAs uspoređujemo s ostalim mutagenim spojevima, koji su nađeni u hrani, zanimljivo je da je njihova mutagenost 100 puta veća od aflatoksina B1 i više od 2000 puta veća od BaP.

Brojni HAAs, koji su testirani *in vivo* dodani u prehranu miševa i štakora, pokazuju kancerogena svojstva. Izloženost HAAs na duži vremenski period, inducira nastanak tumora na više mjesta u različitim organima: u usnoj šupljini, jetri, želucu, plućima, mjestu, debelom crijevu, prostati i mliječnim žlijezdama. IQ je moćan jetreni kancerogen kod majmuna koji su slični čovjeku.

Međunarodna agencija za istraživanje raka (IARC, *International Agency for Research on Cancer*) označila je MeIQ, MeIQx, PhIP, AaC, MeAaC, Trp-P-1, Trp-P-2 i Glu-P-2 kao potencijalno kancerogene. IQ je vjerojatno kancerogen za ljude.

Pojavljivanje u hrani

Termički HAAs se javljaju u gotovo svim zagrijanim namirnicama životinjskog porijekla, kao što su meso i riba, jer se u tim proizvodima nalazi kreatin, prekursor potreban za njihovo stvaranje. 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo [4,5-b] piridin (PhIP) ne nalazi se samo u proizvodima životinjskog porijekla, već i u vinu, pivu i dimljenom siru. Izvor je možda ekološki, jer se PhIP može pojaviti i u procesima sagorijevanja.

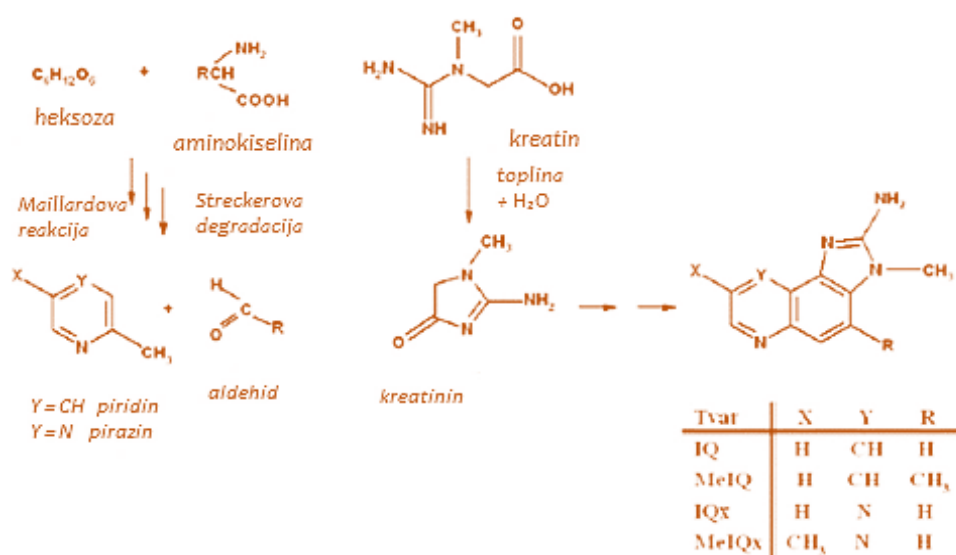
Za proučavanje utjecaja faktora na formiranje HAAs u hrani uobičajeno se upotrebljavaju hemijski modelni sistemi koji sadržavaju osnovne prekursore (AK, šećer i kreatin), a koji imaju ključnu ulogu pri formiranju

HAAs. Na taj način isključuje se utjecaj drugih jedinjenja i kompleksnih reakcija, koje su prisutne u hrani. Posljedično, upotreba modalnih sistema omogućava izradu studije utjecaja prekursora, te fizikalnih i hemijskih parametara na formiranje HAAs s namjenom razvijanja metode i dodataka za smanjenje formiranja mutagenih i kancerogenih HAAs u hrani.

Formiranje HAAs u mesu

HAAs koji se najčešće javljaju u toplotno obrađenom mesu su PhIP, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, IQ, MeIQ, i AaC. U toku procesa pečenja mesni sokovi koji sadrže prekursore HAAs, kao što su kreatin / kreatinin, glukoza i slobodne amino kiseline (SAKs), se prenose na površinu proizvoda i isparavaju. Iz tog razloga, ne samo meso, već i ostaci u posudi sadrže značajne količine HAAs.

AAs se formiraju već pri temperaturama klasičnih postupaka toplinske obrade mesa, tj. pri temperaturama od 150–250 °C. Glavni put pri stvaranju AAs predstavljaju Maillardove reakcije (MR) s uključenom Streckerovom razgradnjom. Kao produkti serije kompleksnih reakcija između slobodnih aminokiselina (SAK) i redukujućih šećera nastaju metilirani piridini i pirazini tj. Streckerovi aldehidi, koji su prekursori pri formiranju AAs (Slika 31). Svi AAs sadrže amino-imidazolni dio molekule, koji nastaje iz kreatina. Toplotnom obradom pri temperaturama iznad 100 °C teče spontana reakcija, pri kojoj dolazi do ciklizacije i odcijepljena vode iz kreatina. Pri tom nastane kreatinin, koji kod molekula AAs predstavlja amino-imidazolni dio, koji je odgovoran za mutagenost.



Slika 31. Prikaz formiranja HAAS iz prekursora (Turesky, 2007)

Glavni parametri u formiranju HAAs su fizikalni parametri svake metode kuhanja, kao što su vrijeme zagrijavanja i temperatura, što rezultira širokim rasponom koncentracija HAAs. Osim metoda pripreme, kao što su tretmani zagrijavanja i mariniranja i fizikalni parametri, prijenos topline na površinu proizvoda utječe na sadržaj HAAs. Sirovina s koncentracijama prekursora i omjer jedni s drugima ima važan učinak na stvaranje HAAs. Međutim, razlika u koncentraciji prekursora također može varirati u mišićima unutar vrste. Ostale studije su pokazale da se prekursori mijenjaju s vremenom starenja i mišićima normalne ili BME (blijedo mekog i eksudativnog) kvaliteta s niskom nivoom pH, 24 sata nakon klanja. Koncentracija rezidualnog glikogena u svinja varirala je od 7 do 91 $\mu\text{mol/g}$, sadržaj kreatina od 29,1 do 44,2 $\mu\text{mol/g}$, a ukupna koncentracija svih slobodnih aminokiselina kretala se između 8,0 i 16,7 $\mu\text{mol/g}$ mesa. Prekursori HA su bili pod utjecajem vremena starenja; kreatinin i ukupne slobodne aminokiseline su se povećale s danom starenja.

Pri jednakom stepenu toplinske obrade postoje razlike u stvaranju pojedinih HAAs, gledano na vrstu mesa (Tabela 34).

Generalno, prekursori HAAs se razlikuju u pojedincima jedne vrste, kao i između različitih životinjskih vrsta; a time su i različite koncentracije formiranih HAAs u toplotno obrađenom mesu. U Tabeli 34. prikazane su koncentracije HAAs u prženim pljeskavicama koje sadrže meso različitih životinjskih vrsta.

Tabela 34. Koncentracije heterocikličnih amina (ng/g) u pljeskavicama koje sadrže meso različitih životinjskih vrsta (GibisandWeiss, 2015).

Vrsta	N	MeIQx $\bar{X} \pm SD$	4,8- DiMeIQx $\bar{X} \pm SD$	PhIP $\bar{X} \pm SD$	Norharman $\bar{X} \pm SD$	Harman $\bar{X} \pm SD$
Pietina (prsa)	6	1,13±0,25	0,13±0,06	1047±1,43	0,74±0,018	0,55±0,13
Noj	4	0,49±0,08	0,25±0,05	0,90±0,17	0,69±0,03	1,34±0,11
Govedina	6	1,35±0,50	0,19±0,03	1,91±0,71	1,88±0,21	2,4±0,79
Teletina	6	1,04±0,13	0,23±0,08	0,81±0,08	1,59±0,19	3,13±0,07
Svinjetina	6	1,08±0,27	0,49±0,25	2,32±0,8	1,1 ±0,26	0,51±0,25
Janjetina	4	0,54± 0,05	0,05±0,06	0,61±0,11	1,03±0,07	2,74±0,21
Divljač	5	1,05±0,35	1,27±1,46	5,77±6,47	0,98±0,72	1,50±1,99
Divlja svinjetina	4	0,95±0,05	0,81±0,12	0,58±0,13	0,88±0,02	1,32 ±0,07
Konjetina	8	0,55 ± 0,08	nd	0,17 ± 0,04	0,88 ± 0,02	3,18 ± 0,47

Utjecaj metode toplinske obrade na formiranje HAAs dokazan je u brojnim eksperimentima na različitim vrstama mesa. U pljeskavicama od svinjskoga mesa, najviše HAAs se formira pri pečenju na žaru (17,2 ng/g), puno manje pri pečenju u pećnici (5 ng/g) i kuhanju (1 ng/g). Pri jednakim temperaturama toplinske obrade pilećih prsa (180°C) najveća koncentracija HAAs formira se pri pečenju na drvenom ugljenu (>112 ng/g), manje pri pečenju na žaru (27,4 ng/g) i najmanje pri pečenju u pećnici (4 ng/g). Tokom prženja i pečenja na pločnom žaru, meso i prekursori HAAs su u neposrednom kontaktu s grijaćom pločom. Pri takvim uslovima sadržaj vode na površini mesa se smanjuje. Nasuprot, koncentracija kreatina,

glukoze i slobodnih AK se povećava. Posljedica toga je, da se većina HAAs nalazi na površini (kori) toplotno obrađene hrane bogate proteinima.

MelQ je najzastupljeniji HAAs, i otkriven je u svim mesnim proizvodima brze hrane, osim pilećih traka s kuminom, kao što je prikazano u Tabeli 35. Maksimalna količina MelQ-a od $8,72 \pm 1,08$ ng/g nađena je u vrućim pilećim krilima, nakon čega slijedi $7,19 \pm 1,60$ ng/g u hrskavim prženim pilećim burgerima, $7,01 \pm 1,50$ ng/g u krilcima, $6,89 \pm 0,59$ ng / g u burgerima od škampa i $6,17 \pm 0,04$ ng/g u tradicionalnom kineskim nuggetsima. Najniža količina MelQ-a otkrivena je u prženim burgerima od govedine i hrskavim pilećim batacima ($4,61 \pm 0,84$ i $5,87 \pm 0,66$ ng/g). Sadržaj MelQ je statistički sličan u pečenim, hrskavim prženim pilećim burgerima, hrskavim piletinama i tradicionalnim kineskim nuggetsima.

Povišeni nivoi IQ-a i MelQ-a u pilećim proizvodima, kao što su hrskavi pileći bataci i tradicionalni kineski nuggetsi, mogu biti posljedica činjenice da su IQ spojevi uglavnom proizvedeni u pilećem mesu, zbog visokog sadržaja kreatina i glukoze i sekvenca AK.

Metoda kuhanja može biti još jedan razlog za ove povišene nivoe, jer se proizvodi kao što su hrskavi pileći bataci i tradicionalni kineski nuggetsi obično prže u masti, što povećava koncentraciju glukoze, kreatina i kreatinina, što konačno dovodi do formiranja visokih nivoa jedinjenja IQ-tipa. Relativno visoki nivoi Norharmana i Harmana, u vrućim pilećim krilima i pilećim trakama s kuminom, mogla bi biti posljedica boljeg prenosa topline zbog relativno male veličine ovih proizvoda.

Najnovija istraživanja pokazuju da prženje pilećih krilaca na zraku, na 140°C tokom 50 minuta, značajno smanjuju formiranje HAAs ($1,08$ $\mu\text{g/kg}$) u poređenju sa pilećim krilcima prženim na zraku na 200°C tokom 20 minuta ($2,98$ $\mu\text{g/kg}$). Posebno je kurkuma pokazala najveći inhibitorni efekat na stvaranje HAAs.

Utjecaj masti na formiranje HAAs nije još do kraja razjasnjen, jer u nekim primjerima mast pospješuje stvaranje HAAs, a u nekim inhibira njihov nastanak. Inhibitorni učinak masti lako se objašnjava činjenicom da se s većim udjelom masti u mesu, smanjuje udio ostalih komponenata, koje djeluju kao prekursori HAAs. Mast je učinkovitiji medij za prenos topline,

što utječe na kraće vrijeme toplinske obrade i posljedično smanjenje formiranja HAAs. S druge strane, masti pospješuju formiranje HAAs, jer prilikom toplinske obrade djelomično hidroliziraju i formiraju slobodne radikale, koji utječu na tok Maillardovih reakcija i djeluju kao nekakvi katalizatori nastanka HAAs. Moguće je, da velik sadržaj masti u mesu inhibira toplinsku razgradnju nastalih HAAs.

Tabela 35. Nivo HAAs (ng/g) u odabranim mesnim proizvodima brze hrane dostupnim na kineskom tržištu (n = 9) (Ali-Khan i sar., 2018)

Proizvod	IQ	MeIQ	MeIQx	Harman	PhIP
Pileće trake s kuminom	5.34 ± 0.63 ^{ab}	nd	1.73 ± 0.56 ^b	2.58 ± 2.00 ^{bc}	0.11 ± 0.10 ^a
Pureća krilca na žaru	nd	7.01 ± 1.50 ^{ab}	1.51 ± 0.53 ^b	0.41 ± 0.00 ^b	0.30 ± 0.05 ^a
Hrskavi pileći batak	6.79 ± 1.72 ^a	5.87 ± 0.66 ^{bc}	3.37 ± 1.21 ^a	1.42 ± 1.74 ^{ab}	0.93 ± 1.49 ^a
Burgeri od škampa	nd	6.89 ± 0.59 ^b	2.02 ± 0.60 ^{ab}	0.42 ± 0.07 ^b	0.05 ± 0.02 ^a
Vruća pileća krilca	nd	8.72 ± 1.08 ^a	1.95 ± 0.38 ^b	0.38 ± 0.04 ^b	0.19 ± 0.18 ^a
Hrskavi prženi pileći burgeri	4.08 ± 0.79 ^{bc}	7.19 ± 1.60 ^a	1.79 ± 0.32 ^b	0.39 ± 0.19 ^b	0.09 ± 0.03 ^a
Tradicionalni kineski nugeti	5.56 ± 1.19 ^a	6.17 ± 0.04 ^{bc}	2.38 ± 0.96 ^{ab}	0.48 ± 0.02 ^b	0.33 ± 0.04 ^a
Prženi burgeri od govedine	3.64 ± 1.13 ^c	4.61 ± 0.84 ^c	3.36 ± 0.90 ^a	0.31 ± 0.11 ^b	nd

nd- nije detektovan

Rezultati s različitim slovima u istom stupcu značajno se razlikuju na nivou P < 0,05

Preventivne mjere

Dostupni su različiti jednostavni i efikasni načini sprječavanja proizvodnje HAAs. Mariniranje je zanimljivo rješenje za ograničavanje stvaranja heterocikličnih amina u mesnim proizvodima, jer može djelovati kao barijera, kako bi se izbjegao direktan kontakt prehrambenog proizvoda i površine grijanja. Ružmarin, ekstrakt ružmarina dodan djevičanskom maslinovom ulju, ekstrakt sjemenki grožđa, marinade koje sadrže začim, dodavanje crvenog i crnog papra mogu biti djelotvorni inhibitori HAAS formacija. Formulacija i vrijeme mariniranja utječu na efikasnost marinade. Poznato je da je šećer prekursor nastanka heterociklični amina, no dodavanje niske količine šećera, mljevenom mesu, smanjuje nastanak HA. Mehanizam kojim ugljikohidrati inhibiraju stvaranje HAAs nije u potpunosti shvaćen. Pretpostavlja se da sam šećer ili neki formirani produkti Maillardovih reakcija mogu spojiti s kreatinom ili kreatininom i tako se natjecati s reakcijama koje proizvode HAAs. Štaviše, vrsta šećera koja se koristi za marinirano meso utječe na količinu nastalih HA. Među raznim vrstama šećera, med najviše obećava da će ograničiti stvaranje HAAs, zbog ugljikohidratnih spojeva koje sadrži.

Produženo kuhanje i pečenje mesa, kao i direktnu izloženost otvorenom plamenu treba izbjegavati. Mikrovalovi su se pokazali kao dobar način za prethodnu toplinsku obradu mesa, prije drugih postupaka pečenja, jer pridonose smanjenju formiranja MelQx i PhIP, zbog gubitka prekursora HAAs, vode i masti.

Dokazan je i zaštitni efekat pečenja mesa s kožom (pileća prsa) na formiranje HAAS.

Analitičke tehnike za određivanje heterocikličnih amina u hrani

Najčešće primjenjivana tehnika za odvajanje HAA je tekuća hromatografija visokog učinka (HPLC) u kombinaciji sa ultra ljubičastom (UV) i fluorescentnom detekcijom ili UV i masenom spektrometrijom (MS).

5. 3. POLIČIKLIČNI AROMATSKI UGLJIKOVODICI (PAHs)U TOPLOTNO OBRAĐENIM PROIZVODIMA

PAHs se također, mogu formirati, direktno u hrani, kao rezultat nekih toplotnih procesa, kao što su grilovanje, pečenje i sušenje dimom. Intenzivni termalni procesi mogu se primijeniti na hranu na direktan i indirektan način.

Kontaminacija hrane s PAHs nastaje intenzivnom termičkom obradom, uslijed direktne lipolize hranljivih sastojaka hrane, i direktnog taloženja PAHs, iz dima, nastalog uslijed nepotpunog sagorijevanja različitih termalnih agenasa. Komponente hrane, kao što je masnoća, uzrokuju nastanak PAHs kroz termičku degradaciju ili termičku polimerizaciju, a različiti termički procesi kvantitativno utiču na njihovu proizvodnju.

Dimljenje mesa

Prosec dimljena obično se događa termičkom pirolizom u odsustvu kiseonika. Količina PAHs u dimljenoj hrani zavisi od više faktora, kao što su:

- vrsta generatora, vrsta drveta, sadržaj vlage, sagorijevanje,
- temperatura i stepen dimljenja.

Dim se stvara termičkom pirolizom, određene vrste goriva, kada je ograničen pristup kiseoniku. Što se tiče goriva, najčešće korištene sirovine za dimljenje/sušenje hrane su različite vrste drva. Osim toga koriste se i neki drugi materijali, kao što su biljni otpaci u preradi šećerne trske, klip kukuruza, te kokosova kora i ljuska. Zbog veće količine lignina u kokosovoj kori može doći do većeg stepena kontaminacije uljarica s PAH-ovima, u odnosu na upotrebu kokosove ljuske.

Najviša koncentracija PAH-ova u dimljenim proizvodima je nakon završetka procesa skladištenja. U Tabeli 36. su prikazane količine 13 PAHs u tradicionalnoj suhoj fermentiranoj kobasici (Petrovska kobasica-Srbija).

Tabela 36. Sadržaj 13 EPA PAHs ($\mu\text{g/kg}$) u Petrovskoj kobasici dimljenoj na tradicionalan način (Škaljac i sar., 2017)

PAHs	Kontrola	Kraj procesa dimljenja	Kraj skladištenja
Acy	$2,57^a \pm 0,35$	$9,80^b \pm 0,10$	$21,8^c \pm 1,85$
Fln	$2,10^a \pm 0,30$	$11,1^b \pm 0,10$	$13,0^c \pm 0,65$
Phe	$4,90^a \pm 0,50$	$18,0^b \pm 1,40$	$26,3^c \pm 2,60$
Ant	nd	$5,35^a \pm 0,55$	$12,5^b \pm 0,40$
Pyr	nd	$2,27 \pm 0,06$	nd
BaA	nd	nd	nd
Chry	nd	nd	nd
BbF	nd	nd	nd
BkF	nd	nd	nd
BaP	nd	nd	nd
Icp	nd	nd	nd
Dha	nd	nd	nd
BgP	nd	nd	nd
Ukupno PAHs	$9,57^a \pm 1,15$	$46,52^b \pm 0,80$	$73,50^c \pm 4,20$

Temperatura dima općenito igra veoma važnu ulogu, jer se količina nastalih PAHs u dimu, tokom pirolize, istovremeno povećava s temperaturom dimljenja. Direktno izlaganje mesnih proizvoda dimu, dovodi do formiranja viših koncentracija PAHs, u poređenju sa indirektnim metodama, unutar intervala od 400 do 1000 °C. Toplo dimljenje, koje se koristi za obradu glavnog dijela proizvoda od mesa, dovodi do formiranja viših koncentracija PAHs, u odnosu na hladno dimljenje, koje se koristi za fermentirane, toplinski neprerađene mesne proizvode.

Tabela 37. Koncentracija PAHs ($\mu\text{g/kg}$) različito mariniranih uzoraka pilećeg mesa (Wongmaneepratip i sar., 2017)

PAHs	Koncentracija ($\mu\text{g/kg}$)			
	P	A	DA	B
Phen	$75,4 \pm 10,5^{ab}$	$70,5 \pm 6,6^a$	$88,8 \pm 14,7^b$	$114,4 \pm 9,2^c$
Ant	$15,4 \pm 1,3^a$	$16,3 \pm 2,0^a$	$14,7 \pm 1,9^a$	$20,3 \pm 4,8^a$
Pyr	$195,5 \pm 6,1^{ab}$	$227,8 \pm 22,5^{ab}$	$189,1 \pm 15,6^a$	$249,6 \pm 58,0^{ab}$
BaA	$45,0 \pm 7,3^b$	$48,1 \pm 4,0^b$	$42,5 \pm 5,8^b$	nd
Chry	$84,6 \pm 12,2^a$	$103,1 \pm 6,6^a$	$81,4 \pm 16,6^a$	$111,8 \pm 25,2^a$
BbF	$16,6 \pm 3,4^a$	$11,9 \pm 3,0^a$	$25,1 \pm 5,4^{ab}$	$34,5 \pm 1,3^b$

nd - nije detektovan; P- marinarada od palminog ulja; A . kisela marinada; DA – dvostruka kiselinska marinada; B – bazna marinada

Grilovano meso

Budući da su grilovane namirnice popularne i kod kuće i u restoranima, te namirnice mogu predstavljati rizik za zdravlje stanovništva, zbog viših koncentracija kancerogenih supstanci, koje se nalaze u takvim proizvodima, u odnosu na hranu pripremljenu alternativnim metodama pečenja.

Stvaranje PAHs tokom roštiljanja, na drveni ugljen, ovisi o udjelu masti u mesu, trajanju roštiljanja i korištenoj temperaturi. Neke od najvećih koncentracija PAHs pronađene su u roštiljskoj hrani na otvorenom plamenu. U mesu s roštilja utvrđeno je da su ukupni PAHs prisutni u koncentraciji do 164 ppb, gdje je B (a) P prisutan na nivoima od 30 ppb.

Tabela 38. Koncentracija BaP-a u ovisnosti od metode toplotne obrade hrane (Nisha i sar., 2015)

Uzorak	Metoda termičke obrade	Maksimalna količina BaP (ng/g)
Hamburger	pečen u pećnici	0,01
	pržen u tavi	0,02
Stek	pečen na roštilju	0,52
	pečen u pećnici	1,52
	pržen u tavi	0,01
Piletina (sa kostima i kožom)	pečen na roštilju	4,86
	pečena u pećnici	0,08
	pržena u tavi	0,12
Piletina bez kostiju	pečena na roštilju	4,57
	pečena u pećnici	0,48
	pržena u tavi	0,10
	pečena na roštilju	0,4

Dodavanje komercijalnih biljnih ulja, kao i povećanje pH vrijednosti marinade za meso, utječe na ekstremno povećanje koncentracije PAHs, naročito teških PAHs, koji su stabilniji i toksičniji. Vjeruje se da omjeri zasićenih i nezasićenih masnih kiselina, i prisutnost antioksidativnih spojeva u biljnim uljima igraju važnu ulogu u formiranju PAHs u piletini, pečenoj na žaru (Tabela 37). Relativno visoke koncentracije PAHs, prosječno 10,2 µg / kg, pronađeni su u uzorcima svinjetine, grilovane na drveno uglju. Prosječna količina PAH-s u govedini nije prelazila 0,80 µg / kg. Efekti različitih metoda, termičke obrade mesa, na stvaranje BaP predstavljeni su u Tabeli 38.

Preventivne mjere

Brojna istraživanja ukazuju na činjenice da se kontrolisanjem uslova, u kojima se obavlja dimljenje i sušenje namirnica, može postići smanjenje kontaminacije hrane PAHs. Jedna od mjera prevencije je zamijeniti direktno dimljenje sa indirektnim, gdje je to moguće. Kod indirektnog dimljenja, dim se stvara u posebnim komorama, čime se sprječava direktni kontakt namirnica i goriva, pa se smanjuje i kontaminacija. Tokom direktnog dimljenja, masnoća kapa iz hrane u sam izvor dima, npr. užarena drva ili neki drugi biljni materijal, i to može povećati količinu PAHs u dimu, te i u dimom tretiranoj hrani. Da bi se izbjeglo povećanje PAHs, zbog kapanja masnoće u otvoreni plamen, između hrane koja se dimi, i izvora topline, mogu se postaviti perforirani listovi lima. Položaj hrane u dimnoj komori (sušionici) i udaljenost između hrane i izvora topline važna je tačka za razmatranje, kod procesa dimljenja.

Vezano uz nastanak PAHs, većom udaljenosti između izvora dima i proizvoda, koji se dimi, smanjuje se sadržaj PAHs u hrani. Dodatak aktivnog ugljena kokosovom ulju, u pravoj dozi, tokom procesa prerade može u potpunosti otkloniti zagađenost policikličkim aromatskim ugljikovodicima. Sastav drva, posebno sadržaj lignina, također utiče na nivo proizvedenih PAH. Preporučuje se upotreba tvrdog drveta, umjesto mekog drveta, kako bi se smanjilo prisustvo PAHs u dimu i dimljenoj hrani. Treba izbjegavati i drvo sa većim sadržajem smole. Gorivo koje je navedeno da treba izbjegavati kod sušenja treba izbjegavati i kod dimljenja da ne bi došlo do dodatne kontaminacije ili promjene okusa, boje i drugih karakteristika proizvoda.

U principu, vrijeme dimljenja trebalo bi biti što je kraće moguće, da bi se minimiziralo izlaganje površine hrane sa dimom. Međutim, u slučaju toplog dimljenja, kada je proizvod kuhan u isto vrijeme, važno je osigurati dovoljno vremena, kako bi se proizvod iskuhao u potpunosti. U slučaju toplog dimljenja jedini izvor topline (tradicionalne pušnice) je prostor za dimljenje, koji bi trebao biti zagrijavan prije nego se u njega stavi proizvod. Također, bitna je i konstrukcija komore za dimljenje i oprema korištena za miješanje zraka i dima, jer utiču na gustoću dima u komori za dimljenje. Tri su vrste

postupaka čišćenja, koje se mogu koristiti tokom obrade, ili kao tretmani nakon dimljenja hrane:

- 1) Tokom procesa, dim može biti ispran prije ulaza u komoru za dimljenje. To se može postići ispiranjem, koristeći kondenzator sa katranom, hlađenjem ili filtriranjem pomoću kojega se mogu ukloniti vezane čestice policikličkih aromatskih ugljikovodika iz dima.
- 2) Tretman nakon dimljenja hrane uključuje čišćenje dimljenog proizvoda. U tom slučaju se ispiranjem proizvoda ili uranjanjem proizvoda u vodu može ukloniti čađ i čestice koje sadrže policikličke aromatske ugljikovodike na površini hrane. Ova vrsta čišćenja se ne može koristiti za sve vrste proizvoda, npr. dimljenu ribu ili riblje proizvode. Ako se koža ribe ne konzumira njenim uklanjanjem odstranjuju se i neki kontaminanti.
- 3) Proces skidanja gornjeg sloja dimljenog proizvoda. U slučaju čvrste dimljene hrane npr. dimljen i osušeni Bonito (tj. katsuobushi, tradicionalna japanska hrana), skidanjem gornjeg sloja se smanjuju policiklički aromatski ugljikovodici u konačnom proizvodu.

Stoga, postoji potreba da se proizvođači edukuju o sigurnim praksama procesa dimljenja hrane, a što je najvažnije, da se usvoji njihova procedura, koja bi smanjila sadržaj PAHs u mesu dimljenom u tradicionalnim pećima, kako bi se osigurala zdravstvena sigurnost potrošača. Nivoi kontaminacije mogu se značajno smanjiti u kontrolisanim uslovima, prihvatajući principe dobre proizvodne prakse, koristeći postojeće znanje i odgovarajuću tehnološku opremu.

Analitičke tehnike za određivanje PAHs u hrani

Detekcija PAHs jedinjenja u hrani najčešće se izvodi primjenom tačne hromatografije pod visokim pritiskom (HPLC) sa fluorescentnim detektorom, mada se može primijeniti i metoda gasne hromatografije sa masenim detektorom (GC/MS), super kritična tečna hromatografija (SFC) i kapilarna elektroforeza, CE).

5. 4. N-NITROZAMINI

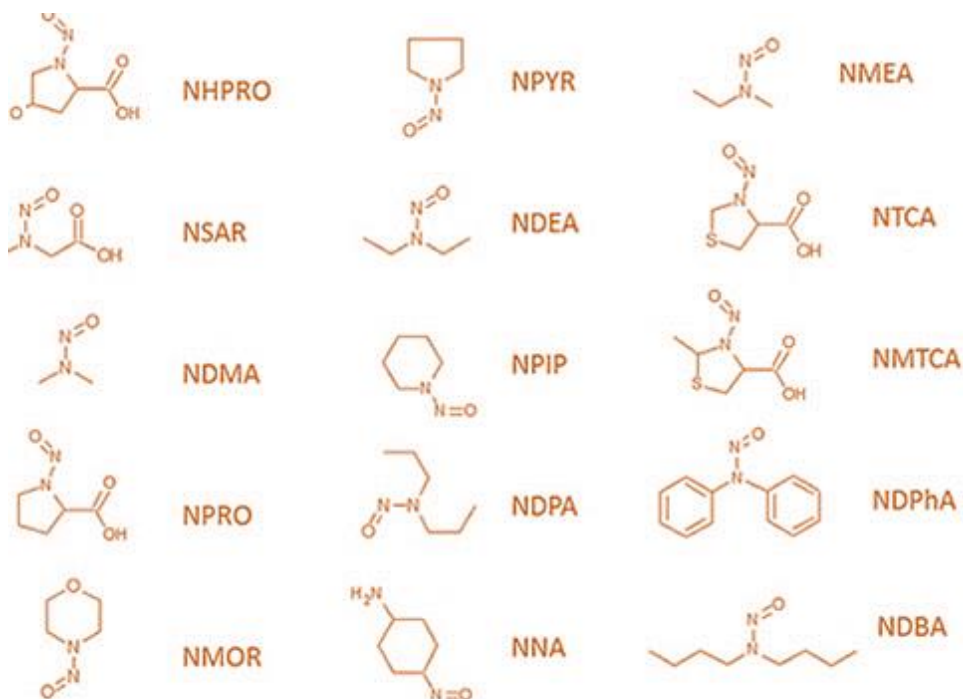
N-nitrozamini (NA) su štetna jedinjenja, koja se formiraju hemijskom reakcijom nitrozacijskog agensa, i sekundarnih, ili tercijarnih amina. Na osnovu njihovih fizikalnih svojstava, ova jedinjenja se mogu podijeliti u dvije grupe: isparljivi N-nitrozamini (VNA) i neisparljivi nitrozamini (NVNA). Najčešće identifikovani N-nitrozamini pronađeni u hrani su: NHPRO (N-nitrozohidroksiprolin), NSAR (N-nitrozosarkozin), NDBA (N-nitrozodimetilamin), NPRO (N-nitrozoprolin), NMOR (N-nitrozomorfolin), NMEA (N-nitrosometiletilamin), NPYR (N nitrozopirrolidin), NDMA (N-nitrosodietilamin), NPIP (N-nitrozopiperidin), NDPA (N-nitrozodipropilamin), NMA (N-nitrosometilanilin), NDBA (N-nitrozodibutilamin), NDBzA (N-nitrosodibenzilamin), NTCA (N-Nitroso-tiazolidin-4-karboksilna kiselina), NMTCA (N-Nitroso-2-metil- tiazolidin 4-karboksilna kiselina), NDPhA (N-nitrozodifenilamin) (Slika 32).

Reakcija nitrozacije, prilikom koje nastaju nitrozmini, direktno je ovisna o količini amina, količini dodanih nitrita, pH, temperaturi, redoks potencijalu, te prisutnosti drugih hemijskih jedinjenja ili agensa.

Nitrati i nitriti kao prekursori formiranja N-nitrozamina

Nitrati su soli azotne kiseline koji sadrže tri atoma kiseonika (NO_3^-) i u prirodi se pretvaraju u nitrite (NO_2^-) i obratno. Nitrati su važan metabolit kruženja azota u prirodi. Stvaraju se pri oksidaciji nitrita, uzrokovanoj djelovanjem azotnih bakterija (*Nitrobacter*). Nitrati se također koriste u poljoprivredi kao gnojivo, koje zamjenjuje tradicionalno korištenje stočnog gnojiva, kao i u preradi hrane u obliku odobrenih dodataka (aditiva). U zemljama Evropske unije kao i u ostalim državama, nitriti i nitrati se koriste kao konzervansi u mesnoj industriji i to: kalij-nitrit (E249) i natrij-nitrit (E250) te kao natrij-nitrat (E251) i kalij-nitrat (E252). Njihova upotreba propisana je Uredbom Komisije (EU) br. 1129/2011 te ostalim zakonima i pravilnicima drugih država. Nitrati se rjeđe dodaju u mesne proizvode, nego nitriti, osim kod proizvoda kod kojih je proizvodni proces dugotrajan i spor,). Osim kao

konzervansi, nitriti mogu nastati i enzimskom redukcijom iz nitrata (prisutnih uglavnom u namirnicama biljnog podrijetla) tokom procesiranja ili dodatkom nitrata namirnicama, što predstavlja indirektnu opasnost od nastanka štetnih jedinjenja N- nitrozamina.



Slika 32. Hemijska struktura najznačajnijih N-nitrozamina
(Herrmann i sar., 2014)

Nitrit se također može pretvoriti u nitrozirajući agens NO^+ koji može reagirati s biogenim aminima i formirati N-nitrozamin. Biogeni amini su bazični spojevi azota, nastali dekarboksilacijom slobodnih aminokiselina. Mogu se pojaviti u suhim fermentiranim proizvodima u visokim koncentracijama, jer se njihova akumulacija uglavnom odnosi na djelovanje dekarboksilaza - pozitivnih bakterija i mesnih enzima tokom fermentacije i zrenja. Pri tome, tokom obrade kobasica, drugi unutrašnji i vanjski faktori, kao što su sadržaj soli i parametri sušenja, utječu na brzinu formiranja

biogenog amina. Širok raspon formulacija proizvoda i higijenskih praksi odražava se u velikoj raznovrsnosti vrsta i količina biogenih amina. S obzirom na sigurnost hrane, povišene koncentracije biogenih amina treba izbjegavati, posebno kadaverin CAD i spermidin SPD smatraju se prekursorima za formiranje NPIP-a.

Zdravstveni rizici

Nitrati imaju relativno nisku toksičnost za ljude. Međutim, metaboliti koji se stvaraju u ljudskom organizmu kao što su nitriti, azotov oksid, i N-nitrozo spojevi, mogu biti povezani sa zdravstvenim problemom kao što je methemoglobinemija ili kancerogeneza. Međunarodna agencija za istraživanje raka (IARC) je nitrata i nitrite unesene putem prehrane, svrstala u grupu 2A, što znači da su, u slučaju ljudi, vjerojatno kancerogeni. Uobičajena stopa pretvaranja nitrata u nitrite je između 5 % i 7 %, iako u pojedinim slučajevima može iznositi i do 20 %.

Brojne epidemiološke studije na ljudima nisu dokazale povezanost izloženosti nitratima hranom ili vodom i formiranja tumora, no prema IARC postoji ograničen broj dokaza o kancerogenosti nitrita prisutnih u hrani, te ih se povezuje s povećanom stopom incidencije raka želuca kod ljudi. U pogledu N-nitrozo spojeva, ne postoje kvantitativni dokazi njihovog endogenog formiranja iz nitrita i N-nitrozo spojeva unesenih putem prehrane. Stoga se endogeno formiranje N-nitrozo spojeva ne smatra prikladnim za procjenu rizika od nitrita.

Nitrati i nitriti u hrani

Nitrata u svoj organizam unosimo konzumacijom povrća i drugih proizvoda koji ih sadrže, te putem pitke vode, dok nitriti uglavnom nastaju konverzijom iz nitrata. Visoke koncentracije nitrata sadrže cvekla, brokula, celer, kupus, rotkvica, rukola špinat i zelena salata (Tabela 39). Grašak i grah, uljarice sadrže manje, a korjenasto povrće najmanje količine nitrata.

Tabela 39. Količina nitrata u lisnatom povrću (EFSA, 2008)

Vrsta povrća	Prosječna količina (mg/kg)	Vrsta povrća	Prosječna količina (mg/kg)
Rukola	4677	Zelena salata	1324
Amarant	2167	Rimska salata	1105
Miješana salata	2062	Špinat	1066
Puterica	2026	Salata kristalka	875
Cvekla	1852	Endivija	523
Kovrčava salata	1601	Radič	355

Količina nitrata u zelenom lisnatom povrću ovisi o nizu faktora, uključujući vrstu, godišnje doba, intenzitet svjetla, temperaturu, uslove rasta, način korištenja gnojiva i skladištenje. Zbog nižeg intenziteta svjetla i manje dnevnih sati u sjevernim geografskim širinama na području Evrope, i tokom zime, nitrati su uglavnom prisutni u većim količinama. Tako na primjer, razlike u intenzitetu svjetla tokom različitih mjeseci mogu pri uzgoju salate u području zapadne Evrope izazvati čak trostruke promjene u sadržaju nitrata.

Zimski usjevi općenito sadrže veću količinu nitrata od ljetnih uzgajanih u istom okruženju (Tabela 40). Također, biljke koje se uzgajaju u području sjeverne Evrope sadrže veću količinu nitrata u odnosu na područja južne Evrope. Navedene razlike mogu se objasniti činjenicom kako veće osvjetljenje ljeti smanjuje sadržaj nitrata u korist povećanja rasta biljaka.

Tabela 40. Srednje vrijednosti nitrata prema mjestu i periodu uzorkovanja za 2013. godinu (HAH,2016)

Vrsta uzorka	Mjesto uzorkovanja	Proljeće $\bar{X}$ nitrata (mg/kg)	Jesen $\bar{X}$ nitrata (mg/kg)
SALATA	Zagreb	877	2198
	Osijek	481	729
	Rijeka	666	756
	Split	790	1376
ŠPINAT	Zagreb	306	1408
	Osijek	673	2866
	Rijeka	1216	1657
	Split	630	2121
KELJ	Zagreb	523	641
	Osijek	326	1537
	Rijeka	1049	2260
	Split	1209	1908
BLITVA	Zagreb	1049	2260
	Osijek	326	1537
	Rijeka	354	640
	Split	1209	2260

Sadržaj nitrata u svježem povrću može opadati čuvanjem na sobnoj temperaturi. S druge strane, ovisno o vrsti povrća, količina nitrata može i rasti pod utjecajem specifičnog endogenog djelovanja enzima nitratne

reduktaze ili utjecajem mikroorganizama. Pokazalo se da se količina nitrita povećava tokom skladištenje svježeg povrća s visokim sadržajem nitrata. Pri čuvanju povrća u hladnjaku (7 dana na temperaturi od 5°C), sadržaj nitrata ostaje nepromijenjen, što upućuje na činjenicu kako nitrat reduktaza u navedenim uslovima postaje neaktivna.

U Tabeli 41. je prikazan sadržaj nitrita u nekim uzorcima voća, povrća i mesnim proizvodima.

Tabela 41. Sadržaj nitrita u nekim uzorcima voća, povrća i mesnim proizvodima (*Hordet al., 2009*)

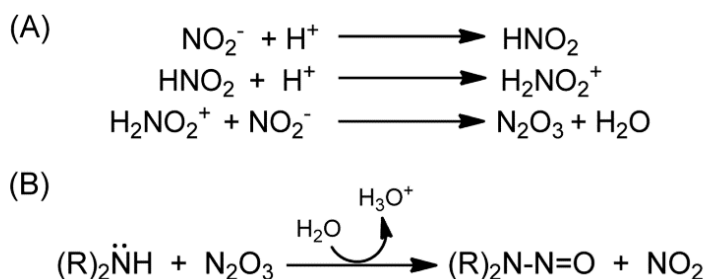
Uzorak	Nitriti (mg/100g svježe mase)
Umak od jabuke	0,008
Banana	0,009
Mješavina voća	0,08
Narandža	0,02
Brokula	0,07
Mrkva	0,006
Špinat	0,02
Slanina	0,38
Šunka	0,89
Hot dog	0,05

Obzirom da se ovi prekursori mogu ostvariti i od pesticida i herbicida, kao i azotnih đubriva, N-nitrozamini se mogu naći kao zagađivači u raznoj vrsti hrane. Neodgovorna upotreba nitrita može dovesti do velikog udjela rezidualnog nitrita, koji se nije iskoristio za pozitivno djelovanje. Rezidualni

nitriti mogu predstavljati problem, jer pri reakciji nitrita s proteinima mesa mogu nastati štetna i kancerogena jedinjenja N-nitrozamini.

Pojavljivanje N-nitrozamina u hrani

U hrani, N-nitrozamini se formiraju reakcijom azot-oksida sa aminima. Nitrit u hrani, bilo da vodi porijeklo od nitratnog đubriva, ili je dodan kao konzervans, pod kiselim uslovima, hidrogenira se do hidro nitrogen oksida (H_2NO_2^+) (Slika 33 A). Nakon dehidracije, dobijeni hidro nitrogen oksid reaguje sa drugim molekulama nitrita, da bi se formirao anhidrid azota. Anhidrid azota donira nitrozo grupu, aminima u hrani, za proizvodnju N-nitrozamina (Slika 33 B).



Slika 33. Formiranje N-nitrozamina

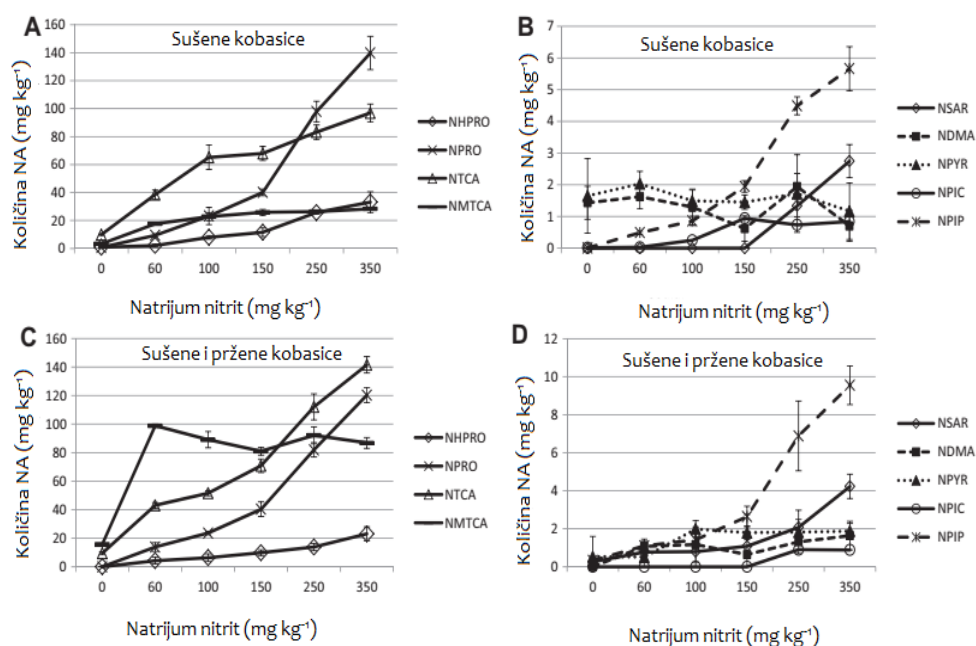
Rezultati pokazuju da se visoke količine NTCA I NMTCA nalaze u dimljenim mesnim proizvodima. Dim, kao i visina temperature tokom procesa dimljenja smatraju se glavnim prekursorima za stvaranje ova dva NA. Važan izvor VNA su riblji proizvodi, koji su glavni izvor izloženosti NDMA u nekim zemljama.

S obzirom da nitratni anhidrid reaguje s neprotoniranim aminima, brzina natoizacije, sekundarnih amina, obrnuto je proporcionalna bazičnosti amina. Optimalan pH za nitrozaciju većinu sekundarnih amina je između 2,5 – 3,5.

N-nitrozaminska jedinjenja prisutna su u širokom rasponu namirnica u kojima se dodaje nitrat za konzerviranje, kao što su sir, ribe (zbog dimetil

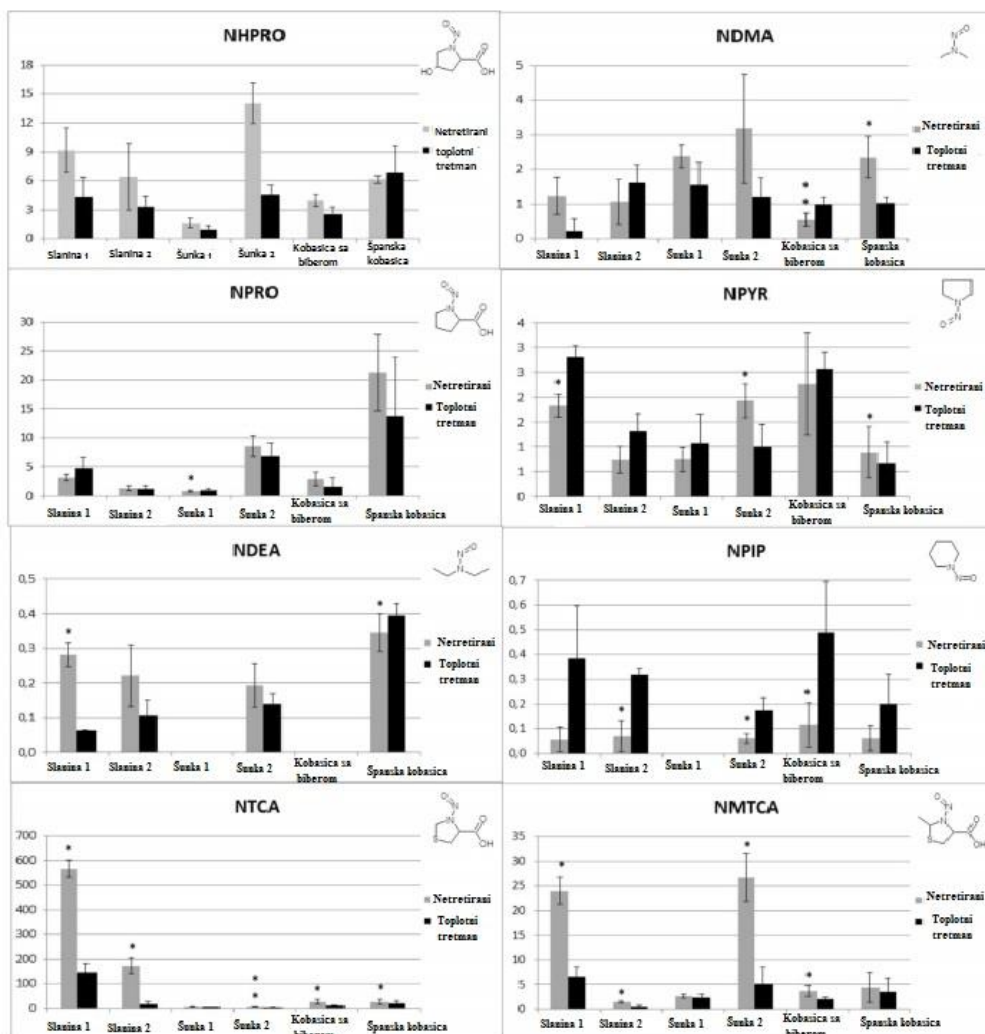
amina), slanina, meso, kobasičarski proizvodi, proizvodi od sušenog i dimljenog mesa, paštete, konzerve, mesni specijaliteti i sl. Nitrati, za razliku od nitrita, nemaju antimikrobno djelovanje, ali se djelovanjem denitrificirajućih bakterija, osobito iz roda *Micrococcus*, redukuju pomoću enzima nitrat-reduktaze u nitrite, te na taj način služe kao izvor nitrita, čija se koncentracija tokom procesiranja značajno smanjuje, čemu dodatno doprinose viša pH vrijednost, redukcijsko djelovanje askorbinske kiseline, termička obrada, te dugotrajno zrenje ili skladištenje. Istraživanja su pokazala da pri ubrzanim fermentacijama u industrijskoj proizvodnji (bakterijske starter kulture, šećeri i povišene temperature fermentacije) ukupno oko 50% dodanih nitrita prelazi u nitrate.

Pored ulazne količine nitrita, postoji širok spektar faktora koji potencijalno mogu utjecati na formiranje NA. Ovi faktori su: kvalitet mesa, sadržaj masti, prerada mesa, sazrijevanje i pakovanje mesa. Faktori koji se odnose na preradu uključuju aditive, toplotu koja se primjenjuje tokom sušenja ili dimljenja, prekursore (dodani preko drveta) dim, začine ili druge sastojke. Dodavanjem crnog bibera u mesne proizvode dolazi do pojave NPIP-a. Studije su pokazale da postoji pozitivna, ali ne i nužno linearna korelacija između količine nitrita i količina formiranih NA. Povećanjem ulazne količine nitrita, nivoi NHPRO, NPRO, NTCA, NMTCA (Slika 34A), NSAR i NPIP (Slika 34C) su povećani u kobasicama. U kobasicama pripremljenim sa 150 mg kg^{-1} nitrita, što je količina nitrita koju je dozvoljeno dodavati u kobasice, za zajedničko evropsko tržište NPIP, NHPRO, NPRO, NTCA i NMTCA (Slika 34A) su pronađeni u nivoima od oko 2, 10, 40, 70 i 25 mg kg^{-1} . Dodatnim povećanjem količine nitrita, postignut je jasan porast NSAR. (Slika 34C). Količine NDMA i NPYR relativno su bile nepromijenjene, sa povećanjem dodanog nitrita.



Slika 34. Nivo NA u sušenim i prženim kobasicama pripremljenim sa 0, 60, 200, 150, 250 ili 350 mg kg^{-1} natrijum nitrita (Herrmann i sar., 2015a)

Ukoliko se kobasice prže, u tavi, nivoi NSAR, NPIP (Slika 34D), NTCA i NMTCA (Slika 34B) se respektivno povećavaju za oko 2, 1,5 i 4 puta. Razlika u količini NTCA, između nepržene (Slika 34A) i pržene kobasice (Slika 34C) rezultirala je jačom pozitivnom korelacijom između dodatog nitrita i nivoa NTCA. Relativno visoka količina NTCA može se proizvesti kada se kobasice prže do središta, na temperaturi od 100 °C. Pokazalo se da se maksimalni nivoi NDMA i NPYR pojavljuju ukoliko se proizvodi zagrijavaju približno do 200 °C. Nasuprot, ako se temperatura dalje povećava, količine ovih NA nešto su niže, zbog isparavanja.



Slika 35. Količine NA u šest mesnih proizvoda nakon i prije toplotnog tretmana (Herrmann i sar. 2015b)

Na Slici 35. predstavljene su izmjerene količine NA u toplotno obrađenim i neobrađenim uzorcima nekih mesnih proizvoda. Konvencionalna metode kuhanja mogu dovesti do reakcija između prisutnih amina i nitrita, u nekim vrstama povrća, i formiranja nitrozamina. Količine NDMA u sirovom, i krompiru procesiranom konvencionalnim metodama kuhanja (prženje, površinsko prženje, ključanje u destiliranoj i pitkoj vodi) prikazane su u Tabeli 42.

Tabela 42. Poređenje nivoa NDMA u uzorcima sirovog krompira, i uzorcima krompira koji su toplotno tretirani (*Qajarbeyg i sar., 2015*)

Metoda kuhanja	$\bar{X} \pm SD$ (mg kg ⁻¹)	Statistički testovi
Sirovi krompir	0 ± 0	F = 15,75
Duboko prženje	2,235 ± 1,3964	
Površinsko prženje	5,092 ± 3,514	df = (4,55)
Ključanje u destilovanoj vodi	0,619 ± 0,797	
Ključanje u pitkoj vodi	1,183 ± 0,577	P < 0,001

Generalno, priprema i metode kuhanja smanjuju količinu nitrata i nitrita. Najviša formacija NDMA se pojavila u površinski prženim uzorcima, što je moguće, zbog dužeg procesa prženja, nekontrolisane toplote i veće izloženosti kisiku. Najniži nivo nitrozaminskog jedinjenja pronađen je u sirovim uzorcima, a zatim u kuhanom krompiru. Obzirom da su nitriti rastvorljivi u vodi, ovaj jon se iz matriksa krompira ispušta u okolnu vodu.

Preventivne mjere

Pošto je nastanak nitrozamina proporcionalan kvadratu koncentracije nitrita, njihova redukcija značajno smanjuje količine nastalih nitrozamina. Kako bi se smanjila upotreba nitrita, i time smanjio rizik nastanka štetnih i kancerogenih nitrozo spojeva u mesnim proizvodima, došlo se na ideju da se potraži zamjena za nitrite, odnosno način na koji bi se smanjio njihov sadržaj. Postoje dvije alternative za rješavanje ovog problema:

- 1) puna ili djelimična zamjena nitrita prirodnim ili nekim drugim sredstvima,
- 2) upotreba sredstava koji blokiraju formiranje nitrozamina u proizvodima koji sadrže konvencionalne koncentracije nitrita.

Dodavanje inhibitora sinteze nitrozamina (askorbati, cistein, galna kiselina, tanini, natrij sulfat i natrij eritrobat) u smjesu za salamurenje je jedan od načina smanjenja formiranja N-nitrozamina u hrani.

Kod sušenja slada preporučuje se promjena vođenja tehnološkoga procesa, tako da se sušenje odvija grijanim zrakom, umjesto direktnim sagorijevnim plinovima, čime se značajno smanjuje količina nitrozamina.

Analitičke tehnike za određivanje nitrata, nitrita i N-nitrozamina

Nitritni i nitratni anioni mogu se otkriti hromatografskom tehnikom tekuće hromatografije (engl. High Performance Liquid Chromatography- HPLC).

Nitriti se mogu odrediti i titracijski sa permanganatom, no najviše korištena metoda za određivanje konzervirajućeg sredstva u mesnim proizvodima je mjerenje nitrita nakon kolorimetrijske reakcije, a nitrata nakon redukcije u nitrite. Kolorimetrijsko ispitivanje temelji se na reakciji nitrita, sulfanil amida i *N*-(1-naftil)-etilendiamina u kiselim uslovima do formiranja crvene azo boje koja ima apsorbanciju maksimalno 540 nm.

Identifikacija i kvantifikacija N-nitrozamina najčešće se provodi metodom gasne hromatografije i masene spektrofotometrije (GC/MS).

5. 5. HLORPROPANOLI I GLICIDIL ESTERI MASNIH KISELINA U HRANI

Prisustvo 2- i 3-monohloropropan-1,2-diola, njihovih estera masnih kiselina i glicidil estera masnih kiselina u hrani izaziva zabrinutost zbog rezultata toksikoloških studija, koje su pokazale da ova jedinjenja mogu ugroziti ljudsko zdravlje.

Hloropropanoli

U martu 2016. godine, EFSA je izdala izvještaj upozorenja o zdravstvenim posljedicama hloropropanola, termički indukovanih zagađivača hrane stvorenih tokom prerade i rafinisanja jestivih ulja.

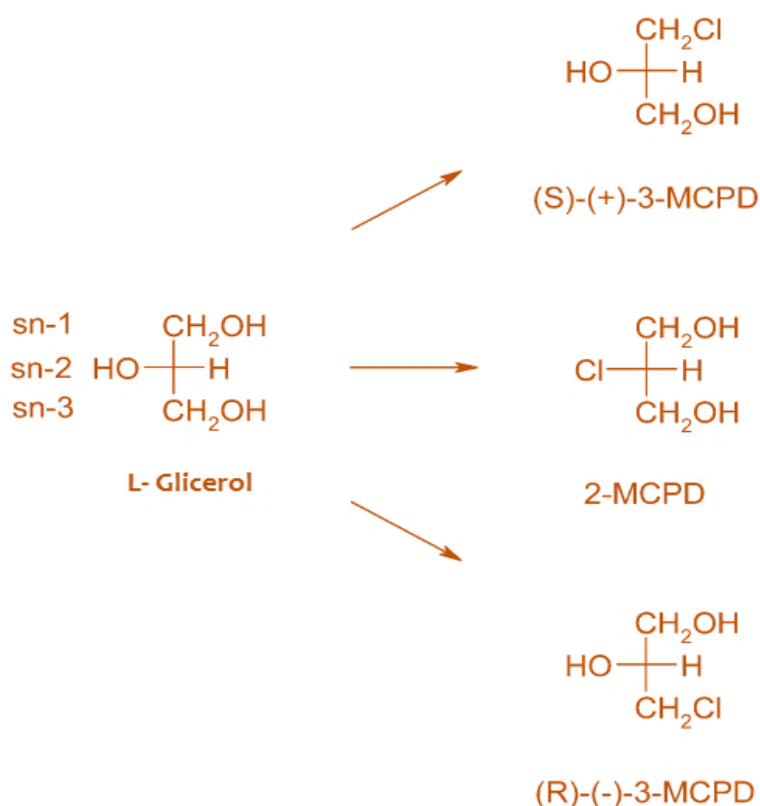
Glavna dva spoja (Slika 36) iz skupine neisparljivih hloropropanola, 3-monohloropropan-1,2-diol (3-MCPD) i 2-monohloropropan-1,3-diol (2-MCPD) su hlorirani derivati glicerola (1,2,3-propantriola).



Slika 36. Hemijska struktura 3-MCPD (A) i 2-MCPD (B)

3 i 2-MCPDs su prvi put identifikovani kasnih sedamdesetih godina u sastavu hidroliziranog biljnog proteina (HVP) koji se koristi kao ukusan prehrambeni sastojak hrane. Iako se hloropropanoli najčešće povezuju sa sojinim umakom i kiselo hidroliziranim biljnim proteinima (HVP), ti se toksikanti pojavljuju u širokom spektru hrane i teško ih je izbjeći.

Struktura MCPDs sugerše da biglicerol (Slika 37.) i / ili glicero lipidi mogli biti prekursori njegovog formiranja u prerađenoj hrani.



Slika 37. Monohloropropandiol izomeri (MCPDs) i njihova veza do glicerola (prikazano u projekciji Fischer-a). Enantiomeri 3 MCPDse formiraju kada se -OH zamijeni sa -Cl u položaj sn-1 ilisn-3 na glicerolnu osnovu (Hamlet i sar., 2004)

Pojavljivanje hlorpropanola u hrani

Prisutnost 3 i 2-MCPDE u velikom broju prerađene hrana, prvi put je opisana 2004. godine, nakon čega je 2006. godine otkrivena visoka koncentracija u rafiniranim, bijeljenim i deodoriziranim (RDB) biljnim uljima.

Lista namirnica i sastojaka u kojima je otkriven 3-MCPDs: pržena hrana, hrana za dojenčad, proizvodi od mesa, mliječni proizvodi, žitarice i pekarski proizvodi, supe, umaci i pržena kafa. Također, ovaj spoj je pronađen i u uzorcima sušene slanine, gdje je nastao kao posljedica procesa dimljenja. Istraživanja su pokazala da je formiranje MCPDs u tijestu sa kvascem konzistentno bila veća, od one u beskvasnom tijestu, i da je odnos formiranih izomera, 3-MCPD i 2-MCPD, bio veći u posljednjem. Ove opservacije mogle su se privremeno dodijeliti povećanim nivoima glicerola, iz dodatog kvasca, a također, su ukazale da formacija MCPDs može biti proizvod više od jednog prekursora.

Istraživanja su pokazala da se povećane količine 3-MCPD mogu naći u tostiranom hljebu, nekim vrstama prženog sira i prženom maslacu. U kori hljeba se može naći i do 400 µg/kg 3-MCPD-a. U manjim koncentracijama može se naći i u proizvodima od slada (pivo, keksi), s tim da su utvrđene veće koncentracije kod tamnog slada, zbog veće temperature obrade.

Prethodne studije su utvrdile da MCPD može biti proizveden kao manji proizvod iz reakcije hlorovodične kiseline s glicerolom, acilglicerolima i fosfolipidima i da ovim mehanizmima predstavljene količine imaju nivoe koje nalazimo u HVP i sojinim umacima dobijenim kiselom hidrolizom.

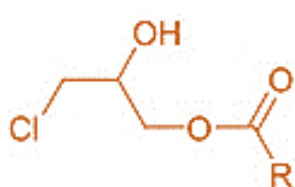
U kuhanom mesu i varivima, njegove količine su jako male ili se čak ne mogu detektovati. Različitost dobivenih rezultata može biti vezana uz visoku aktivnost vode, prilikom pripreme kuhanog mesa i variva, što kao rezultat ima ograničeno nastajanje 3-MCPD.

U tabeli 43. su predstavljene koncentracije 3-MCPD i 2-MCPD u nekoj vrsti hrane i sastojcima hrane

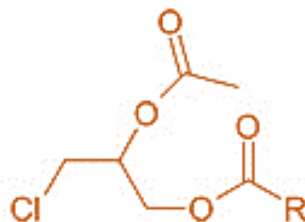
Dalja istraživanja su pokazala, da je 3-MCPD prisutan u hrani, ne samo u svojoj slobodnoj formi, već i u obliku estera (Slika 38) sa masnim kiselinama (palmitinska, oleinska, stearinska, itd.). Najčešći esteri hloropropanola, u termički obrađenoj hrani, su 3 –hloropropan-1,2-diol (3-MCPD) esteri. Međutim, esteri 2-MCPD, također se mogu pojaviti u niskim ili beznačajnim koncentracijama. Hloropropanolni esteri se mogu hidrolizirati do slobodnih hloropropanola.

Tabela 43. Koncentracije 3-MCPD i 2-MCPD u nekoj vrsti hrane i sastojcima hrane

Hrana	N	3-MCPD (µg/kg)		2-MCPD (µg/kg)		Referenca
		Prosjek	Raspon	Prosjek	Raspon	
Ekstra djevičansko maslinovo ulje	20	0,1	ND-0,2	-	-	Hung i sar., 2017
Maslinovo ulje	15	4,0	1,0-7,6	-	-	Hung i sar., 2017
Ulje od maslinove komine	7	12,3	7,4-20,56	-	-	Hung i sar., 2017
Suncokretovo ulje	11	230	80-960	110	20-520	Kuhlmann i sar., 2016
Rafinirano palmino ulje	6	1330	180-2480	650	80-1650	Kuhlmann i sar., 2016
Rafinirano ulje uljane repice	5	440	30-510	210	10-310	Kuhlmann i sar., 2016
Riblje ulje	5	-	1500-5500	-	100-230	Jedrkiewicz i sar., 2016
Kukuruzno ulje	38	503	502-505	233	-	EFSA, 2016
Ulje uljane repice	294	232	224-239	109	78-140	EFSA, 2016
Sojino ulje	191	394	392-396	167	159-175	EFSA, 2016
Kokosovo ulj/mast	204	608	608	169	143-194	EFSA, 2016
Palmino ulje/mast	501	2912	2912	1565	1563-1566	EFSA, 2016
Margarin i slični proizvodi	170	408	406-409	159	152-166	EFSA, 2016
Ekstra djevičansko maslinovo ulje	46	133	ND-116	61	ND-580	Kamikata i sar., 2019
Maslinovo ulje	13	856	280-3777	420	170-1910	Kamikata i sar., 2019
Uljne mješavine	17	304	180-610	120	ND-250	Kamikata i sar., 2019
Infant formula	88	185	0-316	41	0-52	Wang i sar., 2016
Hljeb i pecivo	75	29	23-36	14	9,8-19	EFSA, 2016
Žitarice za doručak	66	26	19-33	15	10-20	EFSA, 2016
Fini pekarski proizvodi	88	172	167-178	87	82-92	EFSA, 2016



3 - MCPD monomer



3 - MCPD diester

Slika 38. Hemijska struktura 3-MCPD estera

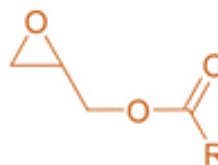
Od 1980. 3-MCPD esteri su proučavani kao kontaminanti prerađene hrane, a nalaze se u različitim vrstama hrane i sastojcima hrane, osobito u rafiniranim jestivim uljima. Najvažniji prekursori estera hloropropanola, identifikovanih u hrani, su masti, koje se dobijaju iz glicerola (glicerolipida), i hloridi koji su prirodno prisutni ili dodati kao NaCl.

Glicidil esteri masnih kiselina

Pojava glicidil estera masnih kiselina (GEs), u rafinisanim jestivim uljima, prvi put je prijavljena 2008. godine. Preliminarne procjene rizika izazvale su neposrednu brigu za zdravlje, zbog izloženosti ljudi tim supstancama, što je stimuliralo intenzivno istraživanje na ovu temu.



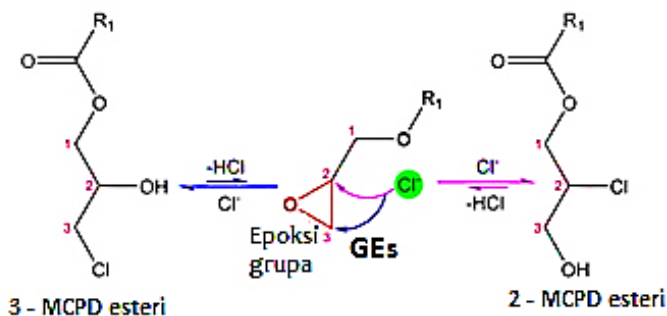
Slika 39. Hemijska struktura glicidola



Slika 40. Hemijska struktura GEs

Nekoliko izvještaja je također sugerisalo da se proces dvosmjerne transformacije može pojaviti ne samo između glicidola i 3-MCPD, nego i

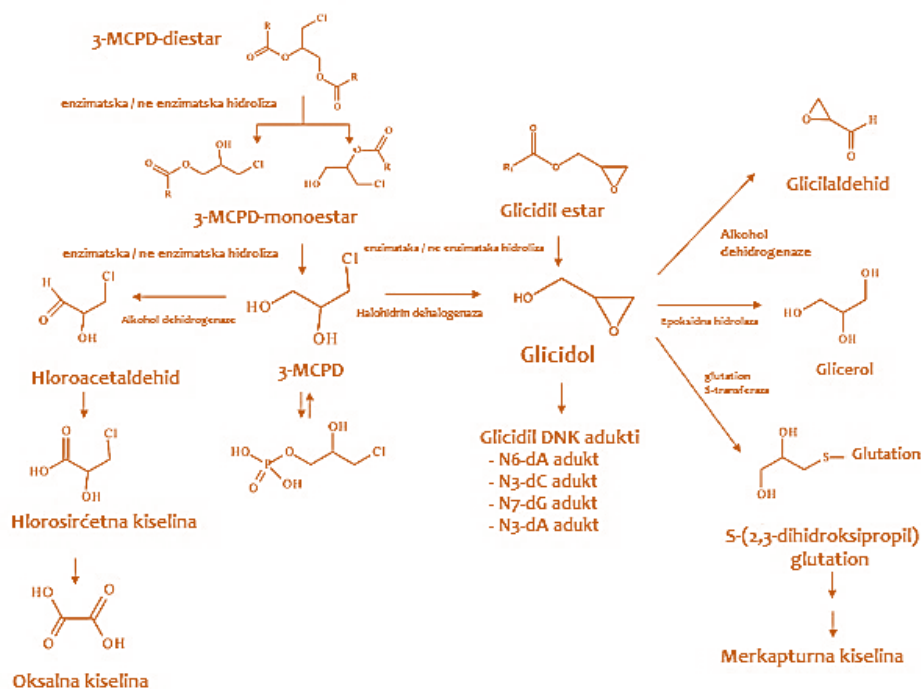
njegovih esterifikovanih oblika, u prisustvu hloridnogjona (Slika 41). Glicidol (Slika 39) , koji je povezan sa formiranjem i raspadom 3- i 2-MCPD, tokom procesa rafinisanja ulja, formira monoestresa masnim kiselinama (GEs). GEs sadrže zajedničku terminalnu epoksidnu grupu, ali pokazuju različite sastave masnih kiselina (Slika 40).



Slika 41. Potencijalni mehanizam konverzije GEs do 3-MCPD ili 2-MCPD estera; R₁, grupa masnih kiselina (Cheng i sar., 2017)

Brzina transformacije glicidola u 3-MCPD, u kiselim uslovima, u prisustvu hloridnogjona, veća je u odnosu na transformaciju 3-MCPD-a u glicidol. Istovremeno, odgovarajući esteri mogu pokazati slično ponašanje konverzije. Stoga, posljednjih godina je usmjerena sve veća pažnja na mehanizme formiranja GEs, kao i na metode njihovog određivanja i eliminacije, posebno u jestivim uljima i prehrambenim proizvodima na bazi ulja i masti. Prekursori GEs u rafiniranim uljima su identificirani kao djelomični acilgliceroli, tj. DAG i monoacilgliceridi (MAGs). Međutim, da li potiču od triacilglicerida (TAGs) još uvijek je tema kontroverznih rasprava. Nekoliko autora je istaklo da su čisti triacilgliceridi (TAG) stabilni tokom termičke obrade (235°C) tokom 3 sata, i stoga nisu bili uključeni u GEs. Međutim, noviji eksperimentalni rezultati pokazali su da su male količine GEs prisutne, u toplinski tretiranom modelu ulja, koji se sastojao od skoro 100% triacilglicerida. Rezultati Fourier-transformirane infracrvene (FTIR) spektroskopije su pokazali da se formiranje GE iz TAG-a može pripisati pirolizi TAG-a DAG-a i MAG-a. Nasuprot tome, estri 3-MCPD u rafiniranim

uljima mogu se dobiti od TAG-a. Trenutno, još uvijek je nepoznat mehanizam posrednika za formiranje GEs, kao i odnos između GEs i 3-MCPD estera. Pretpostavljeni metabolički putovi za formiranje MCPD i GEs prikazani su na Slici 42.



Slika 42. Pretpostavljeni metabolički putovi za formiranje MCPDs i GEs (Arisseto i sar., 2018)

Pojavljivanje u hrani

Raspoloživi podaci o sadržaju GEs, u hrani, se uglavnom ograničavaju na rafinirana jestiva ulja i prehrambene proizvode na bazi ulja (Tabela 44). Rižino i palmino ulje se pokazalo kao najosjetljivije za formiranje GE-ova, oba preko 30 mg / kg ulja. Palmino ulje sadrži prosječno oko 6,5% DAGs koji su prekursori za nastajanje GEs. Ova činjenica, također objašnjava relativno visoke koncentracije GEs u palminom ulju, dok je stvarni razlog za visok sadržaj GEs u rižinom ulju, još uvijek nejasan. Siroma ili nerafinisana ulja i masti, kao što je ekstra djevičansko maslinovo ulje, ne sadrže GEs, ili ih sadrže samo u tragovima.

Tabela 44. Koncentracija GEs u hrani i sastojcima hrane

Hrana	N	GE (µg/kg)		Referenca
		Prosjek	Raspon	
Ekstra djevičansko maslinovo ulje	20	-	-	Hung i sar., 2017
Suncokretovo ulje	11	110	20-520	Kuhlmann i sar., 2016
Rafinirano palmino ulje	6	650	80-1650	Kuhlmann i sar., 2016
Rafinirano ulje uljane repice	5	210	10-310	Kuhlmann i sar., 2016
Riblje ulje	5	-	100-230	Jedrkiewicz i sar., 2016
Ulje uljane repice	294	109	78-140	EFSA, 2016
Sojino ulje	191	167	159-175	EFSA, 2016
Kokosovo ulje/mast	204	169	143-194	EFSA, 2016
Palmino ulje/mast	501	1565	1563-1566	EFSA, 2016
Margarin i slični proizvodi	170	159	152-166	EFSA, 2016
Ekstra djevičansko maslinovo ulje	46	61	ND-580	Kamikata i sar., 2019
Maslinovo ulje	13	420	170-1910	Kamikata i sar., 2019
Infant formula	88	41	0-52	Wang i sar., 2016
Hljeb i pecivo	75	14	9,8-19	EFSA, 2016
Žitarice za doručak	66	15	10-20	EFSA, 2016

Zdravstveni rizici

Uprkos strukturnoj sličnosti 2 i 3-MCPD mogu imati različite, i specifične metaboličke i toksikološke profile. Ukratko, pojavljuje se opšta slika u kojoj 3-MCPD, nakon metabolizma, inhibira glikolitičke enzime i uzrokuje oksidativni stres, što dovodi do toksikoloških manifestacija zabilježenih kod bubrega i muškog reproduktivnog sistema. Većina odabranih studija, kao glavni efekat izazvan ponovljenim izloženost 3-MCPD-u su pokazale smanjene pokretljivosti spermatozoida. Prema Međunarodnoj agenciji za istraživanje raka (IARC), ovaj spoj je klasificiran kao mogući kancerogen za ljude (skupina 2B). Glicidol se smatra genotoksičnim kancerogenom i klasifikovan je od strane IARC-a kao vjerojatno kancerogenim za ljude (skupina 2A).

Preventivne mjere

Da bi se smanjila količina hlorpropanola u hrani, moraju se uzeti u obzir sljedeći faktori: pH, temperatura, vlaga i vrijeme trajanja procesa. Mehanizmi smanjenja količine hlorpropanola mogu se sažeti na: povišenje pH hrane sa visokim sadržajem vlage, sniženje maksimalne temperature obrade i sadržaja soli u hrani, izbjegavanje obrade hrane sa niskom vlažnošću na visokoj temperaturi, ograničavanje količine glicerola u hrani tokom pripreme i čuvanja, izbjegavati korištenje parcijalnih glicerida kao aditiva, inaktivacija lipaza/esteraza i korištenje začinskih ekstrakta umjesto svježeg začinskog bilja i smanjenja mikrobiološkog onečišćenja termičkim tretmanom.

Prilikom proizvodnje hidroliziranih biljnih proteina, preporučuje se modifikacija procesa hidrolize da bi se smanjila količina hlorpropanola (što smo prethodno naveli), ali pri tome nije moguće dobiti organoleptički prihvatljiv proizvod koji bi imao manje od 0,1 mg/kg 3-MCPD što predstavlja veliki problem za proizvođače. Također, u cilju smanjenja količina hlorpropanola može se proizvod (nakon završenog procesa proizvodnje) tretirati bazama kod pH 8,5 na 100 °C tokom 2 h, a proizvod ostaje organoleptički prihvatljiv. Kod dimljenja se može dodati 20 % kalcijevog

karbonata (CaCO_3) u pelete za dimljenje čime se značajno smanjuje nastanak hloropropanola u dimu, a time i u proizvodu.

Također, njegovo stvaranje pri stvaranju hidroliziranog biljnog proteina uz hlorovodoničnu kiselinu ovisno je o uslovima samog procesa, te se koncentracije mogu značajno smanjiti određenim modifikacijama samog procesa proizvodnje.

U novije vrijeme je potvrđeno, da je stvaranje 3-MCPD estera povezano s oksidacijom ulja zbog sudjelovanja slobodnih radikala u procesu njihovog formiranja. Stoga, modifikacija postupka destilacije parom može vjerojatno smanjiti sadržaj GEs u rafiniranim uljima. Za razliku od 3-MCPD estera, prekursori GEs su obuhvaćeni samo DAGs i MAGs, a ne hloridnim jonima. Stoga, smatra se da se količine 3 MCPD estera, mogu smanjiti uklanjanjem hloridnih Jona, ispiranjem vodom, iako taj proces ne mijenja koncentracije GEs. Već je utvrđeno da početni sadržaj DAG i MAG u sirovim uljima pokazuje izražen uticaj na formiranje GEs. Uklanjanje DAGs i MAGs, čini se najjednostavnijim načinom, da se smanji formiranje GEs. Kao što je gore spomenuto, DAGs i MAGs se uglavnom formiraju hidrolizom TAGs, koja je rezultat aktivnosti endogene lipaze, nakon sazrijevanja uljanih biljaka, prije inaktivacije. Također, objavljeno je da oštećene uljane sjemenke / plodovi imaju višu lipolitičku aktivnosti, od neoštećenih uljanih sjemenka / voća. Štaviše, prezreli plodovi, kašnjenje obrade, grubo rukovanje grozdovima uljarica, može doprinijeti prisustvu visokih koncentracija DAG i MAG u sirovim uljima. Hlađenje uljnog voća može također pojačati hidrolizu lipaze, za koju je nađeno da inducira do 70% slobodnih masnih kiselina u plodovima palmi, kada je podvrgnuto hlađenju od 5 °C. Uzeti zajedno, ovi faktori objašnjavaju zašto se GEs sadržaji razlikuju u palminim uljima sa različitim lokacija.

Za proizvođače ulja, eliminacija GEs treba početi sa izborom biljaka (različite lokacije i uslovi kultivacije). Primjena nekih poljoprivrednih praksi, između žetve i prerade uljanih plodova / sjemenki neophodna je za smanjenje aktivnosti lipaze. Ove prakse uključuju modifikaciju uslova žetve, minimiziranje pucanja plodova ulja, prilikom transporta u fabrike, izbjegavanje oštećenja, smanjivanje intervala vremena, između žetve i

mljevenja, i tako dalje. Sve ove prakse imaju za cilj spriječiti formiranje DAGs i MAGs. Iz tog razloga, faza sterilizacije tokom mljevenja uljanih sjemenki ili voća, namijenjene za inaktiviranje enzima, kao što su lipaze, i za omekšavanje plodova za brzo uklanjanje iz grozdova, treba držati na ili ispod 120°C. DAGs i MAGs mogu se također ukloniti dodavanjem adsorpcijskih materijala. Amorfni magnezijev silikat i kalcinirani zeolit mogu smanjiti polarne komponente, kao što su DAGs i MAGs za oko 25%. Stoga je u budućnosti potrebno poboljšati postupak izbjeljivanja, s dodatnim uklanjanjem polarnih komponenata, kako bi se osiguralo smanjenje formiranja GEs, kao i estera 3-MCPD tokom deodorizacije ulja. Pravilna modifikacija temperature (< 240°C) deodorizacije i vrijeme su ključni parametri za sprječavanje formiranja GEs. Umjesto konvencionalne deodorizacije trebalo bi primijeniti destilaciju kratkog puta, s temperaturom kondenzatora od 60 °C i temperaturom isparivača od 170°C. Osim toga, faza prženja, tokom prešanja ulja također uključuje toplinsku obradu, s lokalnom temperaturom preko 200°C, koja se čini, da je odgovarajući raspon temperature, za formiranje GEs. Neutralizacija slobodnih masnih kiselina, dodavanjem alkalnih supstanci, kao što su Na₂CO₃ i NaHCO₃, može smanjiti formiranje GEs, tokom deodorizacije ulja. Isto tako, povećanje pH, također ima uticaj na smanjenje GE, kao i 3-MCPD-a i njegovih estara, u rafiniranim uljima.

Analitičke tehnike za određivanje hlorpropanola i GEs u hrani

Analitičke metode za određivanje 3-MCPD, 2-MCPD i GEs mogu se grupisati u direktne i indirektne pristupe. Od indirektnih metoda, koje zahtijevaju konverziju esterifikovanih oblika jedinjenja, u svoje slobodne forme, prije hromatografske analize, koristi se gasna hromatografija spojena sa masenom spektrometrijom (GC-MS). Također, tečna hromatografija visoke performanse sa masenom spektrometrijom (LC-MS / MS) se koristi za identifikaciju i kvantifikaciju 3. MCPD i GEs. Američko hemijsko društvo za uljne/naftne derivate (AOCS) objavilo je tri službene metode (AOCS Cd 29a 13, Cd 29b 13 i Cd 29c 13) za analizu 3-MCPD, 2-MCPD i GEs u biljnim uljima i mastima. Službene metode AOCS-a su nedavno uključile, i novi protokol

AOCS Cd 30-15, za određivanje zagađivača u emulzijama. Za pripremu uzoraka koristi se MS visoke rezolucije (HRMS-Orbitrap) i modifikovana QuEChERS tehnika.

5. 6. LITERATURA

1. Anderson, LA., Franz, AK. (2012): Real-time monitoring of transesterification by ^1H NMR spectroscopy: catalyst comparison and improved calculation for biodiesel conversion. *Energ Fuel* 26:6404–10.
2. Aniołowska, M., Kita, A. (2015): The effect of type of oil and degree of degradation on glycidyl esters content during the frying of french fries. *J Am Oil Chem Soc* 92:1621–31.
3. Aniolowska, M., Kita, A. (2016): Monitoring of glycidyl fatty acid esters unrefined vegetable oils from retail outlets by LC–MS. *J Sci Food Agric* 96:4056–61.
4. Aniolowska, M., Kita, A. (2016): The effect of frying on glycidyl esters content in palm oil. *Food Chem* 203:95–103.
5. Aniolowska, M., Kita, A. (2016): The effect of raw materials on thermo-oxidative stability and glycidyl ester content of palm oil during frying. *J Sci Food Agric* 96:2257–64.
6. Ariseto, A.P., Silva, W.C., Tivanello, R.G., Vicente, E. (2018): Recent advances in toxicity and analytical methods of monochloropropanediols and glycidyl fatty acid esters in foods. *Current Opinion in Food Science* 24, 36–42.
7. Cheng W, Liu G, Liu X. (2016): Formation of glycidyl fatty acid esters both in real edible oil during laboratory-scale refining and in chemical model during high temperature exposure. *J Agric Food Chem* 64: 5919–27.
8. Cheng, W., Liu, G., Wang, L., Liu, Z (2017): Glycidyl Fatty Acid Esters in Refined Edible Oils: A Review on Formation, Occurrence, Analysis, and Elimination Methods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, Vol.16, 263-281.
9. Christodouleas, D. C., Fotakis, C., Nikokavoura, A., Papadopoulos, K., & Calokerinos, A. C. (2014): Modified DPPH and ABTS assays to assess the

- antioxidant profile of untreated oils. *Food Analytical Methods*, 8(5), 1294-1302.
10. Chung, J.C., Chou, S.S., Hwang, D.F. (2004): Changes in nitrate and nitrite content of four vegetables during storage at refrigerated and ambient temperatures. *Food Additives and Contaminants*, 21, 317-322.
 11. De Mey, E., De Klerck, K., De Maere, H., Dewulf, L., Derdelinckx, G., Peeters, M., i sar. (2014): The occurrence of N-nitrosamines, residual nitrite and biogenic amines in commercial dry fermented sausages and evaluation of their occasional relation. *Meat Science*, 96(2, Part A), 821-828.
 12. Demirok, S., E., Haskaraca, G., Kolsarıcı, N. (2018): Presence of acrylamide and heterocyclic aromatic amines in breaded chicken meat products and dietary exposure of Turkish population from Ankara based on the food frequency questionnaire study. *European Food Research and Technology*, 244(3), 501-511.
 13. Destailats F, Craft BD, Sandoz L, Nagy K. (2012b): Formation mechanisms of monochloropropanediol (MCPD) fatty acid diesters in refined palm (*Elaeisguineensis*) oil and related fractions. *Food Addit Contam A* 29:29-37.
 14. Drabik-Markiewicz, G., Van den Maagdenberg, K., De Mey, E., Deprez, S., Kowalska, T., Paelinck, H. (2009): Role of proline and hydroxyproline in N-nitrosamine formation during heating in cured meat. *Meat Science*, 81(3), 479-486.
 15. Drabik-Markiewicz, G., Dejaegher, B., De Mey, E., Kowalska, T., Paelinck, H., & Vander Heyden, Y. (2011): Influence of putrescine, cadaverine, spermidine or spermine on the formation of N-nitrosamine in heated cured pork meat. *Food Chemistry*, 126(4), 1539-1545.
 16. Dundar, A., Sarıcoban, C., Yılmaz, M. T. (2012): Response surface optimization of effects of some processing variables on carcinogenic/mutagenic heterocyclic aromatic amine (HAA) content in cooked patties. *Meat Science*, 91, 325-333.
 17. Dybing E, Sanner T (2003): Risk Assessment of Acrylamide in Foods. *Toxicological Sciences*, 75:7-15.
 18. EFSA CONTAM Panel (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain):(2016): Scientific opinion on the risks for human health related to the presence of 3- and 2-monochloropropanediol (MCPD), and their fatty

- acid esters, and glycidyl fatty acid esters in food. *EFSA Journal* 14(5):4426, 159, <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4426>.
19. EFSA, European Food Safety Authority (2011): Results on acrylamide levels in food from monitoring years 2007-2009 and Exposure assessment. *EFSA Journal* 2011;9(4):2133, Parma.
 20. EFSA, European Food Safety Authority (2012): Update on acrylamide levels in food from monitoring years 2007 to 2010. *EFSA Journal* 2012;10(10):2938, Parma.
 21. European Food Safety Authority (EFSA): Risks for human health related to the presence of 3- and 2-monochloropropanediol (MCPD), and their fatty acid esters, and glycidyl fatty acid esters in food. *EFSA Journal* 2016, 14:4426.
 22. García-Falcón, M. S., Simal-Gándara, J. (2005): Polycyclic aromatic hydrocarbons in smoke from sausages with collagen and tripe casings. *Food Additives & Contaminants* 22, 1-8.
 23. Gibis, M and Weiss, J. (2015): Impact of Precursors Creatine, Creatinine, and Glucose on the Formation of Heterocyclic Aromatic Amines in Grilled Patties of Various Animal Species. *Journal of Food Science*, Vol. 80, No 11, 2430-2439.
 24. HAH- Hrvatska agencija za hranu (2014): Znanstveno izvješće o rezultatima istraživanja akrilamida u hrani za 2013. godinu. OB-34-01, 6-8.
 25. Hamlet, C. G., Jayaratne, S. M., Matthews, W. (2002): 3 – Monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD) in food ingredients from UK food producers and ingredient suppliers. *Food Addit. Contam.*,19, 15-21.
 26. Hamlet, C. G. Sadd, P. A., Gray, D. A. (2004): Generation of Monochloropropanediols (MCPDs) in Model Dough Systems. 1. Leavened Doughs. *J. Agric. Food Chem.* 52, 2059-2066.
 27. Hasnol, N. D. S., Jinap, S., & Sanny, M. (2014): Effect of different types of sugars in a marinating formulation on the formation of heterocyclic amines in grilled chicken. *Food Chemistry*, 145, 514–521.
 28. Helmus, DS., Thompson, CL., Zelenskiy, S, Tucker, TC., Li, L. (2013): Red Meat-Derive Heterocyclic Amines Increase Risk of Colon Cancer: A Population-Based Case Control Study. *Nutr Cancer.* 65:1141-1150.

29. Herrmann, S.S., Duedahl-Olesen, L., Granby, K. (2014): Simultaneous determination of volatile and non-volatile nitrosamines in processed meat products by liquid chromatography tandem massspectrometry using atmospheric pressure chemical ionisation and electrosprayonisation. *Journal of Chromatography A*, 1330, 20–29.
30. Herrmann, S.S., Granby, K., Duedahl-Olesen, L. (2015): Formation and mitigation of N-nitrosamines in nitrite preserved cooked sausages. *Food Chemistry* 174 (2015) 516–526.
31. Herrmann, S.S., Duedahl-Olesen, L., Granby, K. (2015): Occurrence of volatile and non-volatile N-nitrosamines in processed meat products and the role of heat treatment. *Food Control* 48, 163-169.
32. Hogervorst, JG., Schouten, LJ., Konings, EJ., Goldbohm, RA., Brandt. PA. (2007): A Prospective Study of Dietary Acrylamide Intake and the Risk of Endometrial, Ovarian and Breast Cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 16:2304-2313.
33. Hori, K., Hori-Koriyama, N., Tsumura, K., Fukusaki, E., Bamba, T. (2016): Insights into the formation mechanism of chloropropanol fatty acid esters under laboratory-scale deodorization conditions. *J Biosci Bioengr* 112:246–51.
34. Hung, WC., Peng, GJ., Tsai, WJ., Chang, MH., Liao, CD., Tseng, SH., Kao, YM., Wang, DY., Cheng, HF. (2017): Identification of 3-MCPD esters to verify the adulteration of extra virgin olive oil. *Food Addit Contam Part B Surveill* 10:233-239.
35. International Agency for Research on Cancer (IARC). (2016): 3-Monochloro-1,2-propanediol. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, vol. 101349-374.
36. Jedrkiewicz, R., Glowacz, A., Gromadzka, J., Namie, J. (2016): Determination of 3-MCPD and 2-MCPD esters in edible oils, fish oils and lipid fractions of margarines available on Polish market. *Food Control*, 59:487-492.
37. Jungwon, K., Inhwan, K., BoKyung, M., Kwang-Won, L., Mun Yhung, J., Jihyun, L. (2023): The effects of different cooking methods and spices on the formation of 11 HCAs in chicken wing and pork belly. *Food Control* 147, 109572. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109572>

38. Kamikata, K., Vicente, E., Ariseto-Bragotto, AP., de Miguel, AMR., Milani, RF., Tfouni, SAV. (2019): Occurrence of 3-MCPD, 2-MCPD and glycidyl esters in extra virgin olive oils, and oil blends and correlation with identity and quality parameters. *Food Control*, 95:135-141.
39. Khan, IA., Yiqun, C., Zongshuai, Z., Ijaz, MU., Brohi, SA., Ahmad, MLJ., Shi, C., Hussain, M., Huang, J., and Huan, M. (2018): Occurrence of Heterocyclic Amines in Commercial Fast-Food Meat Products Available on the Chinese Market and Assessment of Human Exposure to these Compounds, <https://www.researchgate.net/publication/329767267>.
40. Knežević, Z., Bilandžić, N., Serdar, M., Sedak, M., Đokić, M., Varenina, I., Solomun, B. (2010): Nastajanje mutagena u hrani tijekom toplinske obrade. *Meso*, Vol. XII, 236-243.
41. Krishnakumar, T., Visvanathan, R. (2014): Acrylamide in Food Products: A Review, *Food Processing and Technology*, Vo. 5, No. 7: 2-12.
42. Kuhlmann, J. (2016): Analysis and occurrence of dichloropropanol fatty acid esters and related process-induced contaminants in edible oils and fats. *Eur J Lipid Sci Technol*, 118:382-395.
43. Leigh, J., MacMahon, S. (2017): Occurrence of 3- monochloropropanediol esters and glycidyl esters in commercial infant formulas in the United States. *Food Addit Contam Part A*, 34:356-370.
44. Liao, G. Z., Wang, G. Y., Xu, X. L., & Zhou, G. H. (2010): Effect of cooking methods on the formation of heterocyclic aromatic amines in chicken and duck breast. *Meat Science*, 85(1), 149–154.
45. Li, L., Wang, P., Xu, X., Zhou, G. (2012): Influence of various cooking methods on the concentrations of volatile N-nitrosamines and biogenic amines in dry-cured sausages. *Journal of Food Science*, 77(5), C560–C565.
46. Mey, E., Maere, H., Dewulf, L., Paelinck, H., Sajewicz, M., Fraeye, I., et al. (2014): Assessment of the N-nitrosopiperidine formation risk from piperine and piperidine contained in spices used as meat product additives. *European Food Research and Technology*, 238(3), 477–484.
47. Mills, C., Mottram, DS., Wedzicha, BL. (2009): 2.1 Acrylamide. In *Process-Induced Food Toxicants: Occurrence, Formation, Mitigation, and Health Risks*. John Wiley & Sons, Hoboken (New York).

48. Molle, D., Aballe, C., Gomes, F., Furlani, R., Tfouni, S. (2017): Polycyclic aromatic hydrocarbons in canola, sunflower and corn oils and estimated daily intake. *Food Control* Vo 81, 96-100.
49. Nisha, A.R., Dinesh Kumar. V., Arivudainambi, S., Umer, M., Khan, M.S. (2015): Polycyclic aromatic hydrocarbons in processed meats: A toxicological perspective. *Research Journal of Chemistry and Environment*. Vol. 19 (6), 72-76.
50. Onopiuk, A., Kołodziejczak, K., Szpicer, A., Wojtasik-Kalinowska, I., Wierzbicka, A., Półtorak, A. (2021): Analysis of factors that influence the PAH profile and amount in meat products subjected to thermal processing. *Trends Food Sci. Technol.*, 115, 366–379.
51. Oz, F., Kaya, M. (2011): The inhibitory effect of red pepper on heterocyclic aromatic amines in fried beef Longissimus dorsi muscle. *J Food Process Pres* doi: 10.1111/j.1745-4549. 2011.00532.x.
52. Oz, F., Kaya, M. (2011): The inhibitory effect of black pepper on formation of heterocyclic aromatic amines in high-fat meat ball. *Food Control* 22: 596–600.
53. Plaza-Bolaños, P., Frenich, A. G., & Vidal, J. L. M. (2010): Polycyclic aromatic hydrocarbons food and beverages. Analytical methods and trends. *Journal of Chromatography A*, 1217(41), 6303-6326.
54. Raj, A., Prada, I. D. C., Amer, A. A., & Chung, S. H. (2012): A reaction mechanism for gasoline surrogate fuels for large polycyclic aromatic hydrocarbons. *Combustion and Flame*, 159(2), 500-515.
55. Sadowska-Rociek, A., Surma, M., Cieslik, E. (2018.): Analysis of acrylamide, 3-monochloropropane-1,2-diol, its esters and glycidyl esters in carbohydrate-rich products available on the Polish market. *Rocz Panstw Zakl Hig*, 69:127-137.
56. Sprague, M. A. & Colvin, M. E. (2011): A mixture-enthalpy fixed-grid model for temperature evolution and heterocyclic-amine formation in a frying beef patty. *Food Research International*, 44(3), 789–797.
57. Sadowska-Rociek, A., Surma, M., Cieslik, E. (2018): Analysis of acrylamide, 3-monochloropropane-1,2-diol, its esters and glycidyl esters. *Rocz Panstw Zakl Hig*, 69(2):127-137.

58. Shimizu, M., Weitkamp, P., Vosmann, K., Matthaus, B. (2013): Influence of chloride and glycidyl-ester on the generation of 3-MCPD- and glycidyl-esters. *Eur J Lipid Sci Technol* 115:735–9.
59. Škaljac, S., Petroić, Lj., Jokanović, M., Tomović, V., Tasić, T., Ivić, M., Šojić, B., Ikonić, P. and Džinić, N. (2017): The influence of smoking in traditional conditions on content of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Petrovska klobása*, 59th International Meat Industry Conference MEATCON. IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science 85, 1-5.
60. Turesky, R.J. (2008): Heterocyclic aromatic amines: Process-Induced Food Toxicants: Occurrence, Formation, Mitigation, and Health Risks. (Stadler, R.H., Lineback, D.R., ured.), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, str.75-117.
61. Qajarbeygi, P., Ahmadi, M., Hoseini, A.H., Poorasal, AG., Mahmoudi, R., Ataee, M. (2015): Evaluation of N-Nitrosamine Formation in Routine Potato Cooking, *Biotech Health Sci.* 2 (3) 29-33.
62. Vasić-Rački, Đ., Galić, K., Delaš, F., Klapac, T., Kipčić, D., Katalenić, M., Dimitrov, N., Šarkanj, B. (2010): Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani, *Hrvatska agencija za hranu (HAH), Osijek*.
63. Vleeschouwer, K., Van der, PI., Van, LA., Hendrickx, ME. (2007) Kinetics of Acrylamide formation/elimination reactions as affected by water activity. *Biotechnology. Progr.* 23: 722-728.
64. Zhu, F., Cai, YZ., Ke, J., Corke, H. (2010): Compositions of phenolic compounds, amino acids and reducing sugars in commercial potato varieties and their effects on acrylamide formation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90: 2254-2262.
65. Zhu, Z., Xu, Y., Huang, T., Yu, Y., Bassey, A.P., Huang, M. (2022) The contamination, formation, determination and control of polycyclic aromatic hydrocarbons in meat products. *Food Control*, 141, 109194.
66. Wang, L., Ying, Y., Zhengyan, H., Tianjiao, W., Xianghong, S., Pinggu, W. (2016): Simultaneous determination of 2- and 3-MCPD esters in infant formula milk powder by solid-phase extraction and GC-MS analysis. *J AOAC Int.*, 99:786-791.
67. Xiaomei, H., Baichenyang, L., Xiaoyan, Y., Yuan, Z., Changmo, L., Lu, D., Yan, Z. (2022). Inhibiting Effects of Ginger and Rosemary on the Formation of

Heterocyclic Amines, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, and Trans Fatty Acids in Fried Pork Balls *Food* 11, 3767.