



Co-funded by
the European Union

Project no. 2023-1-RO01-KA220-HED-000164767



EXPERIMENTAL METHODS - GUIDE



Partnership for innovation on the exchange of best practices and the design of joint collaborative initiatives at European level related to the awareness of the effects of contamination on human health.

Erasmus+ Project – Partnership for Cooperation
Eds. Pinzaru Iulia Andreea, Dehelean Cristina Adriana

INNO-SAFE-LIFE





**Co-funded by
the European Union**





EKSPERIMENTALNE METODE – VODIČ

Naziv projekta: Partnerstvo za inovacije u razmjeni najboljih praksi i osmišljavanju zajedničkih inicijativa na europskoj razini vezanih uz osvježavanje o učincima kontaminacije na ljudsko zdravlje

Kratika projekta: INNO-SAFE-LIFE

Broj projekta: 2023-1-RO01-KA220-HED-000164767

Ovaj vodič objedinjuje moderne eksperimentalne metode i protokole usmjerene na zaštitu tla, procjenu otpornosti na onečišćujuće tvari i antimikrobne lijekove te održivo korištenje prirodnih resursa. Naglašava pristupe koji osiguravaju sigurnost hrane, sigurnost okoliša i očuvanje bioaktivnih spojeva u prirodnim proizvodima.

Vodič integrira tehnike iz znanosti o tlu, mikrobiologije, kemije i biotehnologije, ističući inovativne i reproducibilne protokole primjenjive u istraživanju i praksi. Kombinirajući teorijsku pozadinu s praktičnom metodologijom, nudi vrijedan resurs za unapređenje sigurne i učinkovite upotrebe biljnih resursa i prirodnih proizvoda, uz istovremeno podržavanje ciljeva održivog razvoja.

Profesori odgovorni za teorijski dio:

Koordinator (UMFVBT): Iulia Andreea Pinzaru , Cristina Adriana Dehelean , Diana Simona Tchiakpe-Antal , Codruta Marinela Šoica

Partner 1 (UNICAL): Filomena Conforti , Giancarlo Statti , Mary Fucile

Partner 2 (UNIOS): Vrandečić Karolina, Ćosić Jasenka , Renata Baličević , Brigita Popovic

Partner 3 (SUA): Miroslava Kačaniová , Natalija Cmikova

Partner 4 (UMFCDB) : Andreea Arsene, Bruno Velescu, Denis Udeana

Partner 5 (FAVISAN) : Virginia Faur, Mirabela Faur Timofti, Anca Gidofalvi

Profesori odgovorni za praktični dio :

Koordinatorica (UMFVBT): Oana Andrade Iftode , Daliana Ionela Minda , George Andrei Draghici , Stefania Dinu, Camelia Alexandrina Szuhaneck

Partner 1 (UNICAL): Filomena Conforti , Giancarlo Statti , Mary Fucile

Partner 2 (UNIOS): Vrandečić Karolina, Ćosić Jasenka , Renata Baličević , Brigita Popovic

Partner 3 (SUA): Miroslava Kačaniová , Natalija Cmikova

Partner 4 (UMFCDB) : Andreea Arsene, Bruno Velescu, Denis Udeana



SADRŽAJ

Poglavlje 1. Zaštita tla koja imaju bitnu ulogu u proizvodnji hrane, lijekova i dodataka prehrani radi kontrole sigurnosti hrane	4
1.1 Uvod	
1.2 Identifikacija fitopatogenih gljiva koje se prenose tlom	
1.3 Utjecaj pesticida na okoliš	
1.4 Fitoremedijacija teških metala u tlu	
1.5 Reference	
Poglavlje 2. Analiza onečišćujućih tvari, antimikrobna otpornost	37
2.1 Uvod	
2.2 Laboratorijske metodologije za testiranje bakterijske osjetljivosti na antimikrobne lijekove	
2.3 Literatura	
Poglavlje 3. Dobivanje prirodnih proizvoda s naglaskom na očuvanje aktivnih sastojaka	71
3.1 Uvod	
3.2 Fitokompleks – sinergijski sklopovi bioaktivnih sastojaka	
3.3 Smjernice WHO-a za kvalitetne standardizirane biljne formulacije	
3.4 Dodaci prehrani	
3.5 Literatura	
Poglavlje 4. Kapitalizacija biljnih resursa za sigurnu i učinkovitu potrošnju	87
4.1 Uvod	
4.2 Odabir i karakterizacija biljnih resursa	
4.3 Ekstrakcija i očuvanje bioaktivnih spojeva	
4.4 Obrada za sigurnu konzumaciju	
4.5 Analitički pristupi za sigurnost i učinkovitost	
4.6 Održivi i inovativni pristupi	
4.7 Literatura	



Poglavlje 1. Zaštita tla koja imaju bitnu ulogu u proizvodnji hrane, lijekova i dodataka prehrani radi kontrole sigurnosti hrane

1.1 Uvod

Tlo predstavlja neobnovljivi resurs od temeljne važnosti za kopnene ekosustave, ljudsko zdravlje i gospodarski razvoj. Ono pruža fizičku i kemijsku osnovu za rast biljaka, regulira biogeokemijske cikluse i funkcionira kao rezervoar bioraznolikosti. Zdrava tla osiguravaju održivu proizvodnju prehrambenih usjeva i ljekovitog bilja te su stoga izravno povezana sa sigurnošću hrane i dostupnošću sirovina koje se koriste u farmaceutskoj i nutraceutskoj industriji (Marcelino 2023). Progresivna degradacija tla smatra se jednim od najhitnijih globalnih izazova, s implikacijama za poljoprivrednu produktivnost, kvalitetu okoliša i javno zdravlje.

Tijekom posljednjih desetljeća, degradacija tla ubrzana je intenzivnim poljoprivrednim praksama, prekomjernom upotrebom pesticida i kemijskih gnojiva, industrijskim onečišćenjem i posljedicama klimatskih promjena (Tudi 2021.). Takvi pritisci doveli su do erozije, zaslanjivanja, zbijanja i kontaminacije opasnim tvarima, uključujući postojeće organske onečišćujuće tvari i teške metale. Kao rezultat toga, tla sve više ne ispunjavaju svoje ekosustavne usluge, što ugrožava i prinose usjeva i sigurnost biljnih proizvoda namijenjenih ljudskoj prehrani (AbdelRahman 2023.). Zaštita kvalitete tla stoga je postala temelj strategija usmjerenih na osiguranje globalne sigurnosti hrane i održivog korištenja resursa.

Među mnogim rizicima za zdravlje tla, fitopatogene gljive koje se prenose tlom predstavljaju glavno biološko ograničenje poljoprivrednim sustavima. Ovi patogeni uzrokuju ozbiljne gubitke prinosa kod osnovnih i ljekovitih kultura, smanjujući ne samo količinu već i kvalitetu i sigurnost biljnih proizvoda. Razvoj pouzdanih eksperimentalnih metoda za njihovo otkrivanje i karakterizaciju ključan je za ranu dijagnozu, ciljano upravljanje i sprječavanje velikih epidemija.

Kemijski unosi, posebno pesticidi, i dalje igraju važnu ulogu u zaštiti usjeva; međutim, njihov dugoročni utjecaj na okoliš ne može se zanemariti. Pokazalo se da ponovljena primjena utječe na organizme koji nisu ciljna skupina, narušava mikrobnu raznolikost tla i dovodi do nakupljanja ostataka u tlu i hranidbenim lancima (Alengebawy 2021). Uravnoteženje koristi od upotrebe pesticida s potrebom zaštite zdravlja tla zahtijeva rigorozno praćenje, procjenu rizika i provedbu sigurnijih alternativa.

Uz biološke i kemijske prijetnje, onečišćenje teškim metalima sve je veća briga u poljoprivrednim tlima diljem svijeta. Izvori poput rudarskih aktivnosti, industrijskih otpadnih



voda i prekomjerne upotrebe fosfatnih gnojiva doprinose povišenim koncentracijama otrovnih metala, uključujući kadmij, olovo i arsen (Jaishankar 2014). Ovi elementi nisu biorazgradivi i imaju tendenciju akumuliranja u tlu, što predstavlja dugoročne rizike za sigurnost usjeva i ljudsko zdravlje. U tom kontekstu, fitoremedijacija se pojavila kao inovativan, isplativ i ekološki prihvatljiv pristup. Korištenjem biljaka za ekstrakciju, stabilizaciju ili detoksikaciju onečišćujućih tvari, fitoremedijacija nudi obećavajuću alternativu konvencionalnim tehnologijama remedijacije (Sharma 2023).

Ovo poglavlje predstavlja eksperimentalne metode osmišljene za rješavanje triju ključnih dimenzija zaštite tla: (i) identifikaciju fitopatogenih gljiva koje se prenose tlu, (ii) procjenu utjecaja pesticida na zdravlje tla i okoliša te (iii) primjenu tehnika fitoremedijacije za uklanjanje teških metala. Zajedno, ovi pristupi naglašavaju bitnu ulogu tla u održavanju održive poljoprivrede i ističu važnost integriranja modernih znanstvenih tehnika u strategije za sigurnost hrane, zaštitu okoliša i sigurno korištenje prirodnih resursa.

1.2 Identifikacija fitopatogenih gljiva koje se prenose tlom

Patogeni koji se prenose tlom predstavljaju jednu od najdugovječnijih i najdestruktivnijih prijetnji poljoprivrednim sustavima diljem svijeta. Bolesti uzrokovane ovim organizmima odgovorne su za velike gubitke usjeva kod širokog raspona biljnih vrsta, utječući i na prinos i na kvalitetu (Katan, 2017.). Karakteristična značajka patogena koji se prenose tlom je njihova sposobnost da opstanu u tlu dulje vrijeme, često u odsutnosti biljke domaćina. Ova strategija preživljavanja posredovana je proizvodnjom specijaliziranih otpornih struktura, poput spora, cista, klamidospora, oospora, mikrosklerocija i sklerocija, koje im omogućuju da izdrže nepovoljne uvjete okoliša (Alegbeleye i sur., 2018.; Jurković i sur., 2017.). Neke od ovih propagula sposobne su ostati održive više od desetljeća, čime održavaju kontinuirani izvor inokuluma koji predstavlja izazov za učinkovito upravljanje bolestima.

Klijanje ovih struktura u stanju mirovanja često je potaknuto kemijskim signalima koji se oslobađaju u rizosferi, uključujući korijenske eksudate osjetljivih biljaka ili dostupnost specifičnih hranjivih tvari. Nakon klijanja, patogeni inficiraju korijenje biljaka i započinju kolonizaciju, što često rezultira kroničnim infekcijama koje ugrožavaju vitalnost i produktivnost biljaka. Budući da je bolesti koje se prenose tlom teško iskorijeniti nakon što se uspostave, njihovo upravljanje uvelike ovisi o točnoj identifikaciji, ranom otkrivanju i preventivnim mjerama.

Bolesti koje se prenose tlom mogu se manifestirati u nekoliko glavnih sindroma, posebno sušenjem korijena, truleži korijena i vaskularnom uvenuću, od kojih je svaki povezan s karakterističnim skupom patogena i simptomatologije.



1.2.1 Venuće prije i poslije nicanja

Venuće je jedna od najraširenijih i ekonomski najvažnijih bolesti uzrokovanih gljivicama koje se prenose tlom, a posebno pogađa mlade sadnice. Glavni uzročnici uključuju *Fusarium* spp., *Pythium* spp. i *Rhizoctonia* spp.

Do venuća prije nicanja dolazi kada se sjeme ili sadnice propadnu prije nego što izniknu iznad površine tla. Obično je povezano s nepovoljnim uvjetima za klijanje, kao što su pretjerano hladna, tla prezasićena vodom, loša drenaža, zbijenost tla ili prisutnost nerazgrađene organske tvari. U tim uvjetima, gljivične propagule koloniziraju sjeme, što dovodi do truljenja, propadanja i na kraju do ne nicanja sadnica.

Venuće nakon nicanja razvija se nakon što sadnice izniknu, obično na ili odmah ispod linije tla. Simptomi uključuju truljenje korijena, vodrnasta i trula tkiva te promjenu boje od smeđe-sive do zeleno-sive. U uznapredovalim slučajevima, na korijenu i donjem dijelu stabljika mogu se pojaviti manje lezije, često tamnosmeđe, crvenkastosmeđe ili crne, sa suhim i uvučenim rubovima. Kod težih infekcija lezije okružuju stabljiku, ometajući transport vode, što rezultira venućem, kolapsom i na kraju propadanjem sadnice.

1.2.2 Truljenje korijena

Simptome truleži korijena obično uzrokuju patogeni poput *Phytophthora* spp. i *Chalara elegans*. Za razliku od venuća, koje je uglavnom ograničeno na rani razvoj biljaka, patogeni truleži korijena mogu napasti biljke u kasnijim fazama, ugrožavajući ukupnu produktivnost. Ove gljive napadaju kortikalna i provodna tkiva korijena, otežavajući transport vode i hranjivih tvari.

Nadzemni simptomi obično uključuju zaostajanje u porastu, klorozu, prerano opadanje lišća, venuće (često počevši od vršnog tkiva), odumiranje grančica i iznenadnu smrt biljke. Budući da su ovi simptomi nespecifični, laboratorijska potvrda uzročnog patogena ključna je za točnu dijagnozu. Truljenje korijena može biti tijekom cijele vegetacije zbog sposobnosti patogena da preživi u biljnim ostacima ili u otpornim propagulama u tlu.

1.2.3 Traheomikoze

Traheomikoze predstavljaju još jedan oblik bolesti koje se prenose tlom. Uzrokuju ih gljive i bakterije koje koloniziraju provodni sustav biljke, ometajući transport vode i hranjivih tvari. Najpoznatiji gljivični patogeni u ovoj skupini uključuju *Verticillium* spp. i *Fusarium* spp.

Simptomi su često sistemski i uključuju progresivno venuće, žutilo lišća i nekrozu, često popraćeno promjenom boje provodnog sustava u stabljikama, deblima ili granama. Zaražena



tkiva mogu pokazivati tamnu boju kada se uzdužno prerežu, što služi kao ključna dijagnostička značajka.

Među gljivama koje uzrokuju venuće, *Verticillium alboatrum* (Reinke & Berthold) i *Verticillium dahliae* (Klebahn) su od posebnog značaja, utječući na širok raspon hortikulturnih i poljskih usjeva. Njihova sposobnost da opstanu u tlu putem mikrosklerocija dugi niz godina čini ih posebno izazovnim za suzbijanje.

1.2.4 Implikacije za sigurnost hrane

Bolesti uzrokovane patogenima koji se prenose tlom uzrokuju velike gubitke mnogih usjeva (Katan 2017.). Patogeni koji se prenose tlom mogu dugo preživjeti u tlu, preživljavajući u obliku spora, cista ili drugih otpornih struktura (Alegbeleye et al., 2018.). Većina gljivičnih patogena producira prilično otporne trajne spore, koje im omogućuju dulje preživljavanje u tlu (hlamidospore, oospore, mikrosklerocije ili sklerocije) (Jurković i sur., 2017). Često strukture u mirovanju mogu preživjeti u tlu i više od 10 godina. U prisustvu eksudata korijena osjetljivog domaćina u rizosferi ili odgovarajućeg izvora hranjivih tvari, oni klijaju i zaraze biljku, čekajući odgovarajuće uvjete. Patogeni iz tla mogu zaraziti biljku, izazvati bolest i smanjiti prinose usjeva.

Bolesti koje izazivaju zemljišni paraziti uključuju:

- palež i propadanje klijanaca prije i nakon nicanja (*Fusarium*, *Pythium* i *Rhizoctonia* vrste)
- trulež korijena (*Phytophthora* vrste, *Chalara elegans*)
- venuće (*Verticillium* i *Fusarium* vrste)

Palež i propadanje klijanaca prije nicanja uključuje propadanje sjemena i truljenje klijanaca u tlu prije nego se pojave iznad površine tla. To se događa kada su uvjeti za klijanje sjemena loši, kao što je hladno, vruće ili vrlo vlažno tlo, tlo sa slabom drenažom, zbijeno tlo ili u prisutnosti neraspadnute organske tvari.

Uobičajeni simptomi paleži i propadanja klijanaca nakon nicanja uključuju propadanje korijena i truljenje donjeg dijela stabljike, obično na ili ispod razine tla. Zahvaćena tkiva mogu imati vodenast izgled, mogu biti razmekšana i smeđe-sivu ili zeleno-sivu boju. U nekim slučajevima, lezije na korijenju i prizemnim dijelovima stabljika mogu biti tamnosmeđe, crvenkastosmeđe ili crne diskretne, suhe i udubljene. Za povoljnih uvjeta lezije mogu prstenasto obuhvatiti stabljike mladih biljaka što dovodi do venuća praćenog propadanjem i smrću biljaka.



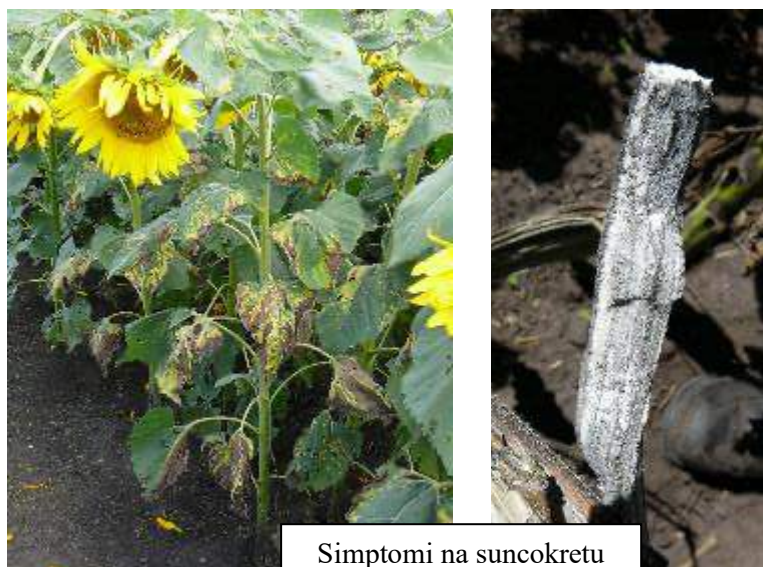
Uzročnici truleži korijena mogu zahvatiti biljke i nakon nicanja kada gljive napadnu unutarnje tkivo korijena, ometajući opskrbu vodom i hranjivim tvarima. Nadzemni simptomi uključuju gubitak turgora, žućenje lišća, venućem koje počinje na vrhu biljke, odumiranje grančica i iznenadnu smrt.

Vaskularno venuće uzrokuju različite gljivice i bakterije koje napadaju provodna tkiva. Glavni simptom bolesti je venuće biljke i promjena boje provodnog sustava na stabljici ili deblu i granama.

Verticilijsko venuće

Verticillium alboatrum Reinke & Berthold

Verticillium dahliae Klebahn



Simptomi na suncokretu



Co-funded by
the European Union



Micelij: hijalin, septiran

Konidiofori: obično dobro diferencirani i uspravni, okomito razgranati većim dijelom svoje duljine

Konidije: hijaline ili jarko obojene, jajolike ili eliptične i obično jednostanične, nastaju na fialidama - specijaliziranim hifama koje se stvaraju kružno oko svakog konidiofora

Teleomorf: nije poznat

Strukture za preživljavanje nepovoljnih uvjeta:

Verticillium alboatrum – trajni micelij u biljnim ostacima ili u tlu

Verticillium dahliae – male, crne mikrosklerocije tanke ovojnice u biljnim ostacima ili u tlu



Konidiofori

Fuzarijsko venuće

Fusarium oxysporum Schl.



Simptomi na rajčici



Micelij: zračni micelij je bijel, postaje ljubičast, s diskretnim narančastim sporodohijama prisutnim u nekim izolatima; podlogu je tamnoplave ili tamnoljubičaste boje

Konidiofori: kratki, jednostavni, lateralne monofijalide u zračnom miceliju, kasnije raspoređeni u gusto razgranate grozdove

Konidije: makrokonidije su srpastog oblika, blago zakrivljene s naglašenim vršnom stanicom, uglavnom s tri septe, bazalna stanica u obliku stopice. Mikrokonidije su brojne, nikada ne nastaju u nizovima, uglavnom jednostanične, eliptične do cilindrične, ravne ili blago zakrivljene.

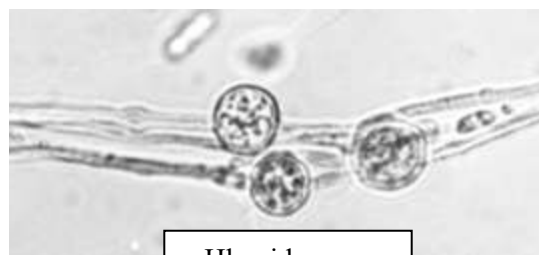
Teleomorf: nije poznat

Strukture za preživljavanje nepovoljnih uvjeta:

Hlamidospore koje nastaju terminalno ili interkalarno, hijaline, glatke ili hrapave ovojnice.



Mikrokonidije



Hlamidospore



Trulež korijena uzrokovanog gljivom *Sclerotinia sclerotiorum*

Sclerotinia sclerotiorum Lib. de Bary



Simptomi na gerberu i mrkvi

Micelij: bijel, poput vate

Nespolne spore: ne stvara

Teleomorf: nije poznat

Strukture za preživljavanje nepovoljnih uvjeta:

Sklerocije koje nastaju u ili na zaraženim biljnim tkivima, kliju u micelij ili karpogeno u apotecije s askusima i askosporama



S. sclerotiorum na PDA



Karpogeno klijanje sklerocija



Askusi s askosporama



Crna trulež korijena

Chalara elegans Nag. & Kendr.



Simptomi na mrkvi
(www.discoverlife.org)



Simptomi na Kalanchoe sp.
(www.plantesygdomme.dk)

Micelij: bijel, kasnije postaje siv, dobro razvijen, razgranat, gladak, septiran, hialin

Spore:

Fialokonidije (endokonidije, mikrokonidije) – jednostanične i hijaline s tankom opnom, nalaze se unutar višestaničnih, jednostavnih i hijalinih konidiofora.

Aleuriokonidije (hlamidospore) - jednostanične sa zadebljanom, smeđom i glatkom opnom;



Mikrokonidije i hlamospore



Co-funded by
the European Union



pojavljaju se u nizovima, u početku izgledaju kao višestanične konidije, ali kako sazrijevaju postaju crne i odvojene

Teleomorf: nije poznat

Strukture za preživljavanje nepovoljnih uvjeta:

hlamidospore

Palež i propadanje klijanaca

Pythium vrste



Izolacija Pythium sp. s klijanaca salate



Izolacija Pythium sp. s klijanaca cvjetače

Micelij: hijalin, bezbojan ili blijedožućkast i jednostaničan; septe se mogu naći samo u starim hifama ili tijekom formiranja reproduktivnih organa.

Spore:

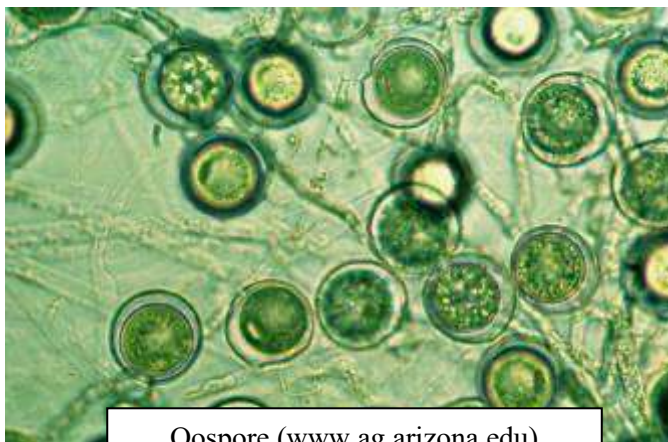
Zoosporangiji se razvijaju nespolno na nediferenciranim ograncima micelija. Zoospore se diferenciraju u vezikulama koje se stvaraju na zoosporangiju.

Na miceliju nastaju gamete: okrugli oogoniji i bačvasti anteridiji. Oogonij i anteridij mogu pripadati istoj ili različitim hifama. Nakon kopulacije nastaje oospora.

Resting structures: oospores



Co-funded by
the European Union



Oospore (www.ag.arizona.edu)

Palež klijanaca, trulež korijena

Rhizoctonia solani J.G. Kühn



Trulež korijena šećerne repe
uzrokovanoj gljivom *R. solani*



Palež klijanaca uzrokovana gljivom *R. solani*
(www.barenbrug.co.nz)



Co-funded by
the European Union



Micelij: septiran, s više jezgara, u početku bezbojan, kasnije smeđe boje; ogranaci pod kutom od 90 stupnjeva;

suženja na dnu grananja hifa

Spore: *R. solani* ne producira nikakve spore osim u stadiju teleomorfa (*Thanatephorus cucumeris*)

Teleomorf: *Thanatephorus cucumeris* (višestanični micelij s jednostaničnim bazidima i hijalnim, jednostaničnim, ovalnim, na jednom kraju malo spljoštenim bazidiospore

Strukture za preživljavanje nepovoljnih uvjeta: sklerocije



Ogranci micelija pod kutom 90° („T“ stanice)

Palež klijanaca, trulež korijena, krune korijena i stabljike

Phytophthora species



Trulež korijena soje
([www. u.osu.edu](http://www.u.osu.edu))



Trulež korijena jagode
(*Phytophthora* sp.)



Micelij: dobro razvijen, širok i neseptiran,
stanične stijenke sadrže celulozu

Spore: sporangije (nespolne spore) su hijaline
i u obliku limuna; ako su u vodi ili jevlaga zraka
vrlo visoka dolazi do formiranja mnogobrojnih zoospora



Sporangij

Strukture za preživljavanje nepovoljnih uvjeta:
oospore (tankih stjenki i najčešće okruglog oblika)

Suha ili ugljenasta trulež

Macrophomina phaseolina (Tassi) Goid.



Suha trulež peršina i mrkve



1.3 Utjecaj pesticida na okoliš

Jedan je od najvećih globalnih problema današnjice je onečišćenje okoliša. Glavni uzroci onečišćenja su otpadne vode naselja, industrije, ispiranje poljoprivrednih površina i prometnica, deponiji otpada, kisele kiše te izvanredna onečišćenja uzrokovana različitim havarijama. Stoga su vode i tlo postali velika odlagališta teških metala, toksina, organskih spojeva, nitrata, fosfata te drugih vrlo opasnih tvari (Đokić i sur. 2012.). Nakon primjene navedene štetne tvari mogu duže vrijeme zaostati u tlu i sedimentima te dospjeti izravno u prehrambeni lanac. Također mogu dospjeti u vodene tokove i podzemne vode te na kraju i u pitku vodu gdje mogu uzrokovati velike zdravstvene smetnje u ljudi, odnosno životinja. Zbog toga se danas poduzima niz mjera i postupaka kojima se okoliš nastoji zaštititi od daljnjeg onečišćenja posebice postojanim organskim tvarima kao što su pesticidi.

Još od davnina ljudi su za zaštitu svojih usjeva upotrebljavali pesticide. Nakon 1940. godine počinje masovna proizvodnja sintetičkih pesticida i njihova upotreba postaje jako raširena. Broj aktivnih tvari s pesticidnim učinkom se povećavao u skladu sa pojavom štetnih organizama u proizvodnji.

Primjena pesticida u kontroli velikog broja štetnih organizama u poljoprivrednoj proizvodnji raširena je u cijelom svijetu. Pesticidi (slika 1.) se razlikuju prema cilju, tj. prema organizmu na koji djeluju.



Slika 1.1 Pesticidi

Klasifikacija pesticida



Podjela pesticida:

Postoji više načina podjele pesticida. Najčešće se primjenjuje podjela s obzirom na ciljanu skupinu organizama kao djelovanja pojedinog pesticida (Fenda, 2022.). Na taj način, prema namjeni pesticidi su razvrstani unutar 11 skupina:

1. akaricidi: suzbijaju grinje,
2. algicidi: suzbijaju rast algi,
3. avicidi (korvifugi): odbijaju ptice od usjeva,
4. baktericidi: suzbijaju rast bakterija,
5. fungicidi: suzbijaju rast gljiva,
6. herbicidi: suzbijaju rast korova,
7. insekticidi: suzbijaju štetne kukce,
8. limacidi (moluscidi): suzbijaju puževe,
9. nematocidi: suzbijaju nematode,
10. rodenticidi: suzbijaju glodavce,
11. virucidi: sprječavaju virozu.

Pesticidi se definiraju kao tvar ili mješavina tvari koje se primjenjuju (slika 2.) za suzbijanje ili ublažavanje djelovanja štetnih organizama u okolišu.



Slika 1.2 Primjena zoocida

Zoocidi obuhvaćaju veliku i raznoliku skupinu SZB-ova posebno razvijenih za suzbijanje štetnih organizama životinjskog podrijetla. Podijeljeni su na sljedeći način:



- Insekticidi – suzbijaju insekte, koji su među najštetnijim poljoprivrednim štetnicima u svijetu. Njihovi učinci kreću se od izravne štete uzrokovane hranjenjem do vektorskog prenošenja biljnih patogena.
- Akaricidi – suzbijaju grinje koje uzrokuju značajne gubitke prinosa u mnogim hortikulturnim kulturama.
- Nematicidi – suzbijaju biljne parazitske nematode, mikroskopske crve koji napadaju korijenje i smanjuju unos hranjivih tvari.
- Limacidi (moluscicidi) – suzbijaju puževe i puževe koji oštećuju lišće, stabljike i plodove.
- Rodenticidi – suzbijaju glodavce poput miševa i štakora, koji oštećuju uskladištenu hranu, sjeme i usjeve na polju.
- Sredstva za odbijanje ptica – odvrćaju ptice od hranjenja usjevima, posebno žitaricama i voćem.

Grupiranje zoocida ističe široku raznolikost ciljnih organizama u poljoprivredi i naglašava ovisnost modernih poljoprivrednih sustava o kemijskim sredstvima za suzbijanje štetočina.

Fungicidi i herbicidi

Uz zoocide, u poljoprivredi su ključne još dvije kategorije pesticida:

Fungicidi, koji suzbijaju patogene gljivice i pseudogljivice, a u nekim slučajevima i bakterije odgovorne za biljne bolesti. Njihova primjena sprječava gubitke usjeva zbog truljenja korijena, plijesni, paleži i venuća.

Herbicidi (slika 3), koji su namijenjeni suzbijanju korova. Smanjenjem konkurencije korova za hranjive tvari, svjetlost i vodu, herbicidi igraju ključnu ulogu u povećanju prinosa i učinkovitosti usjeva.



Slika 1.3 Zakorovljenost suncokreta

4. Ostala SZB - regulatori rasta biljaka i pomoćna sredstva



Iako su pesticidi vrlo učinkoviti, njihovi dugoročni učinci na okoliš su duboki. Organoklorni i organofosforni pesticidi poznati su po svojoj lipofilnosti, kemijskoj stabilnosti i perzistentnosti, što im omogućuje akumuliranje u tlu, vodenim tijelima i živim organizmima. Bioakumuliraju se u masnim tkivima, žumanjcima i jetri životinja te u biljnim uljima, te tako ulaze i šire se kroz hranidbeni lanac (Frazar , 2000.). Zbog svoje široke upotrebe, često uz loše prakse primjene, ovi spojevi onečišćuju tlo, vodu i zrak, predstavljajući rizik za usjeve, stoku, divlje životinje i ljudsko zdravlje.

Kao odgovor na to, vlade su uvele regulatorne okvire za kontrolu proizvodnje, distribucije i primjene pesticida. U Europskoj uniji, Direktiva 2009/128/EZ pruža pravni okvir za održivu upotrebu pesticida, s naglaskom na integrirano suzbijanje štetočina (IPM), smanjenu kemijsku ovisnost i promicanje sigurnijih alternativa (slika 4).



Slika 1.4 Primjena sredstava za zaštitu bilja u voćnjaku

Čimbenici koji utječu na bioremedijaciju pesticidima

Učinkovitost bioremedijacije pesticidima ovisi o složenoj interakciji bioloških, kemijskih i okolišnih čimbenika koji određuju mogu li mikroorganizmi metabolizirati i mineralizirati onečišćujuću tvar.

Primarno ograničenje je odsutnost odgovarajućih mikroorganizama na kontaminiranim mjestima. Mnogi pesticidi, posebno sintetski spojevi, imaju molekularne strukture koje su strane prirodnim ekosustavima. Ovi takozvani ksenobiotički spojevi često nemaju prirodne analoge, što znači da se mikrobní enzimski sustavi nisu razvili da bi ih učinkovito prepoznali ili

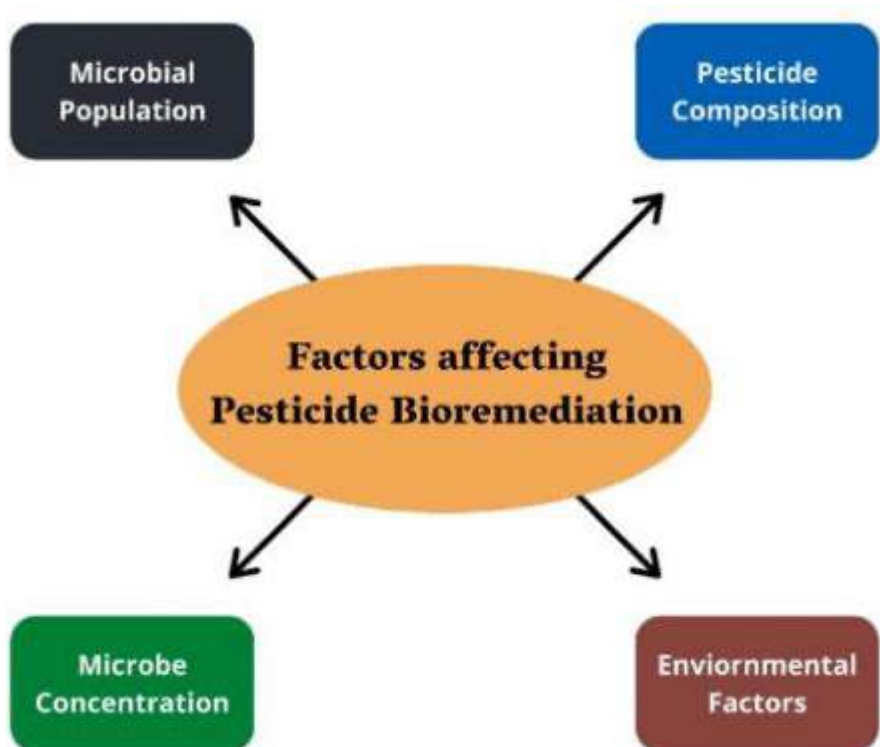


razgradili (Đokić i sur., 2012.). Čak i kada su prisutni mikroorganizmi sposobni za djelomičnu razgradnju, putovi razgradnje mogu biti nepotpuni, što rezultira nakupljanjem toksičnih ili otpornih međuprodukata.

Drugi faktor je bioraspoloživost, tj. dostupnost molekula pesticida mikrobnim stanicama. Hidrofobni pesticidi, poput organoklornih spojeva, često se snažno vežu za organsku tvar u tlu ili čestice gline, smanjujući njihovu topljivost u otopini tla. Ova adsorpcija sprječava transport kroz mikrobne membrane, učinkovito smanjujući potencijal biorazgradnje. Osim toga, molekularna veličina i struktura pesticida mogu utjecati na to hoće li ih enzimi moći hidrolizirati ili oksidirati. Neke molekule su toliko strukturno stabilne da se u potpunosti odupiru enzimskom napadu.

Uvjeti okoliša također igraju odlučujuću ulogu. Mikroorganizmima su potrebni kisik, vlaga, hranjive tvari (posebno ugljik, dušik i fosfor) i odgovarajući pH za optimalno funkcioniranje. U mnogim kontaminiranim tlima ovi uvjeti su neoptimalni. Na primjer, vrlo kisela ili slana tla mogu inhibirati mikrobnu aktivnost, dok anaerobni uvjeti ograničavaju aerobne procese razgradnje. Nadalje, niska dostupnost hranjivih tvari stvara scenarij u kojem mikrobi preferiraju metabolizirati prirodne, lako razgradive izvore ugljika umjesto da ciljaju ksenobiotičke pesticide.

Drugi ključni faktor je kometabolizam. Mnogi pesticidi se ne razgrađuju jer ih mikroorganizmi ne mogu koristiti kao jedini izvor ugljika ili energije. Međutim, u prisutnosti drugog, povoljnijeg supstrata, mikrobi mogu kometabolizirati pesticid kao sekundarnu reakciju. Ovo oslanjanje na kosepstrate znači da je učinkovitost razgradnje snažno ovisna o kontekstu, a naponi sanacije mogu zahtijevati dodavanje organskih dodataka kako bi se potaknuo mikrobni metabolizam (slika 5).



Slika 1.5 Čimbenici koji utječu na bioremedijaciju pesticidima

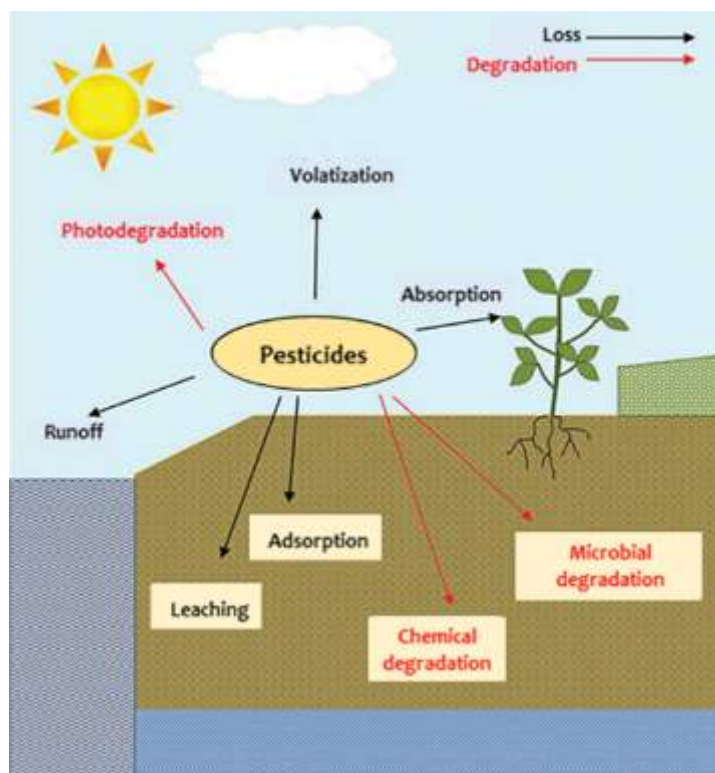
Ukratko, perzistencija pesticida rezultat je kombinacije strukturne otpornosti, ograničene bioraspoloživosti, nepovoljnih uvjeta u tlu i nedovoljne mikrobne prilagodbe. Razumijevanje ovih ograničenja ključno je za osmišljavanje učinkovitih strategija sanacije.

Metode sanacije

Kako bi se prevladala perzistencija pesticida u tlu i sedimentima, razvijeno je nekoliko tehnologija remedijacije. One se mogu grubo kategorizirati kao termalne, kemijske, biološke i metode temeljene na fitoremedijaciji, a svaka ima specifične prednosti i ograničenja.

1. Niskotemperaturna termička desorpcija (LTTD)

LTTD je ex situ fizikalno-kemijska tehnologija koja se široko koristi za uklanjanje poluhlapljivih i hlapljivih organskih spojeva, uključujući pesticide. Kontaminirano tlo ili sediment zagrijava se na 150–540 °C, pri čemu se organski zagađivači isparavaju bez postizanja potpune oksidacije. Ispareni plinovi se potom hvataju nizom procesa, kao što su naknadno izgaranje, kondenzacija ili adsorpcija na filtere s aktivnim ugljenom (slika 1.6).



Slika 1.6 Razgradnja pesticida u poljoprivredi (Baličević i Ravlić , 2014.)

Iako je učinkovit u odvajanju pesticida iz tla, LTTD kemijski ne uništava molekule, što znači da je sekundarna obrada parne faze potrebna kako bi se izbjeglo ponovno oslobađanje onečišćujućih tvari. Potpuno uništenje može se postići propuštanjem plinova kroz komore za izgaranje na visokim temperaturama. Proces je učinkovit, ali ograničen zahtjevom da tla sadrže najmanje 20% čvrste faze i neučinkovit je protiv anorganskih onečišćujućih tvari poput teških metala (Gonçalves i da Silva Delabona , 2022).

2. Spaljivanje

Spaljivanje se smatra jednom od najpouzdanijih metoda za potpuno uništavanje organskih zagađivača. Proces uključuje dvije faze:

Isparavanje na 540–990 °C, tijekom kojeg se organski spojevi oslobađaju u plinovitom obliku.

Visokotemperaturna oksidacija na 870–1200 °C, gdje se ovi spojevi mineraliziraju u CO_2 , H_2O i anorganske ostatke (Singhvi i sur., 1994.).

Dobiveni pepeo, ako je u skladu sa sigurnosnim propisima, može se sigurno zbrinuti. Glavna prednost spaljivanja je nepovratno uklanjanje onečišćujućih tvari. Međutim, metoda je skupa i zahtijeva specijalizirane objekte i prijevoz onečišćenih materijala, što povećava logističke i



sekundarne rizike onečišćenja. Štoviše, proces troši značajne količine energije i može osloboditi sekundarne onečišćujuće tvari poput dioksina ako se ne kontrolira pravilno.

3. Bioremedijacija

Bioremedijacija iskorištava metaboličku aktivnost mikroorganizama za transformaciju ili mineralizaciju pesticida. Predstavlja jeftiniju i ekološki održivu alternativu u usporedbi s fizikalno-kemijskim metodama. Ključni procesi uključuju:

Oksidacija, gdje mikrobni enzimi pretvaraju pesticide u manje štetne proizvode.

Biosinteza, u kojoj mikroorganizmi ugrađuju fragmente dobivene iz pesticida u svoju biomasu.

Autooksidacija, koja uključuje spontane kemijske reakcije katalizirane mikrobnim metabolitima (Raffa i Chiampo , 2021).

Idealno bi bilo da su krajnji produkti CO_2 i H_2O , bez nakupljanja toksičnih međuprodukata.

Strategije bioremedijacije podijeljene su na:

Ex situ tehnike: uključujući bioreaktore, biofiltre i kompostiranje. Kod kompostiranja se kontaminirana tla miješaju s organskom tvari, koja služi i kao izvor hranjivih tvari i kao stimulans za mikrobnu aktivnost (Günther i sur., 2000.).

Tehnike in situ: uključujući bioventilaciju, bioraspršivanje i biostimulaciju , gdje se kisik i hranjive tvari izravno dovode u tlo kako bi se poboljšala aktivnost autohtonih mikrobnih zajednica (Erguven , 2018).

Uspjeh bioremedijacije uvelike ovisi o razumijevanju mikrobne ekologije kontaminiranog mjesta i u mnogim slučajevima može zahtijevati genetski inženjering mikroorganizama ili korištenje mikrobnih konzorcija za proširenje kapaciteta razgradnje.

4. Fitoremedijacija

Fitoremedijacija se često smatra ekološki prihvatljivom „zelenom tehnologijom“, koja se oslanja na biljke i njihovu mikrobiotu rizosfere za razgradnju, stabilizaciju ili ekstrakciju pesticida. Proces se odvija putem nekoliko mehanizama:

Fitoekstrakcija – zagađivače apsorbira korijenje i akumulira u biljnim tkivima.

Rizofiltracija – toksini se adsorbiraju ili apsorbiraju korijenjem iz kontaminirane vode.

Fitodegradacija (fitotransformacija) – enzimska aktivnost unutar biljaka ili s njima povezanih mikroba razgrađuje onečišćujuće tvari na manje štetne produkte.



Fitostabilizacija – zagađivači se imobiliziraju u rizosferi, smanjujući mobilnost i bioraspoloživost.

Biljke djeluju kao katalizatori, stimulirajući mikrobnu aktivnost u rizosferi oslobađanjem korijenskih eksudata. Ova sinergija biljaka i mikroba ubrzava procese razgradnje i poboljšava sposobnost samočišćenja tla. Međutim, fitoremedijacija ima ograničenja: prodiranje korijena obično je ograničeno na gornjih 30-45 cm tla, a brzine remedijacije su sporije u usporedbi s fizikalno-kemijskim metodama.

Vrste kao što su *Kochia* sp. (*Bassia scoparia* (L.) AJ Scott) su posebno učinkovite zbog svog dubokog korijenja i sposobnosti pojačavanja mikrobne aktivnosti. Studije su pokazale da biljke s opsežnim korijenovim sustavom postižu veću apsorpciju i transformaciju pesticida, često smanjujući koncentracije bioraspoloživih pesticida na razine kompatibilne s ekološkim oporavkom (Đokić i sur., 2012.).

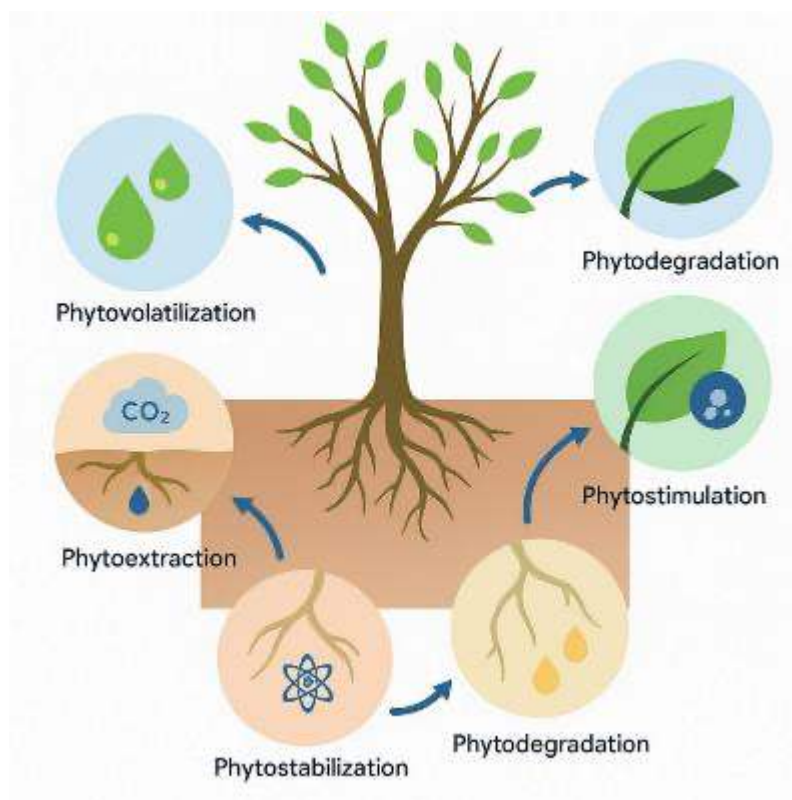
Iako nije samostalno rješenje za sve onečišćujuće tvari, fitoremedijacija je vrlo vrijedna u integriranim okvirima remedijacije, gdje nadopunjuje mikrobne, termičke i kemijske metode.

1.4 Fitoremedijacija teških metala u tlu

Definicija

Fitoremedijacija se odnosi na korištenje viših biljaka, algi i gljiva za smanjenje, imobilizaciju ili transformaciju onečišćujućih tvari prisutnih u tlu, vodi ili zraku. Svojom metaboličkom aktivnošću i interakcijom s povezanim mikroorganizmima, ovi organizmi apsorbiraju, razgrađuju ili pretvaraju onečišćujuće tvari, čime doprinose obnovi ekosustava i poboljšanju kvalitete okoliša.

Pojam fitoremedijacija potječe od grčke riječi phyto (biljka) i latinske remedium (liječiti ili rehabilitirati), što odražava njezinu ulogu kao biološke strategije obrade onečišćenih okoliša (Prasad, 2003.). U praksi, fitoremedijacija obuhvaća skup postupaka u kojima korijenje biljaka, enzimi i mikroorganizmi rizosfere surađuju kako bi izolirali, transportirali, detoksicirali ili mineralizirali onečišćujuće tvari u tlu.



Slika 1.7 Procesi fitoremedijacije

Mehanizmi tolerancije biljaka

Biljke koje uspijevaju u onečišćenim tlima razvile su višestruke adaptivne mehanizme koji im omogućuju toleriranje povišenih koncentracija teških metala. Ti mehanizmi uključuju:

- sekvestracija metala u vakuolama,
- vezanje na komponente stanične stijenke,
- kelacija fitokelatinima i metalotioneinima i
- aktivacija antioksidativne obrane koja ublažava oksidativni stres.

Takve prilagodbe čine osnovu njihove primjene u sanaciji, omogućujući im preživljavanje i rast u jako onečišćenim okruženjima gdje većina drugih vrsta ne može preživjeti..

Metode sanacije tla

Sanacija tla onečišćenog teškim metalima može se provesti fizikalnim, kemijskim ili biološkim metodama:

Fizičke metode: pranje tla, ispiranje tla, iskopavanje.

Kemijske metode: kemijska stabilizacija, imobilizacija, oksidacija-redukcija.

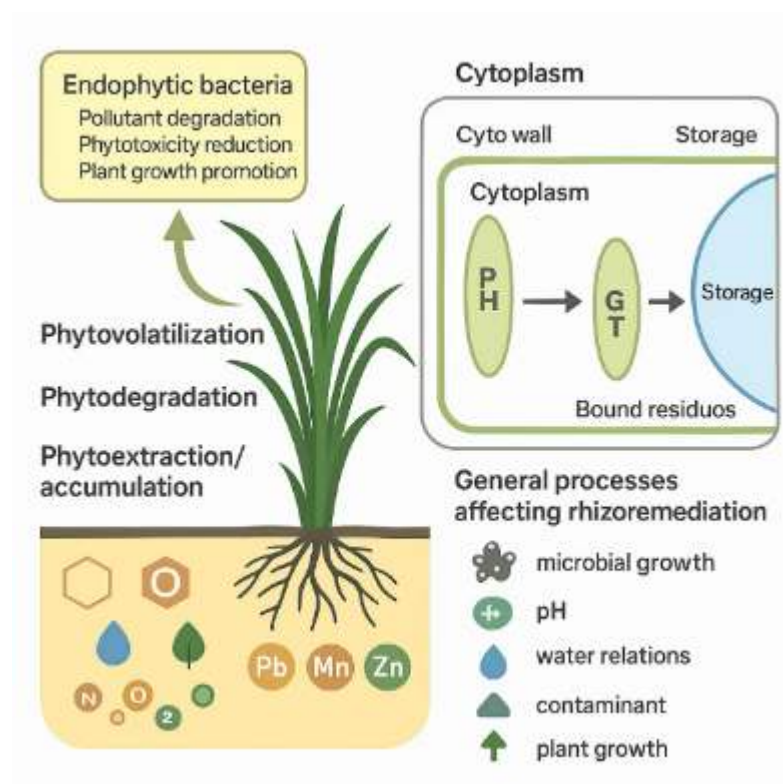
Biološke metode: bioremedijacija, fitoremedijacija, mikrobnu potpomognuta remedijacija.

Unutar bioloških strategija, fitoremedijacija se pojavila kao posebno atraktivan pristup zbog svoje isplativosti, održivosti i sposobnosti poboljšanja strukture tla uz istovremeno smanjenje onečišćenja (Tangahu i sur., 2011.).

Osnovni mehanizmi fitoremedijacije

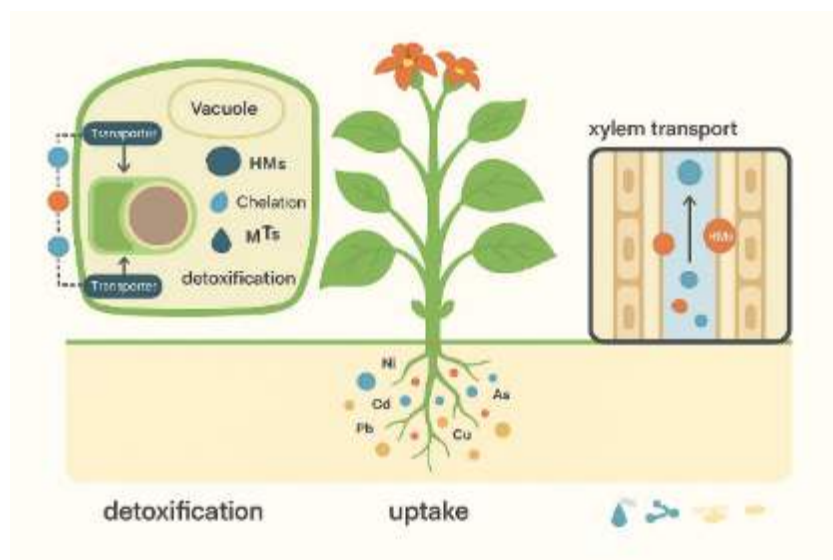
Fitoremedijacija se provodi kroz nekoliko različitih, ali ponekad preklapajućih procesa:

1. **Fitoproliferacija** - Biljke rastu u onečišćenim tlima, pri čemu njihov korijenski sustav apsorbira i koncentrira onečišćujuće tvari iz tla ili vode.



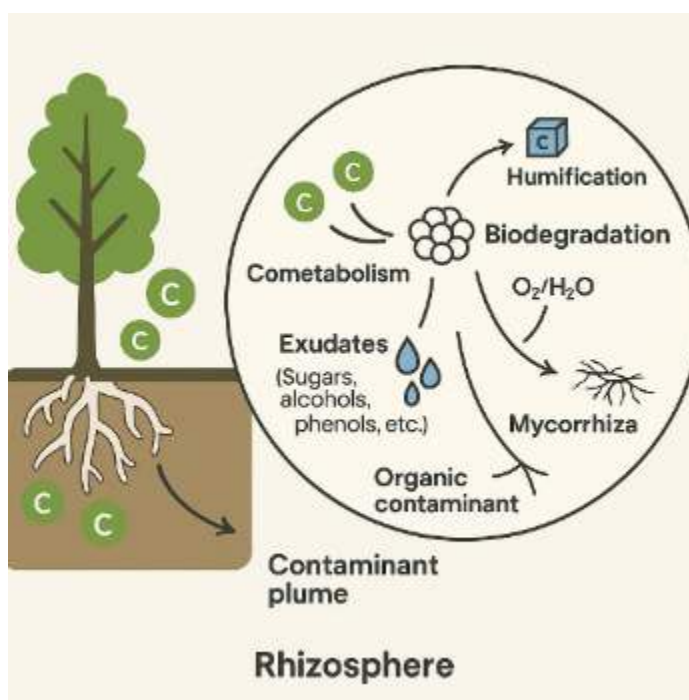
Slika 1.8 Procesi fitoremedijacije

2. **Fitorizostaza** - Biljke akumuliraju teške metale i druge onečišćujuće tvari u svojim tkivima bez značajnih fizioloških oštećenja. Ovaj proces omogućuje koncentraciju onečišćujućih tvari u biomasi koja se može ukloniti s tla i tako doprinjeti procesima dekontaminacije tla.



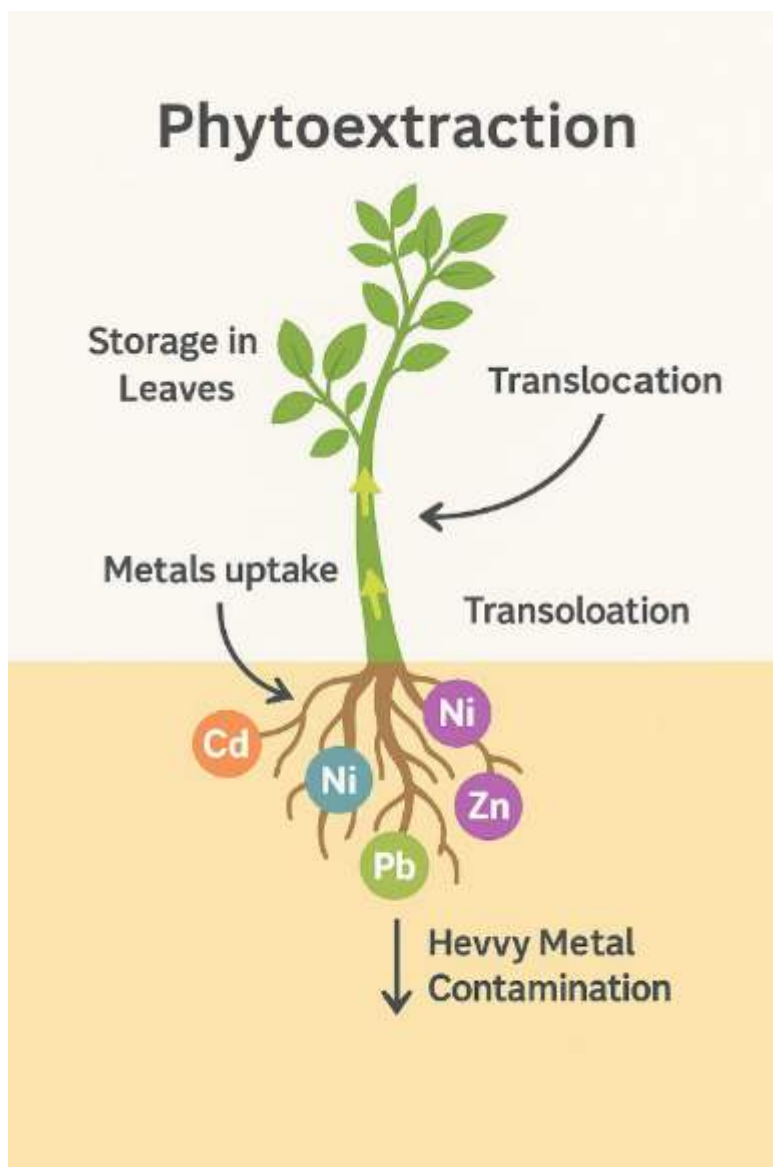
Slika 1.9 Procesi fitoremedijacije

3. **Fitodegradacija (ili fitotransformacija)** - Biljke proizvode enzime (npr. dehalogenaze, peroksidaze, lakaze) sposobne razgraditi složene organske zagađivače ili transformirati anorganske zagađivače u manje toksične oblike.



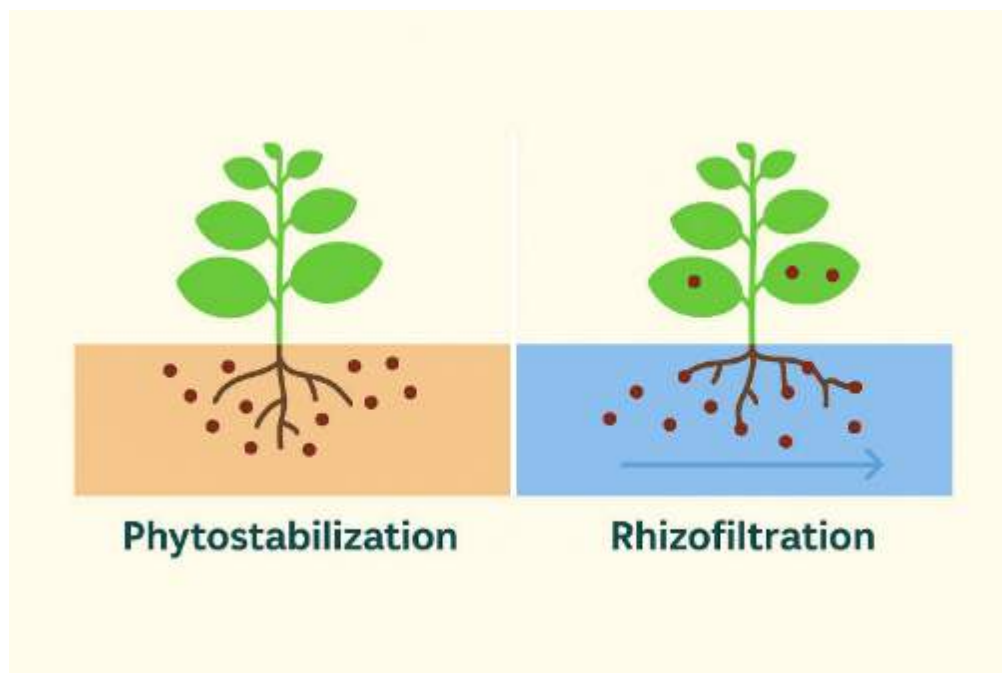
Slika 1.10 Procesi fitoremedijacije

4. **Fitoekstrakcija** - Biljke apsorbiraju metale i metaloide iz tla ili vode i prenose ih u nadzemne dijelove poput stabljika i lišća. Kontaminirana biomasa se zatim uklanja sa površine tla i zbrinjava.



Slika 1.11 Procesi fitoekstrakcije

5. **Rizofiltracija (Fitorizofiltracija)** - Korijenje filtrira i adsorbira onečišćujuće tvari, posebno teške metale, iz vode. Ova metoda je posebno učinkovita u izgrađenim močvarama ili za pročišćavanje industrijskih otpadnih voda.



Slika 1.12 Procesi fitostabilizacije i rizofiltracije

6. Fitovolatilizacija - Određene biljke apsorbiraju onečišćujuće tvari i pretvaraju ih u hlapljive spojeve koji se potom ispuštaju u atmosferu u manje štetnim oblicima.

Prednosti i ograničenja

Fitoremedijacija se smatra zelenom tehnologijom koja nudi više ekoloških i ekonomskih prednosti: jeftina je, neinvazivna, estetski kompatibilna s krajolikom i doprinosi poboljšanju plodnosti tla. Nadalje, potiče interakcije rizosfere, stimulirajući mikrobnu aktivnost i promičući bioraznolikost.

Međutim, fitoremedijacija ima i važna ograničenja:

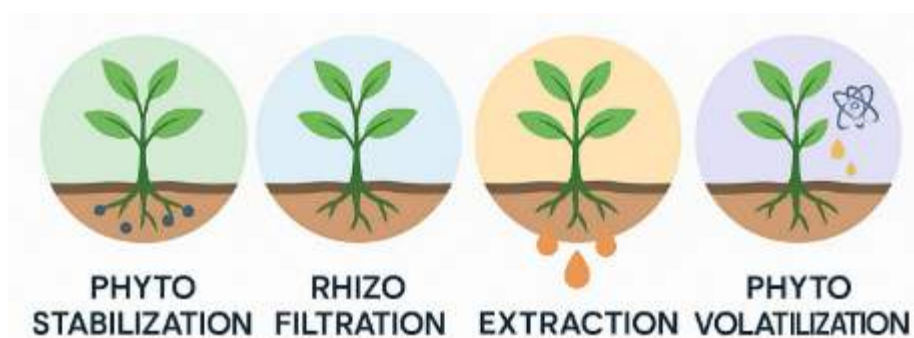
- Njezina učinkovitost je ograničena dubinom korijena (obično 30–50 cm),
- Sanacija je često sporija u usporedbi s fizikalno-kemijskim tretmanima,
- Apsorpcija onečišćujućih tvari varira ovisno o vrsti biljaka, vrsti onečišćujuće tvari i uvjetima tla, te
- Biomasa koja sadrži koncentrirane zagađivače zahtijeva pažljivo upravljanje i uklanjanje kontaminiranih biljaka (npr u temelje građevinskih objekata)

Unatoč tim izazovima, fitoremedijacija ostaje obećavajuća strategija za upravljanje tlima onečišćenim teškim metalima, posebno kada se integrira s drugim tehnologijama remedijacije.



Apsorpcija i translokacija teških metala u biljkama

Apsorpcija i translokacija teških metala u biljkama posredovani su nizom fizioloških i biokemijskih procesa, uključujući apsorpciju korijena, transport od korijena do izdanka, opterećenje ksilemom i staničnu sekvestraciju (Yan i sur., 2020.). Mnogi teški metali pojavljuju se u tlu u topljivim ionskim oblicima, što ih čini lako dostupnima za apsorpciju korijenom. Međutim, neki teški metali postoje u netopljivim ili slabo mobilnim oblicima, što predstavlja izazov za apsorpciju od strane biljaka. Kako bi to prevladale, biljke su razvile nekoliko adaptivnih mehanizama koji povećavaju bioraspoloživost metala u rizosferi. Jedan takav mehanizam uključuje izlučivanje kelirajućih sredstava (npr. organskih kiselina, aminokiselina i fenolnih spojeva) iz korijena, koja mobiliziraju inače nedostupne metale povećavajući njihovu apsorpciju (Dalvi i Bhalerao, 2013.).



Slika 1.13 Procesi fitostabilizacije, rizofiltracije, ekstrakcije i fitovolatilizacije

Putovi unosa teških metala

Apsorpcija teških metala odvija se putem dva glavna puta: apoplastičnog i simplastičnog.

Apoplastični put uključuje pasivnu difuziju kroz apoplast, gdje se metali kreću duž staničnih stijenki i međustaničnih prostora bez prelaska plazma membrane. Ovaj put uvelike ovisi o gradijentima koncentracije i sastavu otopine tla.

Simplastični put, nasuprot tome, aktivan je proces koji uključuje prolazak metala kroz živa tkiva, uključujući citoplazmu i plazma membrane, često posredovan specifičnim transportnim proteinima (Peer i sur., 2005.).

Nakon apsorpcije, ioni teških metala obično tvore stabilne komplekse s kelatnim molekulama poput fitokelatina i metalotioneina unutar stanica korijena, smanjujući njihovu toksičnost. Ti se



kompleksi sekvstriraju ili u vakuole (intracelularno skladištenje) ili imobiliziraju unutar staničnih stijenki (izvancelularno skladištenje) (Ali i sur., 2013.). Nakon detoksiciranja i odvajanja, dio metalnih iona transportira se do stele, a potom se utovaruje u ksilem, odakle se translociraju transpiracijskom strujom u nadzemne biljne organe (Thakur i sur., 2016.; Kumar i sur., 2022.). Ova sustavna distribucija omogućuje određenim vrstama akumuliranje značajnih količina metala u izbojcima i lišću, tvoreći fiziološku osnovu za fitoremedijaciju.

Fitoremedijacija i hiperakumulatori

Posljednjih godina fitoremedijacija se pojavila kao učinkovita, ekološki održiva i relativno jeftina tehnologija za uklanjanje ili stabilizaciju toksičnih metala u tlu. Među strategijama uključenim u fitoremedijaciju, fitoekstrakcija je posebno važna za teške metale, oslanjajući se na prirodnu sposobnost biljaka da apsorbiraju i akumuliraju i esencijalne i neesencijalne metale u svojim tkivima.

Biljke s izvanrednim kapacitetom akumulacije metala klasificiraju se kao hiperakumulatori (Trapp & Legind , 2010). Ove vrste mogu tolerirati i koncentrirati metale poput olova (Pb), kadmija (Cd), kroma (Cr), arsena (As) i radionuklida, koji su inače toksični za većinu biljaka. Nadalje, hiperakumulatori su sposobni apsorbirati ne samo esencijalne mikronutrijente potrebne za rast (npr. Fe, Mn, Zn, Cu, Mg, Mo, Ni), već i neesencijalne i toksične metale (npr. Cd, Cr, Pb, Co, Ag, Se, Hg) koji nemaju poznatu biološku funkciju (Vamerali i sur., 2010). Ta ih sposobnost čini vrlo vrijednim alatima za dekontaminaciju tala pogođenih industrijskim aktivnostima, rudarstvom i poljoprivrednim onečišćenjem.

Pozitivni aspekti fitoremedijacije

Fitoremedijacija nudi nekoliko prednosti u usporedbi s konvencionalnim tehnologijama remedijacije:

Učinkovitost i široka primjenjivost – Može značajno smanjiti razinu onečišćujućih tvari i učinkovit je protiv širokog spektra onečišćujućih tvari, uključujući metale, organske tvari i radionuklide.

Ekonomska učinkovitost – Zahtijeva manje infrastrukture, nema visoko specijaliziranog osoblja i znatno je jeftinija od fizikalnih ili kemijskih metoda sanacije.

Prikladnost za velika područja – Posebno je atraktivna za velika, umjereno onečišćena mjesta gdje je tradicionalna sanacija ekonomski ili tehnički neizvediva.



Co-funded by
the European Union



Kompatibilnost s okolišem – Poboljšava plodnost tla, povećava mikrobnu raznolikost u rizosferi i lako se integrira u ekosustave, izbjegavajući poremećaje u okolišu uzrokovane iskopavanjem ili spaljivanjem.

Isplativost u pročišćavanju vode – Fitoremedijacija je posebno korisna za sanaciju velikih količina vode s niskim koncentracijama onečišćujućih tvari ili za površinska tla s difuznim, niskim do umjerenim onečišćenjem.

Ove prednosti pozicionirale su fitoremedijaciju kao inovativnu alternativu tradicionalnim metodama poput odlaganja opasnog otpada ili ispranja tla. Za razliku od konvencionalnih pristupa, ne zahtijeva visoke energetske unose ili složenu tehnologiju, što je čini ne samo isplativom već i dugoročno održivom.



1.5 Literatura

AbdelRahman , MAE (2023). Pregled degradacije zemljišta, dezertifikacije i održivog upravljanja zemljištem korištenjem GIS-a i aplikacija daljinskog istraživanja. *Rendiconti Lincei . Znanost Fisiche e Naturali* , 34, 767–808.

Alegbeleye , OO, Singleton, I. i Sant'Ana , AS (2018). Izvori i putovi kontaminacije svježih proizvoda mikrobnim patogenima tijekom uzgoja na polju: Pregled. *Food Microbiology*, 73, 177–208.

Alengebawy , A., Abdelkhalek , ST, Qureshi, SR i Wang, MQ (2021). Toksičnost teških metala i pesticida u poljoprivrednom tlu i biljkama: Ekološki rizici i implikacije za ljudsko zdravlje. *Toxics*, 9(3), 42.

Baličević , R., & Ravlić , M. (2014). Herbicidi u zaštiti bilja . *Poljoprivreda* , 20(1), 43.

Dokić , M., Bilandžić , N., & Briški , F. (2012). Postupci uklanjanje pesticid iz okrug . *Kemija u industriji* , 61(7–8), 341–348.

Erguven , GO (2018). Usporedba nekih gljiva u tlu i bioremedijacije herbicida acetoklora pod miješanim medijima za uzgoj. *Bilten o onečišćenju okoliša i toksikologiji*, 100(4), 570–575.

Fanda , I. (2022). Opasnosti i rizici upotreba pesticida (doktorska disertacija, Veleučilište u Karlovcu, Odjel za sigurnost i zaštitu).

Frazar , C. (2000). Bioremedijacija i fitoremedijacija mjesta kontaminiranih pesticidima. Washington, DC: Američka agencija za zaštitu okoliša.

Gonçalves, CR i da Silva Delabona , P. (2022). Strategije za bioremedijaciju pesticida: Izazovi i perspektive brazilskog scenarija za globalnu primjenu – pregled. *Environmental Advances*, 8, 100-220.

Gunther, T., Kirsche , B. i Fritsche , W. (2000). Potencijal interakcija biljaka i mikroba za in situ bioremedijaciju tala onečišćenih ugljikovodicima. *Environmental Science and Pollution Control Series*, 3, 285–294.



Jaishankar , M., Tseten , T., Anbalagan , N., Mathew, BB i Beeregowda , KN (2014). Toksičnost, mehanizam i učinci nekih teških metala na zdravlje. Interdisciplinarna toksikologija, 7(2), 60–72.

Jurković, D., Ćosić, J., & Vrandečić, K. (2017). Pseudogljive i gljive ratarskih kultura (p. 288). Osijek: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera.

Katan, J. (2017). Diseases caused by soilborne pathogens: Biology, management and challenges. Journal of Plant Pathology, 99(2), 305–315.

Marcelino, S., Hamdane, S., Gaspar, P. D., & Paço, A. (2023). Sustainable agricultural practices for the production of medicinal and aromatic plants: Evidence and recommendations. Sustainability, 15(19), 14095.

Prasad, MNV (2003). Fitoremedijacija ekosustava zagađenih metalima: Pomama za komercijalizaciju. Ruski časopis za biljnu fiziologiju, 50(5), 686–701.

Raffa, CM i Chiampo , F. (2021). Bioremedijacija poljoprivrednih tala onečišćenih pesticidima: pregled. Bioinženjering, 8(7), 92.

Sharma, JK, Kumar, N., Singh, NP i Santal, AR (2023). Tehnologije fitoremedijacije i njihov mehanizam za uklanjanje teških metala iz onečišćenog tla: Pristup za održivi okoliš. Frontiers in Plant Science, 14, 1076876.

Singhvi , R., Koustas , RN i Mohn , M. (1994). Onečišćujuće tvari i mogućnosti sanacije na mjestima gdje se koriste pesticidi. EPA/600/R-94/202. Cincinnati, OH: Agencija za zaštitu okoliša SAD-a.

Tangahu , BV, Sheikh Abdullah, SR, Basri , H., Idris, M., Anuar , N. i Mukhlisin , M. (2011). Pregled unosa teških metala (As, Pb i Hg) u biljke putem fitoremedijacije. International Journal of Chemical Engineering, 2011, 939161.

Thakur, S., Singh, L., Wahid, ZA, Siddiqui, MF, Atnaw , SM i Din, MF (2016). Uklanjanje teških metala iz tla pomoću biljaka: Apsorpcija, translokacija, mehanizam tolerancije, izazovi i buduće perspektive. Environmental Monitoring and Assessment, 188(4), 206.

Tudi , M., Ruan , HD, Wang, L., Lyu , J., Sadler, R., Connell, D., Chu, C. i Phung, DT (2021). Razvoj poljoprivrede, primjena pesticida i njegov utjecaj na okoliš. Međunarodni časopis za istraživanje okoliša i javno zdravlje, 18(3), 1112.



Co-funded by
the European Union



Vamerali , T., Bandiera , M. i Mosca , G. (2010). Poljske kulture za fitoremedijaciju zemljišta kontaminiranog metalima: Pregled. *Environmental Chemistry Letters*, 8(1), 1–17.

Yan, A., Wang, Y., Tan, SN, Mohd Yusof, ML, Ghosh, S. i Chen, Z. (2020). Fitoremedijacija: Obećavajući pristup revegetaciji zemljišta zagađenog teškim metalima. *Frontiers in Plant Science*, 11, 513099.



POGLAVLJE 2. ANALIZA KONTAMINANATA, OTPORNOST NA ANTIMIKROBNE SREDSTVA

2.1 Uvod

Kontaminacija okoliša antropogenim aktivnostima postala je jedan od definirajućih izazova 21. stoljeća, s dubokim implikacijama za ekosustave, sigurnost hrane i javno zdravlje. Moderni industrijski razvoj, intenzivna poljoprivreda, urbanizacija i prekomjerna upotreba kemikalija doveli su do široko rasprostranjenog ispuštanja onečišćujućih tvari u tlo, vodne sustave i atmosferu. Ti onečišćujućih tvari uključuju teške metale, pesticide, farmaceutske proizvode, organska otapala, ostatke plastike i patogene mikroorganizme. Sve više dokaza upućuje na to da takve onečišćujuće tvari ne djeluju izolirano, već često međusobno djeluju, pojačavajući svoje toksikološke i ekološke utjecaje. Među njima, antimikrobna kontaminacija i porast antimikrobne rezistencije (AMR) predstavljaju posebno hitnu globalnu krizu.

Antimikrobna sredstva, nekada smatrana revolucionarnim alatima u medicini, poljoprivredi i stočarstvu, sve se više prepoznaju kao dvosjekli mač. Njihova opsežna i često nekontrolirana upotreba ne samo da je dovela do ulaska ostataka u okolišne sustave, već je potaknula i pojavu i širenje rezistentnih mikrobnih sojeva. Prisutnost antimikrobnih sredstava u tlu, sedimentima, površinskim vodama, pa čak i podzemnim vodama vrši kontinuirani selektivni pritisak na mikrobne zajednice, omogućujući rezistentnim genima da se šire i prenose među vrstama (Martínez, 2009). To je stvorilo ono što mnogi istraživači nazivaju „okolišnom dimenzijom antimikrobne rezistencije“, gdje prirodni ekosustavi postaju i spremnici i kanali za rezistentne bakterije i gene otpornosti.

Na sudbinu antimikrobnih sredstava u okolišu utječu brojni procesi, uključujući razgradnju, adsorpciju na čestice tla, ispiranje u podzemne vode i unos u biljke i životinje. Njihova postojanost uvelike varira ovisno o kemijskoj strukturi spoja i svojstvima okoliša primatelja. Dok se neki antibiotici relativno brzo razgrađuju, drugi ostaju stabilni dulje vrijeme, stvarajući trajnu ekološku izloženost. Ostaci se često otkrivaju u poljoprivrednim tlima navodnjavanim otpadnim vodama, u rijekama koje primaju otpadne vode iz farmaceutskih tvornica i na poljima obogaćenim gnojivom. Ovi putovi ilustriraju kako su ljudske aktivnosti usko povezane sa širenjem onečišćujućih tvari i antimikrobne rezistencije u okolišu.

Posljedice ovih procesa protežu se izvan okolišnih odjeljaka. Rezistentne bakterije i geni otpornosti koji potječu iz ekoloških žarišta mogu ponovno ući u ljudske i životinjske populacije putem kontaminirane hrane, vode i izravnog kontakta. Ovaj ciklus ilustrira koncept Jednog



zdravlja, koji naglašava da su zdravlje ljudi, životinja i okoliša međusobno povezani i da se ne mogu rješavati izolirano (Robinson i sur., 2016.). Porast organizama otpornih na više lijekova poput *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* i *Pseudomonas aeruginosa* predstavlja ozbiljnu prijetnju kliničkoj medicini, a mogućnosti liječenja uobičajenih infekcija postaju sve ograničenije.

Druga dimenzija koja komplicira ovo pitanje je interakcija između antimikrobnih sredstava i drugih onečišćujućih tvari iz okoliša. Teški metali, pesticidi, dezinficijensi i mikroplastika mogu se pojaviti zajedno s antimikrobnim sredstvima, ponekad pojačavajući selekciju i perzistenciju rezistentnih sojeva. Na primjer, pokazalo se da teški metali poput bakra i cinka, koji se široko koriste u poljoprivredi, koselektiraju gene otpornosti zbog zajedničkih genetskih platformi poput plazmida i integrona (Seiler & Berendonk, 2012). Slično tome, organski onečišćujuće tvari mogu utjecati na metabolizam mikroba, neizravno mijenjajući dinamiku otpornosti. Takve interakcije ističu sinergijski utjecaj složenih mješavina onečišćujućih tvari u oblikovanju obrazaca otpornosti.

Okolišni pokretači antimikrobne rezistencije su raznoliki i višestruki. Čimbenici poput temperature, pH vrijednosti, dostupnosti hranjivih tvari i sastava mikrobne zajednice značajno utječu na perzistenciju antimikrobnih sredstava i mobilnost gena otpornosti. Vodeni ekosustavi, posebno rijeke i sedimenti, smatraju se glavnim rezervoarima otpornosti zbog svoje uloge kao zona konvergencije za otpadne vode iz kućanstava, bolničke otpadne vode i poljoprivredno otjecanje. Sustavi tla jednako su važni, funkcionirajući kao dugoročni ponori onečišćujućih tvari i kao žarišta za horizontalni prijenos gena među mikrobnim zajednicama.

S gledišta rizika, AMR predstavlja dvostruku prijetnju: ugrožava javno zdravlje smanjenjem učinkovitosti antibiotika i potkopava integritet ekosustava mijenjajući dinamiku mikrobne zajednice. Otporni patogeni u okolišu mogu kolonizirati nove domaćine, dok promjene u mikrobnim zajednicama mogu poremetiti cikluse hranjivih tvari, plodnost tla i ukupne usluge ekosustava. Nadalje, predviđa se da će ekonomski trošak AMR-a biti ogroman, s procjenama koje sugeriraju milijune preranih smrti i bilijune dolara globalnih ekonomskih gubitaka do 2050. ako se problem ne riješi (O'Neill, 2016).

S obzirom na te zabrinutosti, istraživanja su se sve više usredotočila na metode za otkrivanje, praćenje i smanjenje antimikrobne kontaminacije i rezistencije u okolišu. Napredni analitički alati poput metagenomike, visokopropusnog sekvenciranja i masene spektrometrije omogućuju detaljne procjene onečišćujućih tvari i gena otpornosti. Istodobno se razvijaju inovativne strategije za ublažavanje širenja antimikrobne rezistencije, uključujući korištenje



izgrađenih močvara, izmjene biougleda u tlu, napredne procese oksidacije u pročišćavanju otpadnih voda i politike koje potiču odgovornu upotrebu antimikrobnih sredstava.

Ovo poglavlje bavi se ključnim pitanjem onečišćujućih tvari u okolišu s posebnim naglaskom na ostatke antimikrobnih tvari i otpornost. Istražuje sljedeće teme: sudbinu antimikrobnih tvari u okolišu, mehanizme kojima se otpornost pojavljuje i širi, zdravstvene i ekološke posljedice izloženosti antimikrobnim tvarima, sinergijske učinke antimikrobnih tvari s drugim onečišćujućim tvarima i čimbenike okoliša koji oblikuju dinamiku otpornosti. Konačno, ističe trenutne i nove tehnike za smanjenje otpornosti na antimikrobne tvari i kontaminacije, premošćujući znanja iz znanosti o okolišu, mikrobiologije, javnog zdravstva i politike.

Ispitivanjem ovih dimenzija, ovo poglavlje ima za cilj pružiti sveobuhvatno razumijevanje ekoloških i zdravstvenih implikacija onečišćujućih tvari i antimikrobne rezistencije, smještajući ih u širi okvir održivog upravljanja okolišem i globalne zdravstvene sigurnosti.

2.2 Laboratorijske metodologije za testiranje bakterijske osjetljivosti na antimikrobne lijekove

Širenje višestrukih patogenih bakterija otpornih na antimikrobne lijekove prepoznali su Svjetska organizacija za zdravlje životinja (OIE), Organizacija za hranu i poljoprivredu (FAO) i Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) kao ozbiljnu globalnu prijetnju zdravlju ljudi i životinja. Razvoj bakterijske antimikrobne rezistencije nije ni neočekivan ni novi fenomen. Međutim, postao je sve zabrinjavajući problem zbog česte pojave novih fenotipova rezistencije među raznim bakterijskim patogenima, pa čak i komenzalnim organizmima. Povijesno gledano, mnoge su se infekcije mogle uspješno liječiti na temelju prošlog iskustva kliničara (tj. empirijske terapije). Međutim, ovaj pristup postaje više iznimka nego pravilo (Walker, 2007.). Rezistencija je uočena na gotovo sve antimikrobne agense koji su trenutno odobreni za upotrebu u humanoj i veterinarskoj medicini. U kombinaciji sa širokim rasponom dostupnih antimikrobnih sredstava, to čini odabir odgovarajućeg liječenja sve izazovnijim. Kao rezultat toga, kliničari su postali više ovisni o podacima in vitro testiranja osjetljivosti na antimikrobne lijekove (AST), naglašavajući ključnu ulogu dijagnostičkih laboratorija u kliničkoj praksi. Dostupno je nekoliko AST metoda za određivanje osjetljivosti bakterija na antimikrobne lijekove. Izbor metode ovisi o raznim čimbenicima, uključujući praktičnost, fleksibilnost, automatizaciju, trošak, ponovljivost, točnost i individualne preferencije. Standardizacija i usklađivanje AST metodologija u epidemiološkom nadzoru antimikrobne rezistencije ključno je za osiguranje usporedivosti među nacionalnim i međunarodnim programima nadzora koje provode zemlje članice OIE-a. Bitno je da AST metode pružaju ponovljive rezultate u rutinskoj



laboratorijskoj upotrebi i da se podaci usklade s rezultatima dobivenim priznatom referentnom metodom "zlatnog standarda". Bez standardiziranih metoda ili referentnih postupaka, rezultati osjetljivosti iz različitih laboratorija ne mogu se pouzdano uspoređivati. Osim toga, metode koje se koriste za odabir uzoraka za programe nadzora antimikrobne rezistencije, kao i one za primarnu bakterijsku izolaciju, također bi trebale biti standardizirane ili usklađene kako bi se omogućila izravna usporedba podataka u različitim regijama. Ova razmatranja obrađena su u dokumentu OIE-a (Dehaumont , 2004.). Kako je znanost o AST-u napredovala, sada postoji jasnije razumijevanje višestrukih čimbenika koji utječu na ishode testiranja osjetljivosti. Ovaj dokument pruža smjernice za standardizaciju AST metodologija i tumačenje rezultata testova antimikrobne osjetljivosti.

2.2.1 Zahtjevi za testiranje

Kako bi se osigurala standardizacija metoda ispitivanja antimikrobne osjetljivosti (AST) i usporedivost rezultata među laboratorijima, moraju se ispuniti sljedeći temeljni zahtjevi:

1 Standardizirana metodologija i harmonizacija

- Usvajanje standardiziranih AST metoda je ključno.
- Mora se osigurati usklađivanje parametara ispitivanja, uključujući odabir antimikrobnih sredstava i odgovarajućih kriterija interpretacije.

2 Jasna definicija i dokumentacija

- Sve standardizirane AST metode, zajedno s kritičnim specifikacijama i kriterijima interpretacije, moraju biti eksplicitno definirane, temeljito dokumentirane i jednoobrazno primjenjivane u svim laboratorijima.

3 Točnost i ponovljivost

- AST metode moraju dosljedno generirati točne, reproducibilne i kvantificirane podatke kako bi se održao integritet rezultata.

4 Osnivanje koordinacijskih laboratorija

- Trebalo bi odrediti nacionalne ili regionalne referentne laboratorije za nadzor koordinacije AST metodologija, osiguranje točnih interpretacija i provedbu strogih mjera kontrole kvalitete.



5 Upravljanje kvalitetom i akreditacija

- Mikrobiološki laboratoriji moraju implementirati i održavati formalni sustav upravljanja kvalitetom kako bi održali standarde testiranja.
- Laboratoriji bi trebali dobiti akreditaciju treće strane, osiguravajući usklađenost s međunarodno priznatim standardima Suradnje za akreditaciju laboratorija (ILAC).
- Sudjelovanje u programima ispitivanja osposobljenosti mora biti obavezno kako bi se provjerila tehnička kompetencija.

6 Referentni sojevi i osiguranje kvalitete

- Korištenje specifičnih bakterijskih referentnih i kontrolnih sojeva kvalitete ključno je za osiguranje unutarlaboratorijske i međulaboratorijske dosljednosti, osiguranja kvalitete i ispitivanja sposobnosti.

Pridržavanjem ovih standardiziranih zahtjeva, laboratoriji mogu osigurati pouzdanost, točnost i globalnu usporedivost rezultata AST-a, što u konačnici podržava učinkovitiji nadzor antimikrobne rezistencije i kliničko donošenje odluka.



Slika 2. 1osjetljivosti na antimikrobne lijekove (AST) (URL1).

2.2.2 Odabir antimikrobnih sredstava za ispitivanje i izvještavanje



Odabir odgovarajućih antimikrobnih sredstava za testiranje osjetljivosti može biti izazovan zbog velikog broja dostupnih sredstava. Treba uzeti u obzir sljedeće smjernice.

1 Preporuke FAO-a/OIE-a/WHO-a

Stručna radionica FAO/OIE/WHO o upotrebi antimikrobnih sredstava ne kod ljudi i otpornosti na antimikrobna sredstva preporučuje izradu popisa kritično važnih veterinarskih i humanih antimikrobna sredstva za testiranje i izvještavanje o osjetljivosti.

2 Konzultacije za odabir

Odabir najprikladnijih antimikrobnih sredstava je odluka koju najbolje donosi svaka članica OIE-a u konzultaciji s relevantnim tijelima i organizacijama.

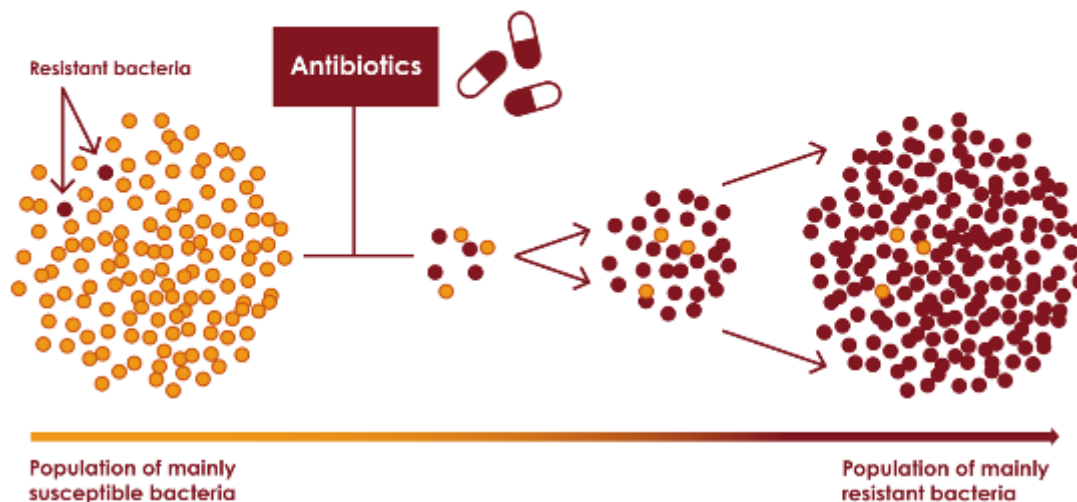
3 Aktivnost specifična za razred

Antimikrobna sredstva unutar iste klase mogu pokazivati slična *in vitro* djelovanja protiv odabranih bakterijskih patogena. U takvim slučajevima treba odabrati reprezentativni antimikrobni lijek koji predviđa osjetljivost na druge članove iste klase.

4 Intrinzični otpor

Određeni mikroorganizmi mogu biti intrinzično otporni na određene antimikrobne klase. Stoga je nepotrebno i zavaravajuće testirati aktivnost određenih sredstava *in vitro*. Vrstu intrinzične otpornosti treba odrediti za te organizme bilo putem znanstvene literature ili testiranja.

Natural selection of resistant bacteria



Slika 2. Bakterija otpornih na antibiotike putem prirodne selekcije. U ovom primjeru, proces započinje velikom bakterijskom populacijom, gdje je većina bakterija osjetljiva na antibiotike, ali nekoliko ih je prirodno otporno. Kada se uvede baktericidni antibiotik, on eliminira većinu osjetljivih bakterija, ostavljajući otporne da prežive. Tijekom vremena, samo će se otporne bakterije nastaviti razmnožavati, što dovodi do povećanja njihovog broja. Na kraju će se populacija pretežno sastojati od bakterija otpornih na antibiotike (URL 2).

5 Ograničavanje broja antimikrobnih lijekova

Broj antimikrobnih sredstava koji se testiraju treba biti ograničen kako bi se osigurala relevantnost i praktičnost AST-a (testiranja osjetljivosti na antimikrobne tvari).

Preporučuje se periodički pregled mikroorganizama koji su predvidljivo osjetljivi na određene antimikrobne agense kako bi se osiguralo otkrivanje nove, neočekivane rezistencije. Na novu rezistenciju može se posumnjati i kada postoji slab odgovor na standardni režim antimikrobnog liječenja.

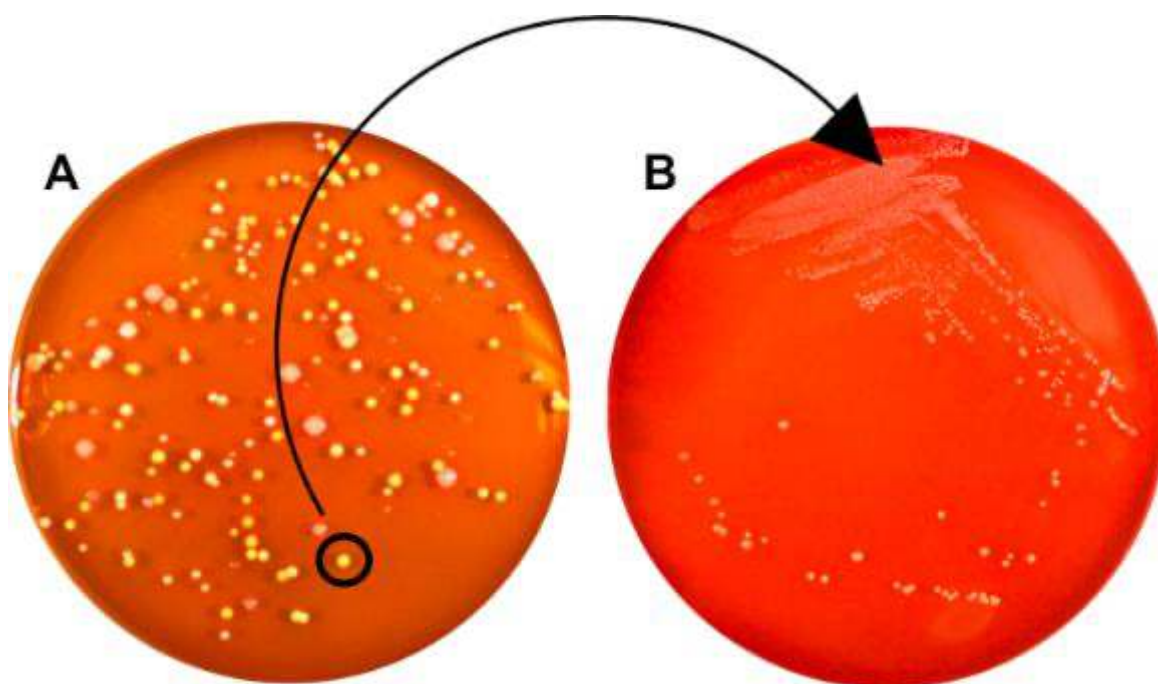
2.2.3 Metode ispitivanja osjetljivosti na antimikrobne lijekove

Treba poštovati sljedeće zahtjeve:

- Bakterije podvrgnute AST-u moraju se izolirati u čistoj kulturi iz dostavljenog uzorka,



- Za identifikaciju treba koristiti standardne referentne metode kako bi se predmetne bakterije dosljedno i ispravno identificirale do razine roda i/ili vrste,
- Bakterijski izolati koji se smatraju najvažnijima i uzorak ostalih izolata treba pohraniti za buduću analizu (liofilizacijom ili kriogenim konzerviranjem na $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ – $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$).



Slika 2. 3 pojedinačnih bakterijskih kolonija iz miješanog uzorka (URL 3).

Sljedeće čimbenike koji utječu na AST metode treba utvrditi, optimizirati i dokumentirati u detaljnom standardnom operativnom postupku:



Slika 2. 4prikladnog medija za uzgoj i odgovarajuća inkubacija za kultivirani mikroorganizam (URL 4).

- su bakterije izolirane u čistoj kulturi, potrebno je odrediti optimalnu koncentraciju inokuluma kako bi se dobili točni rezultati osjetljivosti. Bakterije ili drugi organizmi korišteni u AST testiranju trebaju biti iz svježije kulture.
- Sastav i priprema korištenog agara i jušne podloge (npr. pH, kationi, timidin ili timin, upotreba nadopunjenih podloga). Također treba odrediti i dokumentirati ispitivanje učinkovitosti i sterilnosti serija podloga, zajedno s korištenim postupcima.



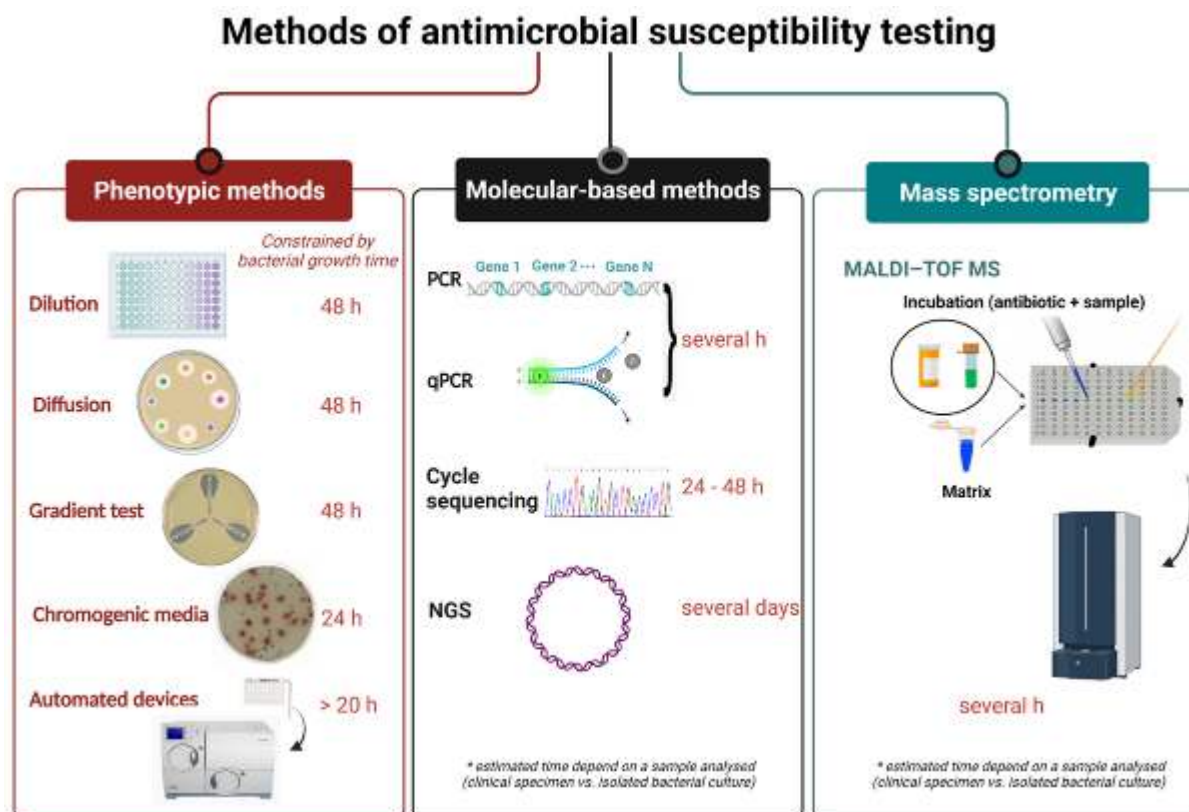
Slika 2. 5bakterija na hranjivim medijima (URL 5).

- Sadržaj antimikrobnog sredstva u nosaču (npr. antibiotici koji se koriste u mikrotitarskim pločama, diskovima, trakama, tabletama).
- Sastav otapala i razrjeđivača za pripremu antimikrobnih osnovnih otopina.
- Uvjeti rasta i inkubacije (vrijeme, temperatura, atmosfera, npr. CO₂).
- Dubina agara.
- Broj testiranih koncentracija po razrjeđenju juhe i agara.
- Kontrolne skupine za ispitivanje koje će se koristiti, uključujući korištene referentne organizme.
- Sljedeći interpretacijski kriteriji (kliničke granične vrijednosti, epidemiološke granične vrijednosti).

2.2.4 Odabir metodologije ispitivanja antimikrobne osjetljivosti

Odabir AST metodologije može se temeljiti na sljedećim čimbenicima:

- Jednostavnost izvedbe.
- Fleksibilnost.
- Prilagodljivost automatiziranim ili poluautomatskim sustavima.
- Trošak.
- Ponovljivost.
- Pouzdanost.
- Točnost.
- Organizmi i antimikrobna sredstva od interesa za tog određenog člana.
- Dostupnost odgovarajućih podataka o validaciji za raspon organizama koji se testiraju na osjetljivost.



Slika 2. 6AST metodologije (URL 6).



2.2.5 Metode ispitivanja osjetljivosti na antimikrobne lijekove

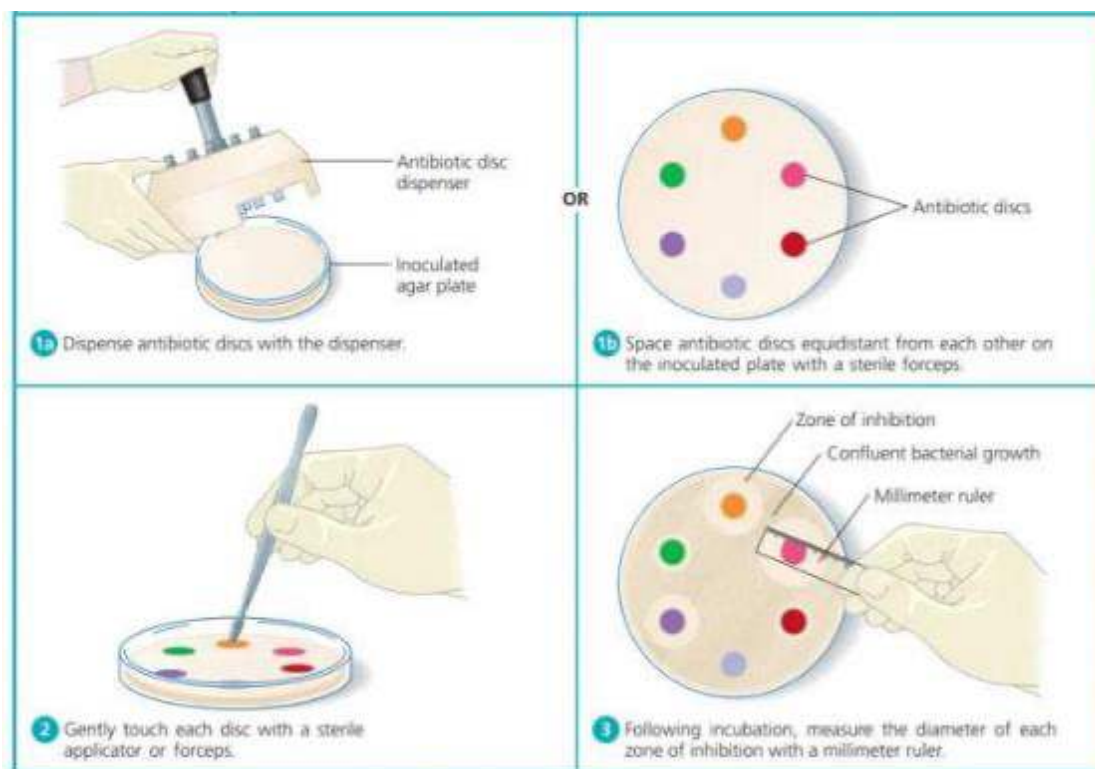
Kada se pravilno slijede, pokazalo se da sljedeće tri metode daju reproducibilne i ponovljive rezultate (Institut za kliničke i laboratorijske standarde (CLSI), 2008.; Walker, 2007.):

- Difuzija diska.
- Razrjeđivanje juhe.
- Razrjeđivanje agara.

a) Metoda disk difuzije

Difuzija diskom odnosi se na difuziju antimikrobnog sredstva određene koncentracije iz diskova, tableta ili traka u čvrsti medij za kulturu inokuliran odabranim izolatom čiste kulture. Ova metoda temelji se na određivanju zone inhibicije, koja je proporcionalna bakterijskoj osjetljivosti na antimikrobno sredstvo prisutno u disku.

Kako antimikrobno sredstvo difundira u inokulirani medij za kulturu, stvara gradijent koncentracije. Zona inhibicije definirana je tamo gdje koncentracija antimikrobnog sredstva postaje previše razrijeđena da bi suzbila rast testne bakterije. Promjer ove zone inhibicije oko antimikrobnog diska korelira s minimalnom inhibitornom koncentracijom (MIK) za specifičnu kombinaciju bakterije i antimikrobnog sredstva. Općenito, veća zona inhibicije ukazuje na nižu MIK, što znači da je potrebno manje antimikrobnog sredstva za inhibiciju rasta bakterija. Međutim, ovaj odnos također ovisi o koncentraciji antibiotika u disku i njegovim difuzijskim svojstvima.



Slika 2. 7disk difuzije (URL 7).

Napomena: Disk difuzijski testovi temeljeni isključivo na prisutnosti ili odsutnosti zone inhibicije, bez obzira na veličinu zone, nisu prihvatljiva AST metodologija.

• Razmatranja za korištenje metodologije disk difuzije

Disk difuzija je jednostavna za izvođenje, visoko ponovljiva i ne zahtijeva skupu opremu. Njene glavne prednosti uključuju:

- Niska cijena.
- Jednostavnost modificiranja testnih antimikrobnih diskova kada je potrebno.
- Može se koristiti kao probirni test protiv velikog broja izolata.
- Može identificirati podskup izolata za daljnje testiranje drugim metodama, kao što je određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC).

Ručno mjerenje zona inhibicije može oduzeti puno vremena. Dostupni su automatizirani uređaji za očitavanje zona i mogu se integrirati s laboratorijskim sustavima za izvještavanje i upravljanje podacima. Kako bi se osiguralo točno mjerenje, antimikrobni diskovi trebaju



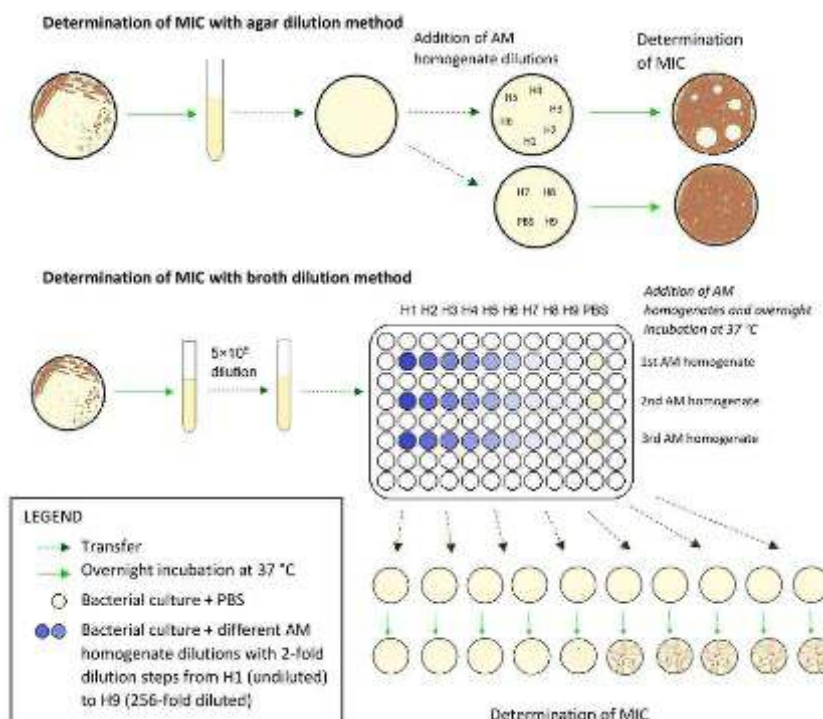
biti ravnomjerno raspoređeni kako bi se spriječilo pretjerano preklapanje zona inhibicije. Općenito, to se može postići postavljanjem diskova na razmak od najmanje 24 mm (od središta do središta), iako se potreban razmak može razlikovati ovisno o koncentraciji diska i difuzijskim svojstvima antimikrobnog sredstva u agaru.

b) Metode razrjeđivanja juhe i agara

Cilj metoda razrjeđivanja u bujonu i agaru je odrediti najnižu koncentraciju testiranog antimikrobnog sredstva koja inhibira vidljivi rast bakterija (MIK), obično izraženu u $\mu\text{g/mL}$ ili mg/L . Međutim, MIK ne predstavlja uvijek apsolutnu vrijednost. 'Prava' MIK nalazi se između najniže testirane koncentracije koja inhibira rast bakterija i sljedeće niže koncentracije. Stoga, određivanja MIK-a provedena pomoću serije razrjeđenja inherentno imaju varijaciju od jednog razrjeđenja.

Ispitivani raspon koncentracije antimikrobnih sredstava trebao bi pokrivati kriterije interpretacije (osjetljivost, srednja otpornost i otpornost) za specifičnu kombinaciju bakterija i antibiotika, kao i uključivati odgovarajuće referentne organizme za kontrolu kvalitete. U usporedbi s difuzijom na agar disku, metode razrjeđivanja antimikrobne osjetljivosti općenito su reproducibilnije i kvantitativnije. Međutim, budući da se antibiotici obično testiraju u dvostrukim razrjeđenjima, vrijednosti minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) ne moraju uvijek biti točne.

Laboratoriji koji namjeravaju koristiti metode razrjeđivanja i pripremati vlastite reagense i razrjeđenja antibiotika moraju biti sposobni nabaviti, pripremiti i održavati odgovarajuće osnovne otopine antimikrobnih sredstava reagensne kvalitete te redovito generirati radna razrjeđenja. Kako bi se osigurala točnost i standardizacija, takvi laboratoriji moraju koristiti i organizme za kontrolu kvalitete.

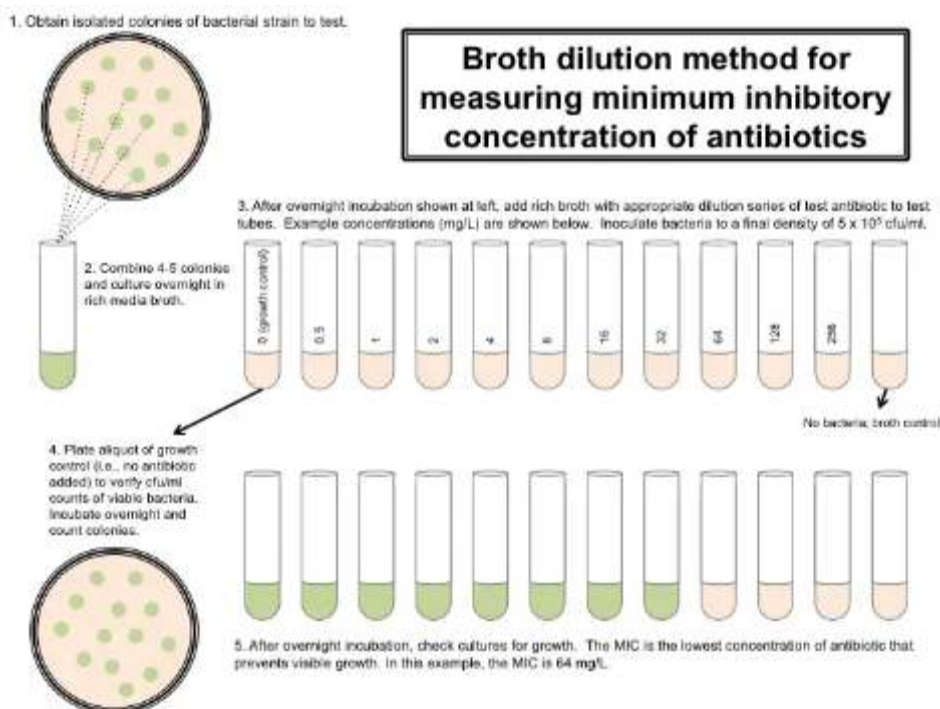


Slika 2. 8protokol za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) metodama razrjeđivanja agara i razrjeđivanja juhe (URL 8).

• Razrjeđivanje juhe

Razrjeđivanje juhe je tehnika u kojoj se bakterijska suspenzija, pripremljena u optimalnoj ili odgovarajućoj koncentraciji, testira u odnosu na različite koncentracije antimikrobnog sredstva (obično u serijskim dvostrukim razrjeđenjima) u tekućem mediju standardizirane, dokumentirane formulacije. Ova se metoda može provesti korištenjem epruveta s minimalnim volumenom od 2 mL (makrorazrjeđivanje) ili manjim volumenima u mikrotitarskim pločama (mikrorazrjeđivanje).

Komercijalno dostupne mikrotitarske ploče koje sadrže liofilizirane, prethodno razrijeđene antibiotike u jažicama pomažu u smanjenju varijabilnosti uzrokovane pripremom i razrjeđivanjem antimikrobnih sredstava u različitim laboratorijima. Korištenje standardiziranih mikrodilucijskih ploča, zajedno s dokumentiranim protokolom ispitivanja koji specificira odgovarajuće referentne organizme, poboljšava usporedivost rezultata među laboratorijima.



Slika 2. 9razrjeđivanja juhe (URL 9).

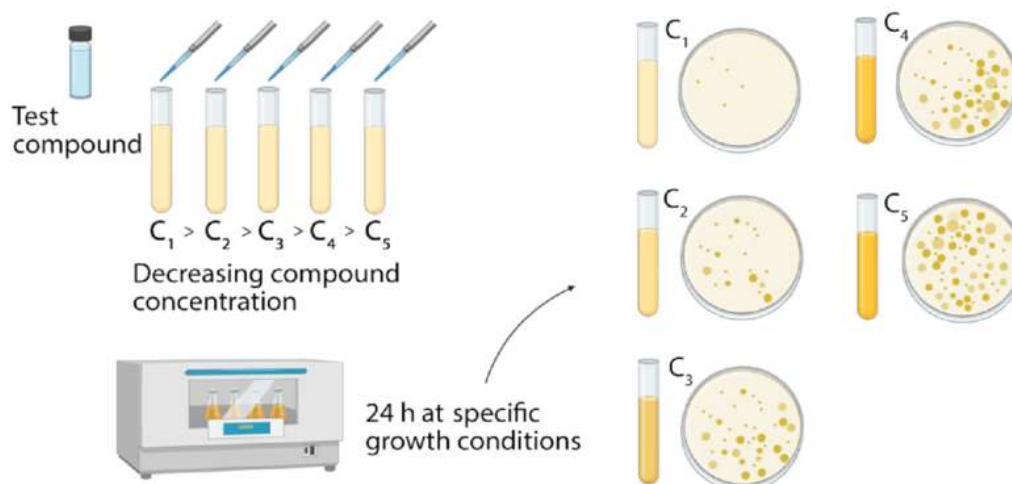
Budući da se većina antimikrobnih testnih ploča za mikrodiluciju juhe komercijalno priprema, ova metoda je manje fleksibilna od dilucije agara ili difuzije diska u prilagođavanju promjenjivim potrebama programa nadzora i praćenja. Osim toga, troškovi kupnje antimikrobnih ploča i pripadajuće opreme mogu učiniti ovu metodu nepraktičnom za neke laboratorije.



Slika 2. 10s 96 jažica za testiranje minimalne inhibitorne koncentracije (URL 10).

• Razrjeđivanje agara

Razrjeđivanje agara uključuje ugradnju različitih koncentracija antimikrobnog sredstva u agar medij, obično korištenjem serijskih dvostrukih razrjeđenja, nakon čega slijedi nanošenje definiranog bakterijskog inokuluma na površinu agara. Ova metoda se često smatra najpouzdanijom za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) specifične kombinacije bakterija i antimikrobnih sredstava.



Slika 2. 11razrjeđivanja agara (URL 11).

Prednosti metoda razrjeđivanja agara uključuju:

- Mogućnost testiranja više bakterija, osim bakterija koje se roje, na istom setu agar ploča istovremeno.
- Potencijal za poboljšanje identifikacije krajnjih točaka minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) i proširenje raspona koncentracija antibiotika.
- Mogućnost poluautomatizacije metode korištenjem aparata za replikaciju inokuluma. Komercijalno proizvedeni replikatori inokuluma dostupni su i oni mogu prenijeti između 32 i 60 različitih bakterijskih inokuluma na svaku agar ploču.

Metode razrjeđivanja agara također imaju određene nedostatke, na primjer:

- Ako nisu automatizirani, vrlo su naporni i zahtijevaju značajna ekonomska i tehnička sredstva.



- Nakon što su ploče pripremljene, obično ih treba upotrijebiti unutar tjedan dana (ili manje, ovisno o testiranim antimikrobnim sredstvima).
- Krajnje točke nisu uvijek lako očitane, niti je lako provjeriti čistoću inokuluma.

Razrjeđivanje agara često se preporučuje kao standardizirana AST metoda za zahtjevne organizme, poput anaeroba i vrsta *Helicobacter* (CLSI, 2006c).

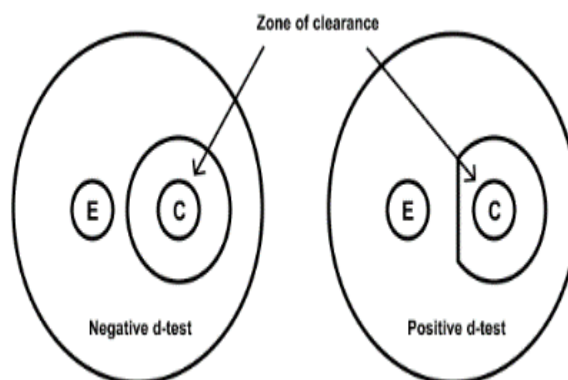
c) Drugi bakterijski AST i specifični testovi antimikrobne rezistencije

MIC vrijednosti bakterijskih antimikrobnih sredstava mogu se odrediti i korištenjem komercijalno dostupnih gradijentnih traka koje difuzijom oslobađaju unaprijed određenu koncentraciju antibiotika. Međutim, ova metoda može biti skupa, a mogu se pojaviti odstupanja u MIC vrijednostima za određene kombinacije bakterija i antimikrobnih sredstava u usporedbi s rezultatima razrjeđivanja agara (Ge i sur., 2002.; Rathe i sur., 2009.).



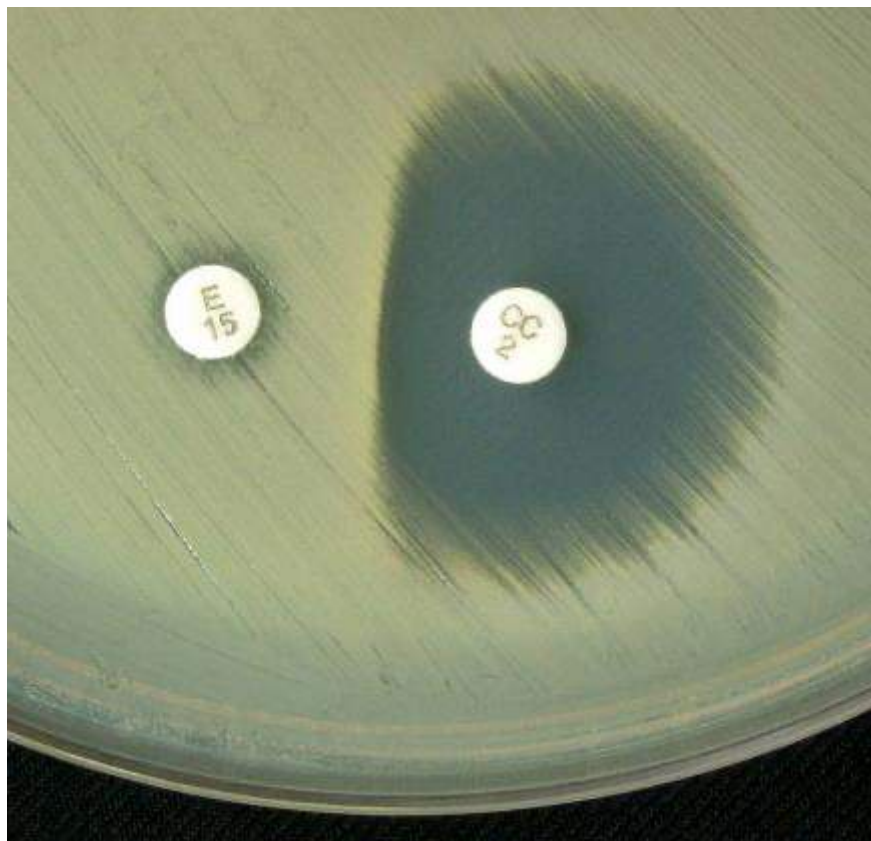
Slika 2. 12trake za testiranje minimalne inhibitorne koncentracije. (URL 12).

Bez obzira na korištenu AST metodu, postupke treba temeljito dokumentirati kako bi se osigurala točnost i ponovljivost. Osim toga, odgovarajući referentni organizmi trebaju se testirati svaki put kada se provodi AST kako bi se provjerila točnost i valjanost podataka.



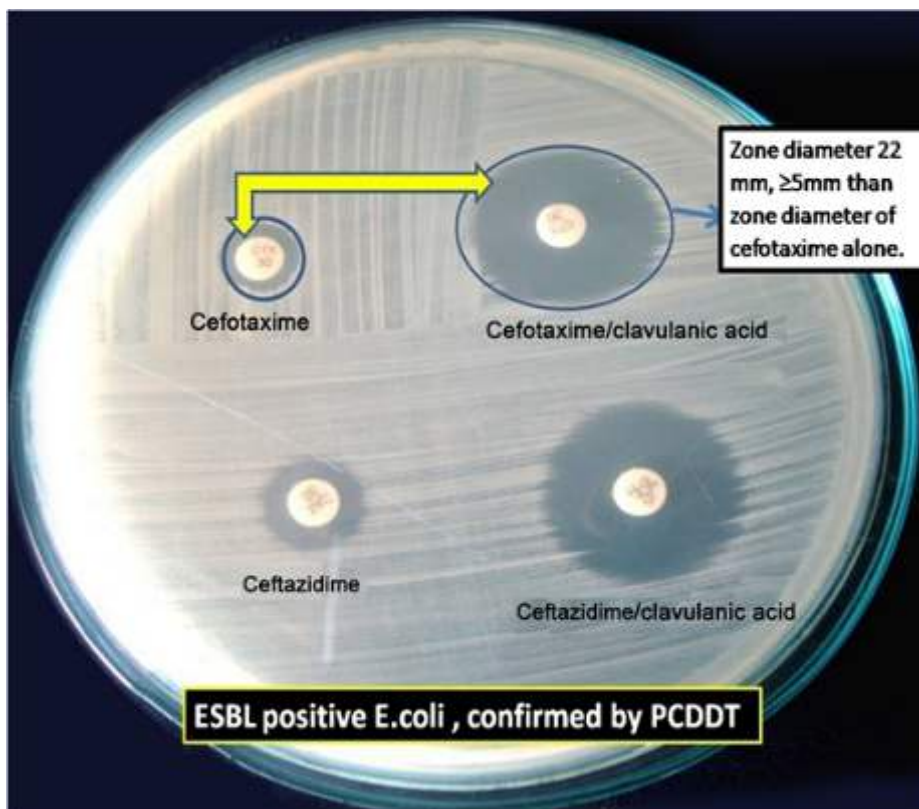
Slika 2. 13 negativnog i pozitivnog AST-a (URL 13).

Odgovarajuća AST metoda u konačnici će ovisiti o karakteristikama rasta dotične bakterije. U određenim slučajevima, nove metode ispitivanja i testovi mogu biti prikladniji za otkrivanje specifičnih fenotipova otpornosti. Na primjer, testovi na bazi kromogenih cefalosporina (npr. nitrocefina) mogu ponuditi pouzdanije i brže rezultate za otkrivanje beta-laktamaza u određenim bakterijama, dok se inducibilna otpornost na klindamicin u *Staphylococcus* spp. može identificirati korištenjem metode difuzije diska sa standardnim diskovima eritromicina i klindamicina postavljenim u susjedne položaje kako bi se izmjerile rezultirajuće zone inhibicije (npr. D-zona ili D-test) (Zelazny i sur., 2005.).



Slika 2. 14AST (URL 14).

Slično tome, aktivnost beta-laktamaze proširenog spektra (ESBL) (CLSI, 2008.) u određenim bakterijama može se otkriti standardnim disk difuzijskim testiranjem osjetljivosti, uključujući specifične cefalosporine (cefotaksim i ceftazidim) u kombinaciji s inhibitorom beta-laktamaze (klavulanska kiselina) i mjerenjem rezultirajućih zona inhibicije. Osim toga, protein 2a koji veže penicilin (PBP 2a) može se otkriti u meticilin-rezistentnim stafilokokima pomoću testa lateks aglutinacije (Stepanovic i sur., 2006.). Bitno je da se poznati pozitivni i negativni kontrolni sojevi testiraju uz kliničke izolate kako bi se osigurali točni rezultati.



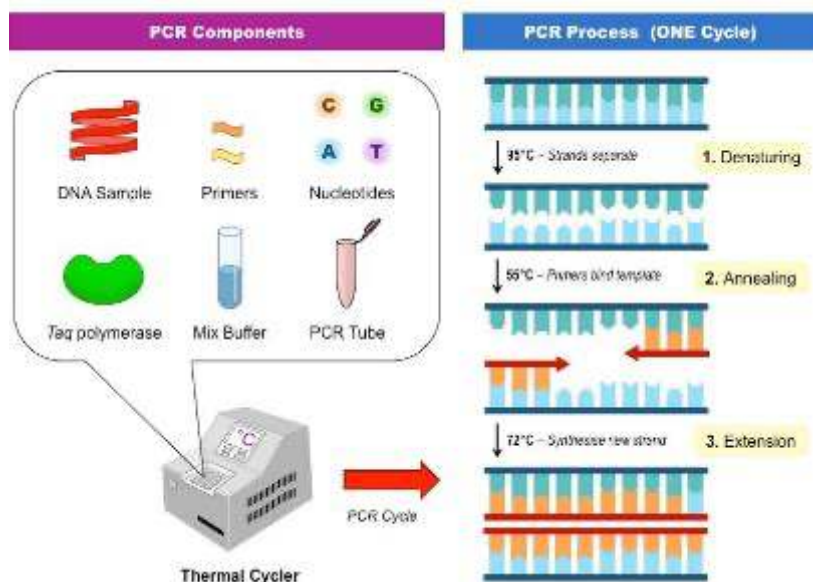
Slika 2. 15test na beta-laktamaze proširenog spektra (ESBL) (URL 15).

d) Budući smjerovi u otkrivanju osjetljivosti/rezistencije na antimikrobne lijekove

Promiče se upotreba genotipskih pristupa za otkrivanje gena antimikrobne rezistencije kako bi se povećala brzina i točnost testiranja osjetljivosti (Cai i sur., 2003.; Chen i sur., 2005.). Razvijaju se brojni testovi temeljeni na DNK za otkrivanje bakterijske rezistencije na antibiotike na genetskoj razini. Najnapredniji pristup uključuje predviđanje fenotipova antimikrobne rezistencije identificiranjem i karakterizacijom poznatih gena koji kodiraju specifične mehanizme otpornosti.

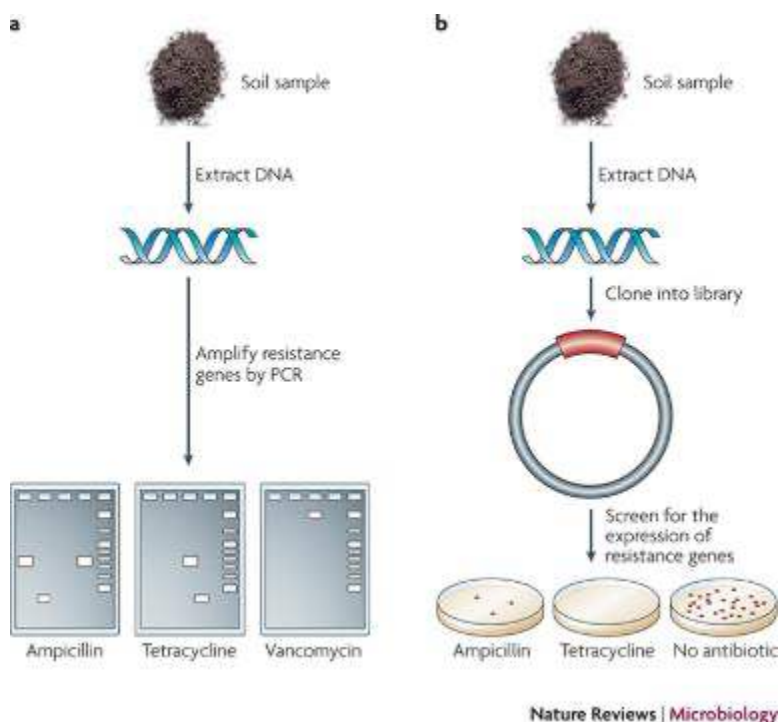
Metode koje koriste komparativnu genomiku, genetske probe, mikročipove, tehnike amplifikacije nukleinskih kiselina (npr. lančana reakcija polimeraze, PCR) i sekvenciranje DNA nude potencijal za povećanu osjetljivost, specifičnost i brzinu u otkrivanju specifičnih poznatih gena otpornosti (Cai i sur., 2003.; Chen i sur., 2005.; Perreten i sur., 2005.). Genotipske metode uspješno su primijenjene kao nadopuna tradicionalnim AST fenotipskim metodama za različite organizme, uključujući stafilokoke otporne na meticilin, enterokoke otporne na vankomicin i otkrivanje mutacija otpornosti na fluorokinolone (Cai i sur., 2003.; Chen i sur., 2005.; Perreten i sur., 2005.). PCR metode su također opisane za detekciju beta-laktamaza, enzima koji inaktiviraju aminoglikozide i gena za efluks

tetraciklina (Cai i sur., 2003.; Chen i sur., 2005.; Frye i sur., 2010.; Perreten i sur., 2005.).



Slika 2. 16PCR analize (URL 16).

Tehnološke inovacije u dijagnostici temeljenoj na DNK trebale bi omogućiti otkrivanje više gena i/ili varijanti otpornosti u jednom testu. Očekuje se da će razvoj brzih dijagnostičkih metoda identifikacije i genotipskog testiranja otpornosti pomoći u smanjenju pojave antimikrobne rezistencije olakšavanjem korištenja najprikladnije antimikrobne terapije na početku liječenja. Međutim, mora se dokazati da DNK tehnike nadopunjuju AST metode i rezultate.



Slika 2. 17 temeljena na DNK-u trebala bi omogućiti otkrivanje rezistencije (URL 17).

Osim toga, novi tehnološki napredak može omogućiti brzo i isplativo otkrivanje velikog broja gena antimikrobne rezistencije u bakterijskim vrstama, pružajući vrijedne podatke za programe nadzora i praćenja (Frye i sur., 2010.). Međutim, unatoč priljevu novih genotipskih testova, dokumentirane i standardizirane fenotipske AST metode i dalje će biti potrebne u bliskoj budućnosti za otkrivanje novih mehanizama rezistencije u bakterijskim patogenima.

2.2.6 Granične vrijednosti osjetljivosti na antimikrobne lijekove i kriteriji zone inhibicije

Cilj *in vitro* AST-a je predvidjeti kako će bakterijski patogen reagirati na antimikrobno sredstvo *in vivo* . Rezultati *in vitro* testova osjetljivosti bakterija na antimikrobne tvari, bilo da se koriste metode disk difuzije ili razrjeđivanja, općenito se tumače i prijavljuju kao otporni, osjetljivi ili intermedijarni na djelovanje određenog antimikrobnog sredstva. Nije utvrđena jedinstvena formula za odabir optimalnih graničnih vrijednosti. Proces uključuje pregled postojećih podataka i na njega utječe subjektivnost pojedinaca zaduženih za određivanje odgovarajućih graničnih vrijednosti. Općenito, granične vrijednosti osjetljivosti na antimikrobne tvari utvrđuju nacionalne organizacije za standardizaciju, profesionalna društva ili regulatorne agencije. Za smjernice treba konzultirati relevantne dokumente. Međutim, mogu postojati značajne razlike u graničnim vrijednostima za isto antimikrobno



sredstvo unutar i među zemljama, zbog razlika između organizacija za postavljanje standarda i regulatornih agencija, kao i regionalnih ili nacionalnih odluka o režimima doziranja (Brown i MacGowan , 2010.; De Jong i sur., 2009.; Kahlmeter i sur., 2006.). Kao što je prethodno spomenuto, rezultate testiranja osjetljivosti na antimikrobne tvari treba kvantitativno zabilježiti:

- Kao raspodjela minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) u miligramima po litri ili $\mu\text{g/mL}$.
- Ili kao promjeri zone inhibicije u milimetrima .

Sljedeća dva primarna faktora omogućuju da se bakterija protumači kao osjetljiva ili otporna na antimikrobno sredstvo:

- Razvoj i uspostavljanje raspona kontrole kvalitete (CLSI, 2006c) , korištenjem difuzije kada je to moguće i ispitivanja razrjeđivanja, za referentne mikroorganizme za kontrolu kvalitete.
- Utvrđivanje raspona kontrole kvalitete ključno je za validaciju rezultata ispitivanja dobivenih specifičnom AST metodom. Dopušteni rasponi interpretacijskih kategorija za referentne organizme trebaju se utvrditi prije određivanja graničnih vrijednosti za osjetljivost ili otpornost. Korištenje referentnih organizama je aktivnost kontrole i osiguranja kvalitete. Međutim, potrebno je samo zahtijevati korištenje referentnih organizama.
- Određivanje odgovarajućih interpretacijskih kriterija u vezi s utvrđivanjem graničnih vrijednosti (CLSI, 2006c) .

To uključuje generiranje tri različite vrste podataka:

- Raspodjela populacije minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) relevantnih mikroorganizama.
- Farmakokinetički parametri i farmakodinamički indeksi antimikrobnog sredstva.
- Rezultati kliničkih ispitivanja i iskustva.

Interpretacija podataka uključuje stvaranje dijagrama raspršenja iz distribucije bakterijske populacije (reprezentativne bakterijske vrste) crtanjem zone inhibicije u odnosu na logaritam baze 2 minimalne inhibitorne vrijednosti (MIK) za svaki bakterijski patogen. Odabir graničnih vrijednosti zatim se temelji na više čimbenika, uključujući analizu



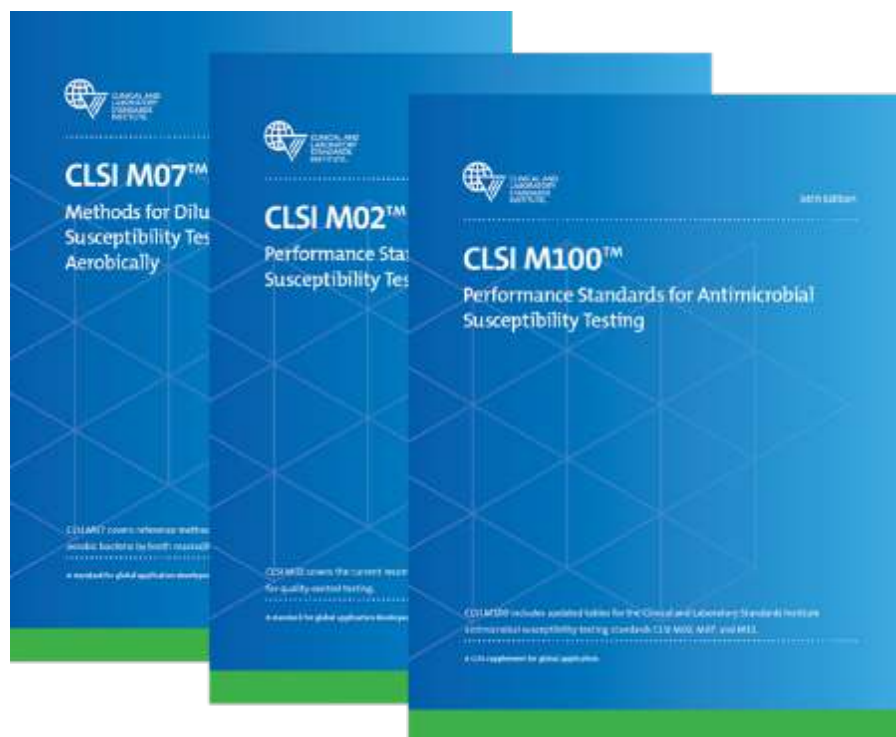
regresijskih linija koja korelira MIK s promjerima zone inhibicije, distribucijom bakterijske populacije, ograničenjem stope pogreške, farmakokinetikom i, u konačnici, kliničkom provjerom.

Koncept „mikrobioloških graničnih vrijednosti“ ili „epidemioloških graničnih vrijednosti“, koji se temelji na populacijskoj distribuciji specifičnih testiranih bakterijskih vrsta, može biti prikladniji za neke programe nadzora antimikrobnih lijekova. U tom slučaju, bakterijski izolati koji odstupaju od normalne populacije osjetljive na divlji tip bili bi označeni kao rezistentni, a mogle bi se pratiti promjene u osjetljivosti za specifičnu kombinaciju antimikrobnih sredstava/bakterija (Kahlmeter i sur., 2006.; Turnidge i sur., 2006.). Značajna prednost bilježenja kvantitativnih podataka o osjetljivosti jest ta što se takvi podaci mogu analizirati prema kliničkim graničnim vrijednostima i epidemiološkim graničnim vrijednostima.

2.2.7 Smjernice za testiranje osjetljivosti na antimikrobne lijekove

Trenutno je diljem svijeta dostupan niz standarda i smjernica za testiranje osjetljivosti na antimikrobne tvari i naknadne kriterije interpretacije (CLSI, 2008.; Kahlmeter i sur., 2006.). Između ostalog, to uključuje standarde i smjernice koje su objavili:

- Britansko društvo za antimikrobnu kemoterapiju (BSAC, UK).
- Institut za kliničke laboratorije i standarde (CLSI, SAD).
- Comité de l'Antibiogramme de la Société française de Microbiologie (CASFM, Francuska).
- Komisija richtlijnen gevoeligheidsbepalingen (CRG, Nizozemska).
- Njemački Institut krzno Normung (DIN, Njemačka).
- Europski odbor za testiranje osjetljivosti na antimikrobne lijekove (EUCAST).
- Japansko društvo za kemoterapiju (JSC, Japan), Švedska referentna skupina za antibiotike (SRGA, Švedska).



Slika 2. 18za kliničke i laboratorijske standarde objavljuje objavu novih dokumenata za testiranje osjetljivosti na antimikrobne lijekove CLSI M100-Ed34, M02-Ed14 i M07-Ed12 (URL 18).

Trenutno je samo CLSI (ranije NCCLS) razvio protokole za testiranje osjetljivosti bakterija životinjskog podrijetla i za određivanje kriterija interpretacije (CLSI, 2008.). Međutim, protokoli i smjernice dostupni su i od raznih organizacija za standardizaciju i strukovnih društava, uključujući ona gore spomenuta, za testiranje osjetljivosti sličnih bakterijskih vrsta koje uzrokuju infekcije kod ljudi. Moguće je da se ove smjernice mogu prilagoditi za testiranje osjetljivosti bakterija iz životinja, ali svaka zemlja mora procijeniti vlastite AST standarde i smjernice. Osim toga, u tijeku su naponi usmjereni na standardizaciju i usklađivanje graničnih vrijednosti osjetljivosti/otpornosti na međunarodnoj razini. Ti su naponi prvenstveno usmjereni na usvajanje CLSI i EUCAST standarda, koji laboratorijima pružaju metode i vrijednosti kontrole kvalitete kako bi se omogućila usporedba AST metoda i generiranih podataka (CLSI, 2008.; Kahlmeter i sur., 2006.). Za članice OIE-a bez standardiziranih AST metoda, usvajanje bilo kojeg od ovih skupova standarda bio bi prikladan prvi korak prema prihvatljivim metodama i usklađivanju.

Mnoge bakterije koje uzrokuju bolesti kod vodenih životinja zahtijevaju specifične uvjete rasta, poput nižih temperatura ili dodataka prehrani ili polukrutih medija, koji se mogu značajno razlikovati od onih kod kopnenih bakterijskih patogena. To je dovelo do razvoja metoda antimikrobnog testiranja prilagođenih bakterijama izoliranim iz vodenih vrsta. Za metode povezane s disk difuzijom ili razrjeđivanjem juhe za testiranje antimikrobne



osjetljivosti bakterija iz vodenih životinja, dva CLSI dokumenta pružaju smjernice (CLSI, 2006a; 2006b). Osim toga, dokument CLSI M45-A nudi metode za testiranje rijetko izoliranih ili zahtjevnih bakterija, poput *Campylobacteria* i *Pasteurelle* (CLSI, 2006c).

Kao prvi korak prema osiguravanju usporedivosti podataka o praćenju i nadzoru, važno je poticati usklađen i standardiziran dizajn programa među članicama (Brown i MacGowan , 2010.; Kahlmeter i sur., 2006.; White i sur., 2001.). Podaci iz zemalja koje koriste različite metode i dizajne programa možda neće biti izravno usporedivi (Brown i MacGowan , 2010.). Međutim, dugoročni podaci iz jedne zemlje i dalje mogu pomoći u prepoznavanju trendova u antimikrobnoj rezistenciji ili osjetljivosti (Petersen i sur., 2003.). Ako se rezultati različitih AST metoda prikazuju jedan pored drugoga, ključno je pokazati njihovu usporedivost i postići konsenzus o tumačenju. To se najbolje postiže korištenjem točnih, pouzdanih AST metoda i praćenjem AST performansi s dobro karakteriziranim referentnim mikroorganizmima u svim laboratorijima koji sudjeluju.

2.2.8 Usporedivost rezultata

Kako bi se procijenila usporedivost rezultata iz različitih sustava nadzora, bitno je da se nalazi kvantitativno izvijeste, uključujući detalje o učinkovitosti metode, referentnim organizmima i antimikrobnim sredstvima. Podaci testiranja antimikrobne osjetljivosti (AST) trebali bi se sastojati od kumulativnog, kontinuiranog sažetka obrazaca osjetljivosti (antibiograma) za klinički relevantne i nadzorne mikroorganizme (CLSI, 2009.). Ovi se podaci moraju stvarati, bilježiti i periodički analizirati u redovitim intervalima. Kako bi se osigurala jasnoća i dosljednost, podaci bi trebali biti prikazani na način koji omogućuje identifikaciju novih obrazaca otpornosti i provjeru ili opovrgavanje atipičnih nalaza. Ove informacije treba pohraniti u središnju bazu podataka i objavljivati godišnje. Kumulativni AST podaci bit će ključni u praćenju trendova osjetljivosti i otpornosti tijekom vremena unutar regije, kao i u procjeni učinkovitosti intervencija usmjerenih na smanjenje antimikrobne otpornosti.



2.2.9 Kontrola kvalitete (QC) i osiguranje kvalitete (QA)

Upravljanje kvalitetom u veterinarskim ispitnim laboratorijima, u laboratorijima koji provode AST (Hendriksen i sur., 2009.):

- Kontrola kvalitete odnosi se na operativne tehnike koje se koriste za osiguranje točnosti i ponovljivosti AST-a.
- Osiguranje kvalitete uključuje, ali nije ograničeno na, praćenje, vođenje evidencije, evaluaciju, poduzimanje potencijalnih korektivnih radnji ako je potrebno, kalibraciju i održavanje opreme, ispitivanje osposobljenosti, obuku i kontrolu kvalitete. Program osiguranja kvalitete pomaže u osiguravanju da materijali i procesi testiranja pružaju dosljedne rezultate kvalitete.

Sljedeće komponente treba odrediti i pratiti:

- Preciznost AST postupka.
- Točnost AST postupka.
- Kvalifikacije, kompetencije i stručnost laboratorijskog osoblja, kao i osoblja koje interpretira rezultate i onih koji su uključeni u praćenje antimikrobne rezistencije.
- Učinkovitost odgovarajućih reagensa.

Treba poštovati sljedeće zahtjeve:

- Strogo pridržavanje specificiranih i dokumentiranih tehnika u kombinaciji s kontrolom kvalitete (tj. osiguranjem performansi i drugih kritičnih kriterija) medija i reagensa.
- Vođenje evidencije o: brojevima serija svih odgovarajućih materijala i reagensa,
- Datumi isteka svih odgovarajućih materijala i reagensa, kalibracija i praćenje opreme, kritične specifikacije za AST performanse (referentni rezultati, vrijeme, temperatura itd.).
- Odgovarajući referentni mikroorganizam(i) treba uvijek koristiti bez obzira na primijenjenu AST metodu.
- Referentne mikroorganizme treba nabaviti iz pouzdanog izvora, na primjer iz Američke kolekcije tipskih kultura (ATCC®), pouzdanih komercijalnih izvora ili institucija s dokazanom pouzdanošću u pravilnom skladištenju i korištenju organizama.



- Referentni mikroorganizmi trebaju biti katalogizirani i dobro karakterizirani , uključujući stabilno definirane fenotipove osjetljivosti na antimikrobne tvari. Zapisi o tim referentnim organizmima trebaju uključivati utvrđene raspone otpornosti i osjetljivosti antimikrobnih tvari koje treba analizirati i referencu na metodu(e) kojom(ima) su određeni.
- Laboratoriji uključeni u AST trebaju koristiti odgovarajuće referentne mikroorganizme u svim AST testiranjima.
- Referentne sojeve treba čuvati kao matične kulture iz kojih su izvedene radne kulture i treba ih nabaviti iz nacionalnih ili međunarodnih zbirki kultura. Referentne bakterijske sojeve treba čuvati u određenim centraliziranim ili regionalnim laboratorijima. Radne kulture ne smiju se subkultivirati iz dana u dan jer to uvodi kontaminaciju, a metoda proizvodnje radnih kultura trebala bi osigurati da se matične kulture rijetko koriste. To se može postići proizvodnjom međuzalihe kultura dobivenih iz izvornih kultura koje se koriste za stvaranje svakodnevnih radnih kultura.
- Poželjna metoda za analizu ukupne učinkovitosti svakog laboratorija trebala bi testirati radnu zalihi odgovarajućih referentnih mikroorganizama svaki dan kada se provode testovi osjetljivosti.

Budući da to nije uvijek praktično ili ekonomično, učestalost takvih ispitivanja može se smanjiti ako laboratorij može dokazati da su rezultati ispitivanja referentnih mikroorganizama odabranom metodom reproducibilni. Ako laboratorij može dokumentirati reproducibilnost korištenih metoda ispitivanja osjetljivosti, ispitivanje se može provoditi tjedno. Ako se pojave zabrinutosti u vezi s točnošću, reproducibilnošću ili valjanošću metode, laboratorij ima odgovornost utvrditi uzrok(e) i ponoviti ispitivanja koristeći referentne materijale. Ovisno o uzroku(ima), može se ponovno pokrenuti dnevna upotreba referentnog materijala i bilo koje druge korektivne mjere.

- Referentne mikroorganizme treba testirati svaki put kada se koristi nova serija medija ili serija ploče i redovito paralelno s mikroorganizmima koji se analiziraju.
- Prilikom dobivanja i distribuiranja mikroorganizama u laboratorije sudionike treba se pozabaviti odgovarajućim pitanjima biosigurnosti.

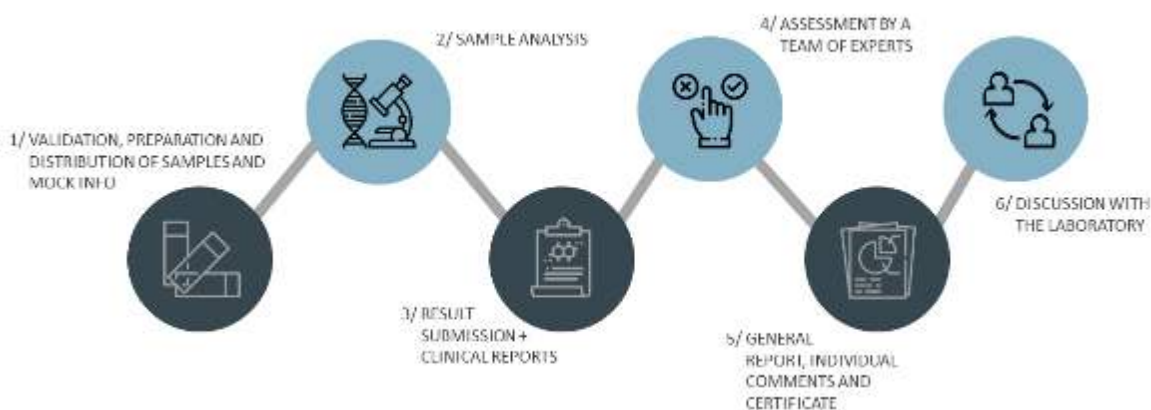


2.2.10 Vanjsko ispitivanje osposobljenosti

Laboratoriji se također potiču na sudjelovanje u međunarodnim međulaboratorijskim usporedbama (npr. Sustav vanjskog osiguranja kvalitete SZO-a). Treba uključiti sve bakterijske vrste podvrgnute AST-u.

Nacionalni referentni laboratoriji trebali bi biti odgovorni za:

- Praćenje programa osiguranja kvalitete laboratorija koji sudjeluju u nadzoru i praćenju antimikrobne rezistencije.
- Karakterizacija i isporuka skupa referentnih mikroorganizama tim laboratorijima.
- Izrada, upravljanje i distribucija uzoraka koji će se koristiti u vanjskom ispitivanju osposobljenosti.
- Izrada središnje baze podataka dostupne na internetu (npr. Europski sustav za nadzor antimikrobne rezistencije, EARSS) koja sadrži različite profile osjetljivosti/rezistencije za svaku bakterijsku vrstu pod nadzorom.



Slika 2. 19procjena kvalitete (URL 19).

Zaključak

Iako postoji nekoliko metoda, primarni cilj *in vitro* testiranja osjetljivosti na antimikrobne lijekove (AST) ostaje isti: pružiti pouzdano predviđanje o tome kako će mikroorganizam vjerojatno reagirati na antimikrobnu terapiju u zaraženom domaćinu (Svjetska organizacija za zdravlje životinja, 2010.). Ove informacije pomažu kliničarima u odabiru odgovarajućeg antimikrobnog



sredstva, podržavaju napore nadzora i doprinose razvoju politika upravljanja antimikrobnim sredstvima. *In vitro* AST se može provesti korištenjem različitih tehnika, uključujući difuziju diska, razrjeđivanje agara, makrodiluciju bujona, mikrodiluciju bujona i testove gradijenta koncentracije. Svaka od ovih metoda zahtijeva specifične uvjete testiranja kao što su medij, vrijeme inkubacije i identifikacija organizama za kontrolu kvalitete s njihovim odgovarajućim rasponima kontrole kvalitete. Osiguravanje ponovljivosti i usporedivosti AST rezultata s onima dobivenim priznatom referentnom metodom „zlatnog standarda“ je ključno. Bez standardiziranih metoda ili referentnih postupaka, rezultati osjetljivosti/otpornosti na antimikrobne lijekove iz različitih laboratorija ne mogu se pouzdano usporediti. Promiče se upotreba genotipskih pristupa za otkrivanje gena otpornosti na antimikrobne lijekove kako bi se povećala brzina i točnost testiranja osjetljivosti. Osim toga, napredak u molekularnim tehnikama, poput mikročipova, može omogućiti brz i isplativ probir za širok raspon gena antimikrobne rezistencije, pružajući vrijedne podatke za programe nadzora i praćenja (Ojha i Kostrzynska, 2008.; Poxton, 2005.). Unatoč tim inovacijama, standardizirane fenotipske AST metode i dalje će biti potrebne u bliskoj budućnosti za otkrivanje novih mehanizama rezistencije među bakterijskim patogenima.

2.3 Literatura

Brown, DFJ i MacGowan, AP (2010). Harmonizacija graničnih vrijednosti testiranja antimikrobne osjetljivosti u Europi: Implikacije za izvještavanje o srednjoj osjetljivosti. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(2), 183–185.

Cai, HY, Archambault, M., Gyles, CL i Prescott, JF (2003). Molekularno-genetske metode u veterinarskom kliničkom bakteriološkom laboratoriju: Trenutna upotreba i buduće primjene. *Animal Health Research Reviews*, 4(2), 73–93.

Chen, S., Zhao, S., McDermott, PF, Schroeder, CM, White, DG i Meng, J. (2005). DNA mikročip za identifikaciju gena virulencije i antimikrobne rezistencije u serovarovima *Salmonella* i *Escherichia coli*. *Molecular and Cellular Probes*, 19(3), 195–201.

Institut za kliničke i laboratorijske standarde (CLSI). (2006a). Dokument M42-A: Metode za testiranje osjetljivosti bakterija izoliranih iz vodenih životinja na antimikrobnim diskovima; Odobrene smjernice. Wayne, PA: CLSI.

Institut za kliničke i laboratorijske standarde (CLSI). (2006b). Dokument M49-A: Metode za ispitivanje osjetljivosti bakterija izoliranih iz vodenih životinja na razrjeđivanje juhe; Odobrene smjernice. Wayne, PA: CLSI.

Institut za kliničke i laboratorijske standarde (CLSI). (2006c). Dokument M45-A: Metode za antimikrobno razrjeđivanje i osjetljivost diskova rijetko izoliranih ili zahtjevnih bakterija; Odobrene smjernice. Wayne, PA: CLSI.



Institut za kliničke i laboratorijske standarde (CLSI). (2008.). Dokument M31-A3: Standardi učinkovitosti za antimikrobne diskove i testove osjetljivosti na razrjeđivanje za bakterije izolirane iz životinja; Odobreni standard (3. izd.). Wayne, PA: CLSI.

Institut za kliničke i laboratorijske standarde (CLSI). (2009). Dokument M39-A3: Analiza i prikaz kumulativnih podataka ispitivanja antimikrobne osjetljivosti; Odobrene smjernice (3. izd.). Wayne, PA: CLSI.

Dehaumont, P. (2004). Međunarodni standardi OIE-a o antimikrobnoj rezistenciji. Časopis za veterinarsku medicinu, serija B, 51(8–9), 411–414.

De Jong, A., Bywater, R., Butty, P., Deroover, E., Godinho, K., Klein, U., Marion, H., Simjee, S., Smets, K., Thomas, V., Valle, M. i Wheadon, A. (2009). Paneuropsko istraživanje antimikrobne osjetljivosti na antimikrobne lijekove za ljudsku upotrebu među zoonotskim i komezalnim enteričnim bakterijama izoliranim iz zdravih životinja za proizvodnju hrane. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63(4), 733–744.

Frye, JG, Lindsey, RL, Rondeau, G., Porwollik, S., Long, G., McClelland, M., Jackson, CR, Englen, MD, Meinersmann, RJ, Berrang, ME, Davis, JA, Barrett, JB, Turpin, JB, Thitaram, SN i Fedorka-Cray, PJ (2010). Razvoj DNA mikročipa za otkrivanje gena otpornosti na antimikrobne lijekove identificiranih u bazi podataka Nacionalnog centra za biotehnološke informacije. *Mikrobna otpornost na lijekove*, 16(1), 9–19.

Ge, B., Bodeis, S., Walker, RD, White, DG, Zhao, S., McDermott, PF i Meng, J. (2002). Usporedba Etesta i razrjeđenja agara za in vitro testiranje antimikrobne osjetljivosti *Campylobacter*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50(3), 487–493.

Hendriksen, RS, Seyfarth, AM, Jensen, AB, Whichard, J., Karlsmose, S., Joyce, K., Mikoleit, M., DeLong, SM, Weill, FX, Aïdara-Kane, A., Lo Fo Wong, DM, Angulo, FJ, Wegener, HC i Aarestrup, FM (2009). Rezultati vanjskog sustava osiguranja kvalitete WHO Global Salm-Surv za testiranje osjetljivosti izolata *Salmonella* na antimikrobne lijekove od 2000. do 2007. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(1), 79–85.

Kahlmeter, G., Brown, DF, Goldstein, FW, Macgowan, AP, Mouton, JW, Odenholt, I., Rodloff, A., Soussy, CJ, Steinbakk, M., Soriano, F. i Stetsiouk, O. (2006). Tehničke bilješke Europskog odbora za testiranje antimikrobne osjetljivosti (EUCAST) o testiranju antimikrobne osjetljivosti. *Klinička mikrobiologija i infekcija*, 12(6), 501–503.

Martínez, JL (2009). Zagađenje okoliša antibioticima i determinantama otpornosti na antibiotike. *Environmental Pollution*, 157(11), 2893–2902.

O'Neill, J. (2016). Globalno suzbijanje infekcija otpornih na lijekove: Završno izvješće i preporuke. Pregled antimikrobne rezistencije.

Ojha, S. i Kostrzynska, M. (2008). Ispitivanje životinjskih i zoonotskih patogena korištenjem mikročipova. *Veterinarska istraživanja*, 39(4), 26.

Perreten, V., Vorlet-Fawer, L., Slickers, P., Ehrlich, R., Kuhnert, P. i Frey, J. (2005). Detekcija 90 gena otpornosti na antibiotike gram-pozitivnih bakterija pomoću mikročipa. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(5), 2291–2302.

Petersen, A., Aarestrup, FM, Hofshagen, M., Sipila, H., Franklin, A. i Gunnarsson, E. (2003). Harmonizacija testiranja osjetljivosti na antimikrobne lijekove među veterinarskim dijagnostičkim laboratorijima u pet nordijskih zemalja. *Microbial Drug Resistance*, 9(4), 381–388.



Poxton , IR (2005). Molekularne tehnike u dijagnozi i liječenju zaraznih bolesti: Imaju li ulogu u bakteriologiji? Medical Principles and Practice, 14 (Dodatak 1), 20–26.

Rathe, M., Kristensen, L., Ellermann -Eriksen, S., Thomsen, MK i Schumacher, H. (2009). Enterococcus spp. otporan na vankomicin: Validacija testiranja osjetljivosti i in vitro aktivnosti vankomicina, linezolida, tigeciklina i daptomicina. APMIS, 118(1), 66–73.

Robinson, TP, Bu, DP, Carrique -Mas, J., Fevre , EM, Gilbert, M., Grace, D., Hay, SI, Jiwakanon , J., Kakkar , M., Kariuki, S., Laxminarayan , R., Lubroth , J., Magnusson, U., Thi Ngoc, P., Van Boeckel , TP i Woolhouse . SVIBANJ (2016). Otpornost na antibiotike je ključno pitanje politike Jednog zdravlja. Transakcije Kraljevskog društva za tropsku medicinu i higijenu, 110(7), 377–380.

Seiler, C. i Berendonk, TU (2012). Koselekcija otpornosti na antibiotike uzrokovana teškim metalima u tlu i vodenim tijelima pod utjecajem poljoprivrede i akvakulture. Frontiers in Microbiology, 3, 399.

Stepanović , S., Hauschild , T., Dakić , I., Al- Doori , Z., Švabić-Vlahović , M., Ranin , L. i Morrison, D. (2006). Evaluacija fenotipskih i molekularnih metoda za otkrivanje rezistencije na oksacilin u članova skupine Staphylococcus sciuri . Journal of Clinical Microbiology, 44(3), 934–937.

Turnidge , J., Kahlmeter , G. i Kronvall , G. (2006). Statistička karakterizacija distribucija vrijednosti minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) divljeg tipa bakterija i određivanje epidemioloških graničnih vrijednosti. Clinical Microbiology and Infection, 12(5), 418–425.

Walker, RD (2007). Testiranje osjetljivosti na antimikrobne lijekove i interpretacija rezultata. U Giguere , S., Prescott, JF, Baggot, JD, Walker, RD i Dowling, PM (ur.), Antimikrobna terapija u veterinarskoj medicini (str. 39–54). Ames, IA: Blackwell Publishing.

White, DG, Acar , J., Anthony, F., Franklin, A., Gupta, R., Nicholls, T., Tamura, Y., Thompson, S., Threlfall, JE, Vose , D., Van Vuuren, M., Wegener, H. i Costarrica , L. (2001). Standardizacija i usklađivanje laboratorijskih metodologija za otkrivanje i kvantifikaciju antimikrobne rezistencije. Revue Scientifique et Technique, 20(3), 849–858.

Svjetska organizacija za zdravlje životinja (OIE). (2010.). Poglavlje 6.9. Odgovorna i razborita uporaba antimikrobnih sredstava u veterinarskoj medicini. U OIE-ovom kodeksu zdravlja kopnenih životinja (sv. 1). Pariz: OIE.

Zelazny , AM, Ferraro, MJ, Glennen , A., Hindler , JF, Mann, LM, Munro, S., Murray, PR, Reller , LB, Tenover , FC i Jorgensen, JH (2005). Odabir sojeva za procjenu kvalitete metode disk indukcije za otkrivanje inducibilne rezistencije na klindamicin u stafilokokima: CLSI suradnička studija. Journal of Clinical Microbiology, 43(6), 2613–2615.



Reference na slike

- URL 1: <https://microbenotes.com/antimicrobial-susceptibility-testing-ast-types-and-limitations/>
- URL 2: <https://www.reactgroup.org/toolbox/understand/antibiotic-resistance/mutation-and-selection/>
- URL 3: <https://www.jove.com/v/10509/pure-cultures-and-streak-plating-isolation-of-bacterial-colonies>
- URL 4: <https://www.the-scientist.com/exploring-the-landscape-of-bacterial-culture-media-72052>
- URL 5: <https://sciencephotogallery.com/featured/bacterial-growth-on-culture-media-daniela-beckmann.html?product=poster>
- URL 6: <https://www.mdpi.com/2079-6382/11/4/427>
- URL 7: <https://microbeonline.com/antimicrobial-susceptibility-testing-procedure-modified-kirby-bauer-method/>
- URL 8: https://www.researchgate.net/figure/Schematic-protocol-for-the-determination-of-MIC-with-agar-dilution-and-broth-dilution_fig2_364118411
- URL 9: <https://microbeonline.com/minimum-inhibitory-concentration-mic-broth-dilution-method-procedure-interpretation/>
- URL 10: <https://shop.brand.de/en/brandplatesr-microtitration-plate-96-well-cellgradetm-plus-ps-f-bottom-bio-certr-cell-culture-quality-sterile-p462.html>
- URL 11: https://www.researchgate.net/figure/Scheme-of-the-agar-dilution-method-Created-with-BioRendercom-Reproduction-of-this_fig3_344400025
- URL 12: <https://www.rapidmicrobiology.com/news/fda-cleared-lifofilchem-mts-mic-test-strip-azithromycin-azm>
- URL 13: <https://www.khanacademy.org/test-prep/mcat/biological-sciences-practice/x04f6bc56:mcats-bio-biochem-foundation-2-passages/e/clindamycin-resistance-in-staphylococcus-aureus>
- URL 14: <https://microbeonline.com/inducible-clindamycin-resistance-d-test-principle-procedure-and-interpretation/>
- URL 15: <https://www.scrip.org/journal/paperidment?paperid=92599>
- URL 16: <https://old-ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-3-genetics/35-genetic-modification-and/pcr.html>
- URL 17: https://www.researchgate.net/figure/Detecting-antibiotic-genes-in-natural-samples-A-PCR-based-approach-DNA-is-extracted_fig1_41623404
- URL 18: <https://clsi.org/about/press-releases/the-clinical-and-laboratory-standards-institute-announces-the-publication-of-new-antimicrobial-susceptibility-testing-documents-clsi-m100-ed34-m02-ed14-and-m07-ed12/>
- URL 19: <https://eqascheme.org/>



POGLAVLJE 3. DOBIVANJE PRIRODNIH PROIZVODA S NAGLASKOM NA OČUVANJE AKTIVNIH PRINCIPA

3.1 Uvod

Prirodni proizvodi tisućljećima su igrali središnju ulogu u ljudskoj kulturi i preživljavanju, služeći kao izvori hrane, lijekova, bojila i konzervansa. Danas su i dalje nezamjenjivi kao sirovine za farmaceutske proizvode, nutraceutike, kozmetiku i funkcionalnu hranu. Jedna biljka može sadržavati stotine kemijskih sastojaka, od hranjivih tvari vitalnih za ljudsko zdravlje do spojeva s farmakološkom aktivnošću ili čak toksičnim svojstvima. Raznolikost ovih kemijskih klasa i sinergijske interakcije među njima čine osnovu i korisnih i potencijalno štetnih učinaka prirodnih proizvoda na ljudsko zdravlje.

Općenito, tvari prisutne u prirodnim proizvodima mogu se podijeliti u šest kategorija: (1) hranjive tvari, (2) antinutrijenti, (3) nenutrijenti, (4) novonastale tvari (nastale, na primjer, tijekom obrade ili skladištenja), (5) kontaminanti i (6) dodane tvari poput aditiva. Svaka kategorija ima različite implikacije na sigurnost, kvalitetu i funkcionalnost proizvoda biljnog podrijetla.

Sami hranjivi sastojci obično se dijele na makronutrijente - ugljikohidrate, proteine i masti - i mikronutrijente poput vitamina i minerala. Iako su oni bitni za metaboličke procese i cjelokupno zdravlje, na njihovu prisutnost i bioraspoloživost u prirodnim izvorima mogu utjecati drugi spojevi. Na primjer, antinutritivne tvari ometaju apsorpciju ili metabolizam hranjivih tvari. Oksalna kiselina ($H_2C_2O_4$), koja se obično nalazi u špinatu, blitvi i rabarbari, ometa apsorpciju kalcija i željeza te u velikim količinama može predstavljati rizik od stvaranja bubrežnih kamenaca. Avidin, protein u sirovim bjelancima, snažno se veže za biotin (vitamin B8), smanjujući njegovu dostupnost. Slično tome, izotiocijanati u krstašicama mogu ometati unos joda, što potencijalno može dovesti do gušavosti. Ovi primjeri ističu dvojaku prirodu prirodnih proizvoda, gdje spojevi s zdravstvenim prednostima također mogu predstavljati nutritivne rizike ako se konzumiraju u neprimjerenim količinama.

Osim hranjivih tvari i antinutrijenata, biljke također sadrže širok raspon nenutritivnih tvari - spojeva koji nisu potrebni za ljudsku prehranu, ali često imaju značajne biološke učinke. Dijetalna vlakna poput celuloze i pektina reguliraju zdravlje crijeva i snižavaju kolesterol; metilksantini poput kofeina djeluju kao stimulansi; spojevi koji sadrže sumpor u češnjaku pružaju antimikrobna i kardioprotektivna svojstva; a fitokemikalije poput polifenola, terpena i alkaloida doprinose antioksidativnim, protuupalnim i antikancerogenim svojstvima. Ovo



područje, ponekad nazivano nutritivnom farmakologijom, naglašava tanku granicu između hrane i medicine.

U tom kontekstu, koncept fitokompleksa postao je sve važniji. Fitokompleks se odnosi na cijeli spektar prirodnih sastojaka prisutnih u biljnom ekstraktu - aktivne principe zajedno s potpornim spojevima poput flavonoida, tanina, smola i eteričnih ulja - koji zajedno određuju terapijski učinak. Za razliku od izoliranih sintetskih lijekova, učinkovitost biljnih lijekova često proizlazi iz sinergijskog djelovanja ovih višestrukih komponenti, a ne iz jednog aktivnog sastojka. Međutim, ova složenost predstavlja značajne izazove za standardizaciju, kontrolu kvalitete i očuvanje bioaktivnosti tijekom obrade.

Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) istaknula je važnost strogih standarda u pripremi biljnih lijekova. To uključuje ispravnu identifikaciju izvorne biljke, odabir optimalnog vremena berbe, odgovarajuće rukovanje nakon berbe i razmatranje čimbenika poput pribora za kuhanje ili tehnika obrade koje mogu promijeniti kemijski profil biljnih sastojaka. Prirodni lijekovi mogu se dobiti različitim pristupima: berbom divljih vrsta, uzgojem ljekovitog bilja, fermentacijom, mikrobnom transformacijom, pa čak i naprednim tehnikama poput kulture biljnih stanica ili organa. Svaki pristup utječe na prinos, čistoću i ponovljivost aktivnih sastojaka, što čini odabir izvora i strategiju berbe ključnima za maksimiziranje fitokemijskog sadržaja.

Glavni izazov u radu s prirodnim proizvodima je ekstrakcija i očuvanje aktivnih sastojaka. Ekstrakcija predstavlja prvi ključni korak u odvajanju bioaktivnih sastojaka od sirovog biljnog materijala. Tradicionalne metode uključuju maceraciju, perkolaciju i ekstrakciju refluksom, obično korištenjem velikih količina organskih otapala i zahtijevajući dugo vrijeme obrade. Proces općenito napreduje kroz četiri koraka: (1) prodiranje otapala u biljnu matricu, (2) otapanje otopljene tvari u otapalu, (3) difuzija otopljene tvari iz matrice i (4) sakupljanje ekstrakta. Učinkovitost ovisi o nekoliko čimbenika: polaritetu otapala, veličini čestica sirovine, omjeru otapala i krutine, temperaturi i trajanju ekstrakcije. Izbor otapala posebno je važan jer mora uravnotežiti selektivnost, topljivost, troškove i sigurnosne aspekte.

Konvencionalne metode, iako široko primjenjivane, sve se više nadopunjuju ili zamjenjuju modernim i zelenim tehnologijama ekstrakcije. To uključuje ekstrakciju superkritičnim fluidom (SFE), koja koristi superkritični CO₂ za dobivanje ekstrakata visoke čistoće i minimalnih ostataka otapala; ekstrakciju tekućinom pod tlakom (PLE), koja smanjuje potrošnju otapala i vrijeme obrade; i ekstrakciju uz pomoć mikrovalova (MAE), koja poboljšava učinkovitost brzim zagrijavanjem i poboljšanim prijenosom mase. Takvi pristupi ne samo da povećavaju prinos i

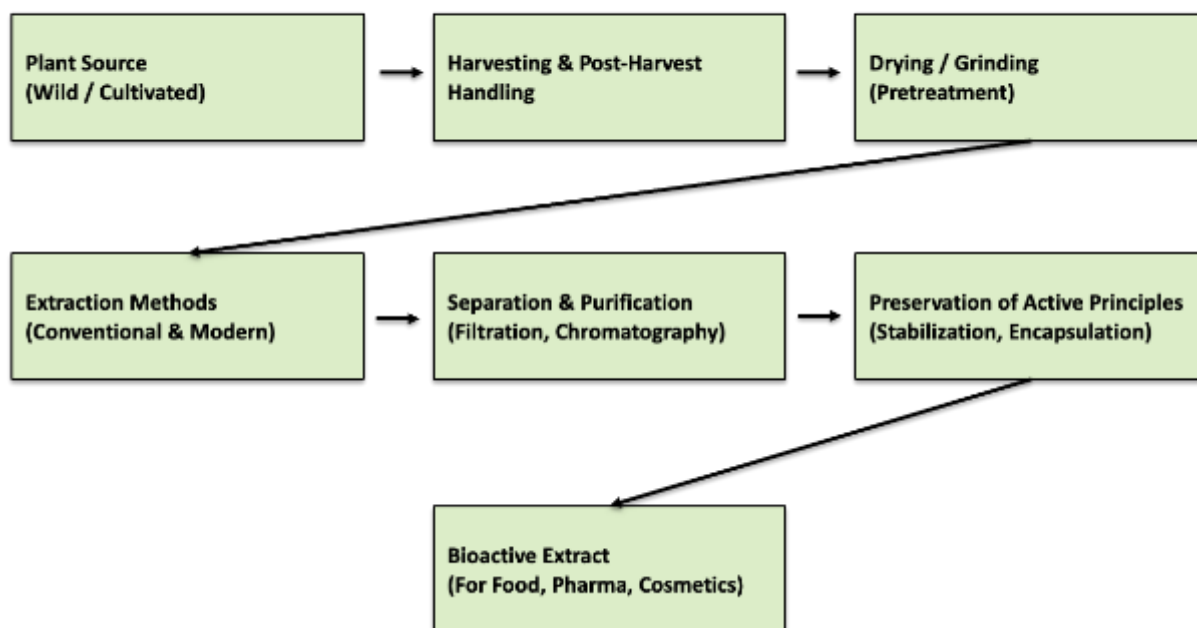


selektivnost, već i smanjuju razgradnju termolabilnih spojeva, čime se bolje čuva integritet aktivnih sastojaka (Zhang i sur., 2018.).

Očuvanje aktivnih spojeva kroz sve faze - od rasta biljaka i berbe do ekstrakcije i formulacije - ključno je za osiguranje učinkovitosti i sigurnosti prirodnih proizvoda. Mnoge bioaktivne molekule osjetljive su na toplinu, svjetlost, kisik ili promjene pH vrijednosti, a neprimjerena obrada može rezultirati njihovom degradacijom ili transformacijom u manje aktivne ili čak štetne derivate. Iz tog razloga, nedavna istraživanja naglašavaju razvoj selektivnih i blagih metoda ekstrakcije, kao i tehnika stabilizacije poput enkapsulacije, liofilizacije i nanoformulacije

Ukratko, prirodni proizvodi predstavljaju golem rezervoar bioaktivnih spojeva s ogromnim potencijalom u zdravstvu i industriji. Međutim, ostvarenje tog potencijala zahtijeva pažljivu ravnotežu između tradicionalnog znanja i modernih znanstvenih inovacija. Ovo poglavlje usredotočuje se na metodologije za dobivanje prirodnih proizvoda, s posebnim naglaskom na očuvanje aktivnih sastojaka tijekom uzgoja, berbe, ekstrakcije i prerade. Istraživanjem konvencionalnih i naprednih pristupa, rasprava ističe strategije za maksimiziranje prinosa, održavanje bioaktivnosti i osiguranje sigurnosti i kvalitete prirodnih proizvoda za ljudsku upotrebu.

From Plant Material to Bioactive Extract



Slika 3.1 Shematski prikaz evolucije od biljnog materijala do bioaktivnog ekstrakta



3.2 Fitokompleks – sinergijski sklopovi bioaktivnih sastojaka

Ljekovito bilje odavno je prepoznato ne samo po svojim izoliranim bioaktivnim spojevima, već i po složenim mješavinama sastojaka koji zajedno doprinose terapijskim učincima. Ova kombinacija, poznata kao fitokompleks, predstavlja cijeli spektar prirodno prisutnih molekula u biljci ili ekstraktu. Za razliku od lijekova s jednim spojem, aktivnost fitokompleksa proizlazi iz dinamične interakcije primarnih i sekundarnih metabolita, uključujući alkaloide, flavonoide, tanine, terpenoide, eterična ulja, polisaharide i druge pomoćne tvari.

Koncept fitokompleksa naglašava da se terapijska učinkovitost biljnih lijekova ne može uvijek pripisati jednom glavnom aktivnom principu, već sinergijskim, a ponekad i antagonističkim interakcijama među više sastojaka. Te interakcije mogu povećati bioraspoloživost, smanjiti toksičnost ili proširiti spektar djelovanja. Razumijevanje i očuvanje ove složenosti ključno je za modernu fitoterapiju, razvoj nutraceutika i formuliranje funkcionalne hrane (Heinrich i sur., 2022.).

Kemijska raznolikost i strukturna organizacija fitokompleksa

Fitokompleksi se odlikuju kemijskom heterogenošću. Uključuju:

- Primarni metaboliti poput ugljikohidrata, proteina i lipida, koji pružaju nutritivnu potporu i služe kao nosači ili stabilizatori za sekundarne metabolite.
- Sekundarni metaboliti, uključujući alkaloide, flavonoide, terpene, fenolne kiseline, saponine i spojeve koji sadrže sumpor, od kojih mnogi pokazuju specifična farmakološka djelovanja.
- Pomoćne tvari poput smola, voskova, eteričnih ulja, pigmenata i enzima, koje možda nemaju izravnu farmakološku aktivnost, ali mogu poboljšati topljivost, stabilnost ili organoleptička svojstva.

U fitokompleksu ovi spojevi nisu nasumično prisutni, već su često organizirani na način koji odražava obrambene mehanizme biljaka. Na primjer, polifenoli djeluju kao antioksidansi i antimikrobna sredstva, dok terpenoidi doprinose kemijskoj signalizaciji i ekološkim interakcijama. Ovaj prirodni raspored ključan je za cjelokupnu aktivnost biljke i ne može se ponoviti sintetskim smjesama izoliranih spojeva (Wink, 2015).

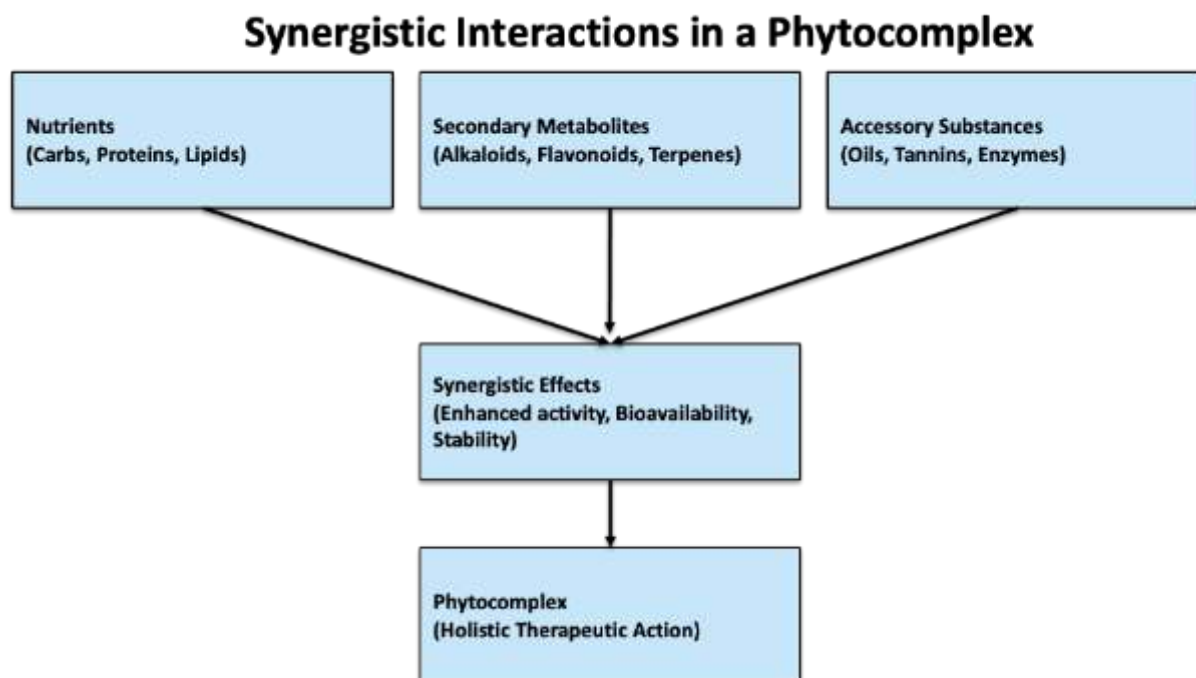
Sinergijski mehanizmi u fitokompleksima

Sinergija unutar fitokompleksa manifestira se na nekoliko načina:



- i) Farmakodinamička sinergija – više sastojaka može djelovati na različite ciljeve unutar biološkog sustava, proizvodeći širi ili pojačani učinak. Na primjer, antimikrobna aktivnost eteričnog ulja timijana je jača kada se timol i karvakrol kombiniraju nego kada se svaki koristi pojedinačno.
- ii) Farmakokinetička sinergija – određeni spojevi pojačavaju apsorpciju ili bioraspoloživost drugih. Klasičan primjer je piperin iz *Piper nigrum*, koji povećava bioraspoloživost kurkumina iz *Curcuma longa* inhibirajući njegovu metaboličku razgradnju (Shoba i sur., 1998.).
- iii) Detoksikacija i modulacija sigurnosti – sporedni spojevi mogu smanjiti toksičnost glavnih, omogućujući sigurniju primjenu. Na primjer, neki flavonoidi djeluju protiv oksidativnog stresa koji potencijalno izazivaju alkaloidi.
- iv) Stabilizacija aktivnih molekula – polisaharidi, tanini ili proteini mogu stabilizirati hlapljive spojeve ili osjetljive sekundarne metabolite, osiguravajući njihov integritet tijekom skladištenja i obrade.

Takvi sinergijski učinci naglašavaju zašto izolacija jedne aktivne molekule ne mora uvijek reproducirati terapijsku aktivnost cijelog ekstrakta (Ekor, 2014).



Slika 3.2 Shematski prikaz sinergističkih interakcija u fitokompleksu

Tehnološki izazovi u očuvanju fitokompleksa



Jedna od središnjih poteškoća u razvoju proizvoda na biljnoj bazi leži u održavanju integriteta fitokompleksa kroz faze berbe, prerade, ekstrakcije i skladištenja. Čimbenici koji utječu na stabilnost uključuju:

- i) Uvjeti žetve: Čimbenici okoliša poput svjetlosti, temperature i sastava tla utječu na fitokemijski profil biljke. Vrijeme žetve često određuje koncentraciju bioaktivnih sastojaka (Khoddami i sur., 2013.).
- ii) Rukovanje nakon žetve: Sušenje, mljevenje i uvjeti skladištenja mogu dovesti do razgradnje hlapljivih ulja, oksidacije polifenola i hidrolize glikozida.
- iii) Metode ekstrakcije: Konvencionalna ekstrakcija otapalima može izolirati određene spojeve, ali izgubiti hlapljive ili termolabilne sastojke. Moderne metode poput ekstrakcije superkritičnim fluidom (SFE), ekstrakcije uz pomoć mikrovalova (MAE) i ekstrakcije tekućinom pod tlakom (PLE) nude veću selektivnost i učinkovitost uz očuvanje osjetljivih molekula (Zhang i sur., 2018.).
- iv) Formulacija i stabilizacija: Tehnike enkapsulacije, liofilizacije i nanoformulacije sve se više koriste za zaštitu nestabilnih spojeva i isporuku fitokompleksa u funkcionalnim i bioraspoloživim oblicima (Patra i sur., 2021.).

Izazov za modernu fitokemiju je optimizirati tehnike ekstrakcije i konzerviranja uz zadržavanje holističkog integriteta fitokompleksa .

Primjena u medicini, prehrani i funkcionalnoj hrani

Fitokompleksi igraju značajnu ulogu u različitim područjima:

- Tradicionalna i moderna medicina: Biljni lijekovi poput ginsenga, ehinaceje i valerijane oslanjaju se na međudjelovanje više sastojaka za adaptogene, imunostimulirajuće ili sedativne učinke. Farmaceutske tvrtke sve više istražuju standardizirane ekstrakte kao alternative lijekovima s jednim spojem (Ekor, 2014).
- Funkcionalna hrana i nutraceutici: Ekstrakti bogati polifenolima iz grožđa, zelenog čaja i bobičastog voća prodaju se zbog antioksidativnih i kardioprotektivnih prednosti. Ti su učinci posljedica širokog raspona međudjelujućih spojeva, a ne jedne molekule antioksidansa.
- Kozmeceutici: Kompleksi biljnog podrijetla bogati flavonoidima, terpenima i uljima koriste se u formulacijama za proizvode protiv starenja, protuupalna i fotoprotektivna sredstva.



- Prehrana životinja i poljoprivreda: Fitokompleksi se ugrađuju u hranu kao prirodni stimulatori rasta i sredstva za sprječavanje bolesti, nudeći alternativu sintetičkim antibioticima.

Buduće perspektive

Proučavanje fitokompleksa brzo se razvija, potpomognuto napretkom u metabolomici, sistemskoj biologiji i bioinformatici. Ovi alati omogućuju mapiranje složenih interakcija između biljnih sastojaka i bioloških putova, pružajući dublji uvid u sinergijske mehanizme. Buduća istraživanja moraju se usredotočiti na:

- Razvoj standardiziranih analitičkih protokola za sveobuhvatnu karakterizaciju fitokompleksa.
- Dizajniranje tehnologija zelene ekstrakcije koje minimiziraju utjecaj na okoliš, a istovremeno maksimiziraju bioaktivnost.
- Istraživanje personalizirane fitoterapije, gdje se specifični fitokompleksi prilagođavaju individualnim metaboličkim i genetskim profilima.
- Integriranje regulatornih okvira koji prepoznaju jedinstvena svojstva fitokompleksa, razlikujući ih od izoliranih aktivnih spojeva.

Premošćivanjem tradicionalnog znanja s modernim analitičkim i tehnološkim napretkom, fitokompleksi se mogu učinkovitije iskoristiti kao održivi i sigurni resursi za zdravlje i dobrobit.

Metoda	Otapalo	Temperatura	Pritisak	Vrijeme	Volumen potrošeno g organsko g otapala	Polarnost ekstrahiranih prirodnih proizvoda
Maceracija	Voda, vodena i nevodena otapala	Sobna temperatura	Atmosferski	Dugo	Veliko	Ovisno o ekstrakciji otapalo
Cijeđenje	Voda, vodena i nevodena otapala	Sobna temperatura, povremeno pod toplinom	Atmosferski	Dugo	Veliko	Ovisno o ekstrakciji otapalo
Dekokt	Voda	Pod vrućinom	Atmosferski	Umjeren	Ništa	Polarni spojevi



Refluks izvlačenje	Vodena i nevodena otapala	Pod vrućinom	Atmosfers ki	Umjeren o	Umjereno	Ovisno o ekstrakciji otapalo
Soxhlet izvlačenje	Organski otapala	Pod vrućinom	Atmosfers ki	Dugo	Umjereno	Ovisno o ekstrakciji otapalo
Pod tlakom tekućina izvlačenje	Voda, vodena i nevodena otapala	Pod vrućinom	Visoko	Kratak	Mali	Ovisno o ekstrakciji otapalo
Superkritično tekućina izvlačenje	Superkritični fluid (obično S-CO ₂), ponekad s modifikatoro m	Blizu sobne temperature	Visoko	Kratak	Ništa ili malo	Nepolarni do umjereno polarni spojevi
Ultrazvuk potpomognut o izvlačenje	Voda, vodena i nevodena otapala	Sobna temperatura ili pod toplinom	Atmosfers ki	Kratak	Umjereno	Ovisno o ekstrakciji otapalo
Mikrovalna pećnica potpomognut o izvlačenje	Voda, vodena i nevodena otapala	Sobna temperatura	Atmosfers ki	Kratak	Ništa ili umjereno	Ovisno o ekstrakciji otapalo
Pulsirajući ekstrakcija električnog polja	Voda, vodena i nevodena otapala	Sobna temperatura ili pod toplinom	Atmosfers ki	Kratak	Umjereno	Ovisno o ekstrakciji otapalo
Enzim potpomognut o izvlačenje	Voda, vodena i nevodena otapala	Sobna temperatura ili zagrijavanje nakon tretmana enzimima	Atmosfers ki	Umjeren o	Umjereno	Ovisno o ekstrakciji otapalo
Hidrodestilaci ja i destilacija parom	Voda	Pod vrućinom	Atmosfers ki	Dugo	Ništa	Eterično ulje (obično nepolarno)



3.3 Smjernice WHO-a za kvalitetne standardizirane biljne formulacije

Biljni lijekovi predstavljaju jedan od najčešće primjenjivanih oblika zdravstvene zaštite u svijetu i ostaju primarna terapijska opcija za milijune ljudi, posebno u zemljama u razvoju (WHO, 2013.). Unatoč njihovoj dugoj povijesti upotrebe, sigurnost, učinkovitost i kvaliteta biljnih formulacija i dalje su zabrinjavajuće zbog varijabilnosti svojstvene prirodnim izvorima. Kao odgovor na to, Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) razvila je sveobuhvatne smjernice koje pružaju okvir za standardizaciju, osiguranje kvalitete i regulatornu kontrolu biljnih lijekova (WHO, 2007.). Ove smjernice naglašavaju da biljne formulacije trebaju zadovoljavati iste standarde sigurnosti, kvalitete i učinkovitosti kao i konvencionalni farmaceutski proizvodi, uz istovremeno priznavanje specifičnih izazova povezanih s materijalima na biljnoj bazi.

Smjernice WHO-a usredotočuju se na četiri temeljna parametra: kontrolu kvalitete sirovina i gotovih proizvoda, procjenu stabilnosti i roka trajanja, procjenu sigurnosti i procjenu učinkovitosti (Shinde i sur., 2009.). Svaki od ovih aspekata zahtijeva rigorozne postupke, od provjere autentičnosti sirovina do primjene naprednih analitičkih tehnika za procjenu konačnog proizvoda.

Kontrola kvalitete biljnih sirovina i gotovih proizvoda

Kontrola kvalitete botaničkih proizvoda započinje ispravnom identifikacijom biljne vrste. Pojedina biljka može se opisati uobičajenim engleskim nazivom, transliteriranim narodnim nazivom, latinskim farmaceutskim nazivom ili svojom punom znanstvenom botaničkom nomenklaturom (Bauer, 2018.). Pogrešna identifikacija ili zamjena jedan je od vodećih uzroka varijabilnosti, pa čak i toksičnosti biljnih proizvoda. Stoga autentifikacija uključuje kombinaciju makroskopskog pregleda, mikroskopske analize i sve više tehnika DNA barkodiranja (Raclariu i sur., 2017.).

Uvjeti okoliša poput vrste tla, količine oborina, nadmorske visine, izloženosti sunčevoj svjetlosti i sezone berbe snažno utječu na kemijski sastav biljaka. Na primjer, iste vrste sakupljene na različitim nadmorskim visinama mogu pokazati značajne varijacije u koncentraciji alkaloida ili flavonoida. Nadalje, različiti dijelovi iste biljke - korijenje, stabljike, lišće, cvjetovi ili sjemenke - sadrže različite profile sekundarnih metabolita, što dodatno komplicira zadatak standardizacije (Shinde i sur., 2009.).



Patvorenje, bilo slučajno ili namjerno, predstavlja još jedno kritično pitanje. Sirovine mogu biti kontaminirane drugim biljnim vrstama, teškim metalima, pesticidima ili mikrobnim toksinima. Iz tog razloga, smjernice WHO-a preporučuju slojeviti analitički pristup, kombinirajući kromatografske tehnike (HPLC, TLC, GC-MS), spektroskopske metode (NMR, IR, UV-Vis) i sve više metabolomiku i kemometriju kako bi se osigurali identitet, čistoća i ponovljivost proizvoda (Kunle i sur., 2012.).

Procjena stabilnosti i rok trajanja

Jedna od karakteristika biljnih formulacija je njihova kemijska složenost, što komplicira procjenu stabilnosti. Za razliku od lijekova s jednom molekulom, biljni proizvodi sadrže desetke ili čak stotine bioaktivnih i neaktivnih spojeva koji se s vremenom mogu razgraditi. Čimbenici poput temperature, vlažnosti, izloženosti svjetlosti i materijala za pakiranje utječu na stabilnost (Zhang i sur., 2018.).

Smjernice WHO-a naglašavaju da se rok trajanja mora utvrditi korištenjem validiranih protokola stabilnosti u uvjetima stvarnog vremena i ubrzanim uvjetima. Na primjer, gubitak hlapljivih ulja u pripravku eteričnog ulja ili oksidacija polifenola u biljnom infuzu može dovesti do značajnih promjena u terapijskoj učinkovitosti. Standardno testiranje stabilnosti uključuje fizičke (boja, miris, vlaga), kemijske (razgradnja marker spoja) i mikrobiološke procjene (odsutnost bakterijske ili gljivične kontaminacije). Inovacije pakiranja poput jantarnog stakla, blister pakiranja ili tehnika kapsuliranja preporučuju se za produljenje stabilnosti proizvoda uz očuvanje aktivnih sastojaka.

Procjena sigurnosti

Procjena sigurnosti biljnih formulacija ključna je komponenta smjernica WHO-a. Iako mnogi biljni lijekovi imaju dugu povijest upotrebe u tradicionalnoj medicini, sami povijesni dokazi ne jamče sigurnost (Williamson i sur., 2013.). Stoga su potrebne toksikološke studije, uključujući testove akutne, subkronične i kronične toksičnosti, genotoksičnosti, reproduktivne toksičnosti i karcinogenosti kada je to prikladno.

Posebna se pozornost posvećuje interakcijama biljaka i lijekova, budući da biljni sastojci mogu inducirati ili inhibirati enzime citokroma P450, mijenjati transportere lijekova ili modulirati imunološki odgovor. Na primjer, gospina trava (*Hypericum perforatum*) značajno smanjuje koncentracije određenih antiretrovirusnih i imunosupresivnih lijekova u plazmi, što naglašava potrebu za budnošću (Izzo i Ernst, 2009.).



Također je potrebna dokumentacija o nuspojavama i sustavna farmakovigilancija. WHO potiče nacionalne regulatorne agencije da uspostave centre za farmakovigilanciju biljnih proizvoda i da integriraju biljne proizvode u postojeće sustave za prijavu nuspojava.

Procjena učinkovitosti

Procjena učinkovitosti često je najizazovniji aspekt standardizacije bilja. Tradicionalno se učinkovitost zaključivala iz etnomedicinskog znanja, gdje stoljeća ljudskog iskustva pružaju osnovu za terapijske tvrdnje. Međutim, moderni regulatorni standardi zahtijevaju rigoroznu znanstvenu validaciju putem farmakoloških studija i kliničkih ispitivanja (Heinrich, 2015).

Procjene biološke aktivnosti obično uključuju in vitro testove (npr. antioksidanse, antimikrobna sredstva, inhibiciju enzima), in vivo životinjske modele i kontrolirana klinička ispitivanja gdje je to izvedivo. Marker spojevi, koji predstavljaju ili aktivne sastojke ili karakteristične kemijske otiske prstiju, često se koriste kao pokazatelji učinkovitosti proizvoda, iako je poznato da terapijsko djelovanje biljne formulacije obično proizlazi iz sinergije više sastojaka - fitokompleksnog učinka.

Analitičke metode i usklađivanje propisa

SZO naglašava potrebu za međunarodnim usklađivanjem analitičkih i regulatornih standarda kako bi se omogućila globalna trgovina i osigurala sigurnost potrošača. Izbor analitičke tehnike ovisi o cilju: mikroskopija za autentifikaciju sirovih lijekova, kromatografija za uzimanje otisaka prstiju i spektroskopija ili metabolomika za profiliranje složenih smjesa. Nedavni napredak u masenoj spektrometriji visoke rezolucije i spektroskopiji nuklearne magnetske rezonancije (NMR) omogućio je neviđene uvide u fitokemijsku raznolikost, poboljšavajući procjenu i sigurnosti i učinkovitosti (Li i sur., 2022.).

Unatoč tim napretcima, izazovi i dalje postoje zbog raznolikosti regulatornih okvira među regijama. Na primjer, biljni proizvodi mogu biti regulirani kao dodaci prehrani u Sjedinjenim Državama, tradicionalni biljni lijekovi u Europskoj uniji ili ajurvedski lijekovi u Indiji. Smjernice WHO-a služe kao usklađena referenca, potičući konvergenciju uz poštovanje kulturnih i regionalnih praksi.

Smjernice WHO-a za standardizirane biljne formulacije pružaju ključni okvir za osiguravanje da biljni lijekovi zadovoljavaju moderna očekivanja kvalitete, sigurnosti i učinkovitosti. Rješavajući složenost varijabilnosti biljaka, kemijske stabilnosti, toksikoloških rizika i izazova procjene učinkovitosti, ove smjernice uspostavljaju bitan most između tradicionalnog znanja i



suvremene znanstvene strogosti. Pridržavanje ovih načela ne samo da štiti javno zdravlje, već i povećava kredibilitet i globalno prihvaćanje biljne medicine.

3.4 Dodaci prehrani

Dodaci prehrani definiraju se kao koncentrirani izvori hranjivih tvari ili drugih bioaktivnih tvari s nutritivnim ili fiziološkim učinkom, obično se prodaju u doziranim oblicima kao što su kapsule, tablete, prašci i odmjerene tekućine (Europska komisija, 2002.). Ovi proizvodi premošćuju jaz između prehrane i medicine, nudeći dodatne izvore vitamina, minerala, aminokiselina, masnih kiselina, vlakana ili biljnih ekstrakata za podršku općem zdravlju i sprječavanje nedostataka.

Tijekom posljednja dva desetljeća, dodaci prehrani prešli su iz nišnih proizvoda u mainstream komponente tržišta zdravstvene zaštite potrošača. Ova promjena odražava šire društvene promjene, uključujući starenje stanovništva, porast kroničnih bolesti i sve veći naglasak na preventivnu zdravstvenu skrb. Odnos liječnika i pacijenta također se razvio, a pojedinci traže veću autonomiju u svojim izborima zdravstvene skrbi. Moderni potrošači su sve proaktivniji, tražeći smjernice o održavanju dobrobiti, umjesto da se oslanjaju isključivo na reaktivne tretmane.

Globalno tržište dodataka prehrani bilježi stalan rast. Primjerice, u Europi je tržište zabilježilo porast vrijednosti od 4,3%, što odgovara otprilike 3,5 milijardi eura i 256 milijuna prodanih pakiranja godišnje. Kategorije poput kardiovaskularnog zdravlja, regulacije crijevne mikrobiote i urogenitalnog zdravlja dominiraju potražnjom, dok formulacije specifične za spol i proizvodi specifični za dob za djecu i starije osobe predstavljaju rastuće niše.

Nutritivne i funkcionalne komponente dodataka prehrani

Dodaci prehrani obuhvaćaju raznolik niz tvari, koje se klasificiraju u:

Vitamini i minerali: Esencijalni mikronutrijenti koji podržavaju metaboličke funkcije, rast, imunitet i prevenciju bolesti.

Aminokiseline i proteini: Gradivni blokovi mišića i tkiva, sve popularniji u sportskoj prehrani i oporavku.

Esencijalne masne kiseline (EFA): Omega-3 i omega-6 masne kiseline, ključne za kardiovaskularno i kognitivno zdravlje.

Vlakna: Korisna za probavno zdravlje i kontrolu tjelesne težine.



Botanički i biljni ekstrakti: Proizvodi biljnog podrijetla poput ginsenga, ehinaceje, kurkume i zelenog čaja, često se prodaju zbog antioksidativnih, protuupalnih ili adaptogenih svojstava.

Probiotici i prebiotici: Živi mikroorganizmi i dijetalna vlakna koji potiču ravnotežu crijevne mikrobiote.

Međutim, bioraspoloživost ovih spojeva glavni je faktor njihove učinkovitosti. Hranjive tvari koje se slabo apsorbiraju ili brzo metaboliziraju ne pružaju terapijske ili nutritivne koristi. Razvijaju se napredne strategije formulacije, uključujući nanoenkapsulaciju, liposomsku dostavu i istodobnu primjenu s pojačivačima apsorpcije (npr. piperin s kurkuminom), kako bi se riješio ovaj izazov (McClements, 2020).

Problemi sigurnosti, kvalitete i lanca opskrbe

Unatoč svojoj popularnosti, dodaci prehrani suočavaju se s izazovima vezanim uz kontrolu kvalitete i transparentnost lanca opskrbe. Patvorenje, kontaminacija i varijabilnost sirovina ostaju goruća pitanja, posebno kod proizvoda botaničkog podrijetla. Internacionalizacija lanaca opskrbe često rezultira promjenjivom kvalitetom, jer razlike u tlu, klimi, vremenu berbe, skladištenju i preradi mogu promijeniti fitokemijske profile (Zhang i sur., 2018.).

Nečistoće, poput ostataka pesticida, teških metala ili mikrobne kontaminacije, mogu ugroziti sigurnost i učinkovitost. Nadalje, slučajevi namjernog dodavanja farmaceutskih tvari (npr. steroida ili stimulansa) naglašavaju potrebu za strogi nadzor i regulaciju (Teschke i sur., 2013.).

Kako bi ublažile te rizike, neke vodeće tvrtke vertikalno su integrirale svoje lance opskrbe, izravno uzgajajući i prerađujući botaničke biljke kako bi osigurale dosljednost kvalitete. Stalno praćenje, programi certificiranja (npr. Dobre poljoprivredne i sakupljačke prakse – GACP) i testiranja od strane trećih strana u laboratorijima sve se više smatraju industrijskim standardima.

Inovacije i istraživanja u dodacima prehrani

Inovacija je ključna za održavanje povjerenja potrošača i rast tržišta, posebno s obzirom na regulatorna ograničenja koja su nametnule EFSA i FDA u vezi sa zdravstvenim tvrdnjama. Tvrtke ulažu velika sredstva u osnovna istraživanja, tehnologije formuliranja i kliničku validaciju kako bi podržale učinkovitost svojih proizvoda.

Ključna područja inovacija uključuju:



Temeljna istraživanja: Identifikacija novih bioaktivnih spojeva, istraživanje funkcionalnih sustava i dubinske mehanističke studije na molekularnoj i staničnoj razini. Ova faza često dovodi do znanstvenih publikacija i zaštite intelektualnog vlasništva putem patenata.

Istraživanje formulacija: Razvoj naprednih sustava za dostavu (npr. nanočestice, emulzije, hidrogelovi) koji poboljšavaju bioraspoloživost i stabilnost osjetljivih spojeva poput polifenola, probiotika ili omega-3 masnih kiselina.

Klinička validacija: In vivo ispitivanja i kliničke studije na ljudima pružaju dokaze o sigurnosti i učinkovitosti. Ispitivanja mogu potvrditi tradicionalne etnobotaničke upotrebe ili validirati nove zdravstvene tvrdnje. Procjenjuje se i kratkoročna učinkovitost (npr. modulacija crijevnog mikrobioma) i dugoročne zdravstvene koristi (npr. smanjenje kardiovaskularnog rizika).

Spol, dob i personalizirana prehrana

Novi trend na tržištu dodataka prehrani je personalizirana prehrana, potaknuta napretkom u genomici, metabolomici i istraživanju mikrobioma. Proizvodi su sve više prilagođeni:

Potrebe specifične za spol: npr. dodaci prehrani usmjereni na simptome menopauze kod žena ili zdravlje prostate kod muškaraca.

Formulacije specifične za dob: npr. kalcij i vitamin D za zdravlje kostiju starijih osoba ili omega-3 za kognitivni razvoj djece.

Proizvodi specifični za stil života: npr. formule za oporavak u sportu, adaptogeni za smanjenje stresa za profesionalce ili mješavine za jačanje imuniteta za česte putnike.

Ova evolucija odražava pomak od opće suplementacije prema preciznim nutraceuticima, što je u skladu sa širim trendovima u personaliziranoj medicini (Afman i Müller, 2012.).

Regulatorni okvir i povjerenje potrošača

Dodaci prehrani zauzimaju regulatorni prostor između hrane i lijekova, s različitim zahtjevima diljem svijeta. U Europskoj uniji regulirani su Direktivom o dodacima prehrani (2002/46/EZ), dok u Sjedinjenim Državama podliježu Zakonu o zdravlju i obrazovanju u vezi s dodacima prehrani (DSHEA, 1994.). Iako takvi okviri zahtijevaju točno označavanje i zabranjuju obmanjujuće tvrdnje, u mnogim slučajevima ne nalažu odobrenje prije stavljanja u promet, stavlajući odgovornost na proizvođače za osiguravanje sigurnosti i kvalitete.

Povjerenje potrošača stoga uvelike ovisi o transparentnosti, certifikaciji treće strane i znanstvenim dokazima. Očekuje se da će rastuća integracija digitalnih alata, poput sustava



sljedivosti omogućenih blockchainom, poboljšati odgovornost u lancu opskrbe i uvjeriti potrošače u autentičnost proizvoda.

Dodaci prehrani predstavljaju sve važniji sektor u preventivnoj zdravstvenoj zaštiti, premošćivanju prehrane, medicine i dobrobiti potrošača. Oni pružaju koncentrirane izvore esencijalnih hranjivih tvari i bioaktivnih spojeva, ali se suočavaju s stalnim izazovima u vezi s osiguranjem kvalitete, bioraspoloživošću i usklađivanjem propisa. Budućnost ovog sektora leži u inovacijama, strogoj znanstvenoj validaciji i personalizaciji, uz podršku robusnih sustava kvalitete i transparentnih lanaca opskrbe. Pridržavajući se ovih načela, industrija dodataka prehrani može se nastaviti širiti uz održavanje sigurnosti, učinkovitosti i povjerenja potrošača.

3. 5 Literatura

Afman , L. i Müller, M. (2012). Nutrigenomika: Od molekularne prehrane do prevencije bolesti. Časopis Američkog dijetetičkog udruženja, 112(4), 566–571.

Bauer, R. (2018). Kriteriji kvalitete i standardizacija fitofarmaceutika: Mogu li se postići prihvatljivi standardi lijekova? Lijekovi budućnosti, 43(9), 623–632.

Ekor , M. (2014). Rastuća upotreba biljnih lijekova: Problemi vezani uz nuspojave i izazovi u praćenju sigurnosti. Frontiers in Pharmacology, 4, 177.

Europska komisija. (2002.). Direktiva 2002/46/EZ Europskog parlamenta i Vijeća o usklađivanju zakonodavstva država članica o dodacima prehrani.

Heinrich, M. (2015). Standardi kvalitete za biljne lijekove: Značaj etnofarmakološkog konteksta. Drug Discovery Today, 20(2), 179–185.

Heinrich, M., Appendino , G., Efferth , T., Fürst , R., Izzo, AA, Kayser , O., ... i Viljoen, A. (2022). Najbolja praksa u istraživanju: Konsenzusna izjava o etnofarmakološkim terenskim studijama. Journal of Ethnopharmacology, 284, 114797.

Izzo, AA i Ernst, E. (2009). Interakcije između biljnih lijekova i lijekova na recept: Ažurirani sustavni pregled. Drugs, 69(13), 1777–1798.

Khoddami , A., Wilkes, MA i Roberts, TH (2013). Tehnike za analizu biljnih fenolnih spojeva. Molecules, 18(2), 2328–2375.

Kunle, OF, Egharevba , HO i Ahmadu, PO (2012). Standardizacija biljnih lijekova – pregled. Međunarodni časopis za bioraznolikost i očuvanje, 4(3), 101–112.



Li, S., Zhang, B. i Jiang, D. (2022). Napredak u metabolomici i analitičkim tehnikama za procjenu kvalitete biljnih lijekova. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 12(3), 235–248.

McClements, DJ (2020). Napredak u oralnoj bioraspoloživosti nutraceutika. *Godišnji pregled znanosti i tehnologije hrane*, 11, 141–168.

Patra, JK, Das, G., Fraceto, LF, Campos, EVR, Rodriguez-Torres, MDP, Acosta-Torres, LS, ... & Shin, HS (2021). Sustavi za dostavu lijekova temeljeni na nanotehnologiji: Nedavni razvoj i budući izgledi. *Journal of Nanobiotechnology*, 19, 48.

Raclariu, AC i dr. (2017). DNK barkodiranje za autentifikaciju botaničkih proizvoda. *Fitomedicina*, 23(11), 1103–1109.

Shinde, VM, Dhalwal, K., Potdar, M. i Mahadik, KR (2009). Primjena načela kontrole kvalitete na biljne lijekove. *International Journal of Phytomedicine*, 1(1), 4–8.

Shoba, G., Joy, D., Joseph, T., Majeed, M., Rajendran, R., i Srinivas, PS (1998.). Utjecaj piperina na farmakokinetiku kurkumina kod životinja i ljudi dobrovoljaca. *Planta Medica*, 64(4), 353–356.

Teschke, R., Schwarzenboeck, A. i Hennermann, KH (2013). Misterij biljne hepatotoksičnosti: Karakteristike slučaja, kliničke značajke i procjena uzročnosti. *Annals of Hepatology*, 12(1), 19–32.

WHO. (2007). Smjernice WHO-a za procjenu kvalitete biljnih lijekova s obzirom na onečišćujuće tvari i ostatke. Ženeva: Svjetska zdravstvena organizacija.

WHO. (2013). Strategija WHO-a za tradicionalnu medicinu 2014.–2023. Ženeva: Svjetska zdravstvena organizacija.

Williamson, EM, Driver, S. i Baxter, K. (2013). Stockleyjeve interakcije biljnih lijekova. *Pharmaceutical Press*.

Wink, M. (2015). Mehanizmi djelovanja biljnih lijekova i biljnih sekundarnih metabolita. *Lijekovi*, 2(3), 251–286.

Zhang, QW, Lin, LG i Ye, WC (2018). Tehnike za ekstrakciju i izolaciju prirodnih proizvoda: Sveobuhvatan pregled. *Kineska medicina*, 13, 20.



POGLAVLJE 4. KAPITALIZACIJA BILJNIH RESURSA ZA SIGURNU I UČINKOVITU POTROŠNJU

4.1 Uvod

Biljke su povijesno bile među najvažnijim resursima za ljudsku prehranu, zdravstvenu skrb i kulturne prakse. Od osnovnih prehrambenih usjeva do sofisticiranih ljekovitih formulacija, materijali biljnog podrijetla pružaju esencijalne hranjive tvari, terapijska sredstva i funkcionalne spojeve koji održavaju život i potiču dobrobit. U suvremenom kontekstu, kapitalizacija biljnih resursa odnosi se na strateško korištenje materijala biljnog podrijetla u prehrambenim sustavima, dodacima prehrani i farmaceutskim proizvodima, s naglaskom na sigurnost, učinkovitost i održivost. Ovaj koncept integrira poljoprivredne prakse, biotehnološke inovacije i regulatorne okvire kako bi se maksimizirale koristi biljnih resursa, a istovremeno smanjili rizici povezani s onečišćujućim tvarima, toksinima i varijabilnosti bioaktivnih spojeva.

Definiranje kapitalizacije biljnih resursa

Kapitalizacija biljnih resursa obuhvaća identifikaciju, ekstrakciju, obradu i formuliranje materijala biljnog podrijetla u sigurne i učinkovite proizvode. U prehrambenim sustavima to uključuje optimizaciju nutritivnih i funkcionalnih svojstava usjeva uz osiguravanje sigurnosti hrane. U dodacima prehrani, kapitalizacija se odnosi na izolaciju bioaktivnih molekula (npr. flavonoida, alkaloida, terpena, polisaharida) i njihovu stabilizaciju za ciljane fiziološke koristi. U medicini to često podrazumijeva standardizaciju fitokemikalija za proizvodnju formulacija s ponovljivom terapijskom učinkovitošću.

Osim biomedicinske domene, kapitalizacija uključuje i valorizaciju poljoprivrednih nusproizvoda (ljuski, kora, sjemenki, komine) u vrijedne spojeve poput dijetalnih vlakana, antioksidansa ili biogoriva. Ovaj održivi pristup ne samo da podržava modele kružnog gospodarstva, već i smanjuje otpad u okolišu (Lange & Ahlemeyer, 2019).

Važnost sigurnosti i učinkovitosti

Rastuća potražnja za prirodnim proizvodima dovela je do povećanih izazova u pogledu sigurnosti i učinkovitosti. Za razliku od sintetskih lijekova, biljke pokazuju složene fitokemijske profile na koje utječu genetski, okolišni i procesni čimbenici. Ta složenost može generirati varijabilnost u kvaliteti i učinkovitosti proizvoda.

Sigurnosna razmatranja uključuju:

- Prisutnost prirodnih toksina (npr. alkaloida, cijanogenih glikozida).



- Zagađivači iz poljoprivrednih inputa (pesticidi, teški metali).
- Mikrobiološke opasnosti tijekom skladištenja i prerade.
- Alergeni spojevi u određenim biljnim proizvodima.

Razmatranja učinkovitosti uključuju:

- Zadržavanje bioaktivnih spojeva tijekom obrade i skladištenja.
- Maksimiziranje prinosa od ekstrakcije sirovina.
- Isplativost u velikoserijskoj proizvodnji.
- Osiguravanje bioraspoloživosti aktivnih sastojaka u ljudskom tijelu.

Osiguravanje sigurnosti i učinkovitosti zahtijeva standardizirane protokole, mjere kontrole kvalitete i napredne analitičke tehnologije (kromatografija, spektrometrija, metabolomika) za identifikaciju i kvantifikaciju fitokemikalija i onečišćujućih tvari (Zhou i sur., 2019.).

Ovo poglavlje ima za cilj pružiti sveobuhvatan vodič kroz eksperimentalne i primijenjene strategije za kapitalizaciju biljnih resursa s naglaskom na:

- Osiguranje sigurnosti – rješavanje toksina, onečišćujućih tvari, alergena i regulatornih aspekata.
- Optimizacija učinkovitosti – očuvanje bioaktivnosti, poboljšanje prinosa i smanjenje troškova proizvodnje.
- Metodološka standardizacija – opis modernih tehnika ekstrakcije, obrade i stabilizacije.
- Primijenjene perspektive – demonstracija kako se biljke mogu integrirati u prehranbene, dodatke prehrani i farmaceutske proizvode kako bi se maksimizirale koristi za javno zdravlje.

Povezivanjem eksperimentalnih metodologija s primijenjenim studijama slučaja, ovo poglavlje ističe i prilike i izazove transformacije biljnih resursa u sigurne, učinkovite i održive proizvode za ljudsku prehranu.

Zašto su sigurnost i učinkovitost važni

- Štiti potrošače od toksina, onečišćujućih tvari i alergena.
- Održava bioaktivnost funkcionalnih i terapijskih spojeva.
- Smanjuje otpad i maksimizira ekonomsku vrijednost biljnih resursa.
- Povećava povjerenje potrošača i usklađenost s međunarodnim standardima.
- Podržava modele održivosti i kružnog gospodarstva.



Kapitalizacija biljnih resursa predstavlja ključno sjecište poljoprivrede, biotehnologije, znanosti o hrani i medicine. Sigurna i učinkovita upotreba proizvoda biljnog podrijetla ne samo da doprinosi sigurnosti hrane i zdravstvenoj zaštiti, već je i u skladu s globalnim ciljevima održivosti, inovacija i zaštite potrošača. S rastućim interesom potrošača za prirodne proizvode, u kombinaciji s napretkom u tehnologijama ekstrakcije i analize, budućnost leži u razvoju standardiziranih strategija utemeljenih na dokazima koje otključavaju puni potencijal biljnih resursa za sigurnu i učinkovitu ljudsku konzumaciju.

Conceptual Diagram: Capitalization of Plant Resources



Slika 4.1 Shematski prikaz kapitalizacije biljnih resursa

4.2 Odabir i karakterizacija biljnih resursa

Sustavni odabir i karakterizacija biljnih resursa predstavljaju temelj u razvoju sigurnih i učinkovitih proizvoda dobivenih iz prirodnih izvora. Bilo da su namijenjeni za upotrebu kao hrana, dodaci prehrani ili ljekoviti pripravci, biljni materijali moraju proći rigoroznu evaluaciju kako bi se osigurala njihova sigurnost, učinkovitost i ponovljivost. Dok su biljke povijesno služile kao bitni rezervoari prehrane i lijekova, sve veća složenost modernih globalnih tržišta zahtijeva strukturiranije pristupe za validaciju njihove upotrebe. Ovo poglavlje uvodi temeljna načela za odabir i karakterizaciju biljnih resursa, s naglaskom na kriterije jestivosti, bioaktivnog potencijala, održivosti, provjere tradicionalnog znanja, kao i detaljne botaničke, kemijske i sigurnosne procjene.

Integracija tradicionalnog znanja s modernim analitičkim alatima pruža jedinstvenu priliku za otkrivanje novih bioaktivnih spojeva uz istovremeno očuvanje od potencijalnih rizika. Ova holistička perspektiva prepoznaje biljke ne samo kao sirovine već i kao dinamične biološke sustave čija su svojstva pod utjecajem genetskih, okolišnih i kulturnih čimbenika.

Kriteriji za odabir

Prvi korak u kapitalizaciji biljnih resursa je uspostavljanje strogih kriterija za njihov odabir. To uključuje:

- i) Jestivost i povijesna upotreba: Biljke koje se tradicionalno konzumiraju kao hrana ili lijek imaju komparativnu prednost u odabiru, jer njihovu sigurnost često potkrepljuju



etnobotanički zapisi. Povijesna upotreba pruža vrijedne preliminarne dokaze, ali zahtijeva validaciju modernim znanstvenim metodama (Heinrich & Jäger, 2015).

- ii) Bioaktivni potencijal: Biljke treba procijeniti na prisutnost sekundarnih metabolita poput alkaloida, flavonoida, terpena, polifenola i saponina, koji doprinose terapijskim ili funkcionalnim svojstvima. Nedavni napredak u metabolomskom profiliranju omogućuje istraživačima predviđanje bioaktivnosti na temelju fitokemijskih potpisa (Dai i Mumper, 2010.).
- iii) Održivost: Prekomjerno iskorištavanje populacija divljih biljaka može ugroziti bioraznolikost. Stoga biljke treba birati uzimajući u obzir održive prakse berbe, izvedivost uzgoja i status očuvanosti (Schippmann i sur., 2002.).
- iv) Provjera tradicionalnog znanja: Etnofarmakološke tvrdnje trebale bi biti potvrđene eksperimentalnim studijama. Tradicionalno znanje nudi hipoteze koje mogu usmjeriti znanstveno istraživanje, ali ponovljivost zahtijeva empirijsku potvrdu (Fabricant & Farnsworth, 2001).

Botanička i kemijska karakterizacija

Nakon odabira, rigorozna karakterizacija osigurava ispravnu identifikaciju i pouzdano korištenje biljnih resursa.

Morfološka i taksonomska identifikacija: Pravilna taksonomska klasifikacija temeljena na makroskopskim i mikroskopskim značajkama temelj je autentičnosti. Morfološka procjena mora uzeti u obzir varijacije zbog geografskog položaja, stadija rasta i uvjeta okoliša (WHO, 2011).

Kemijsko profiliranje: Biljke sadrže složene smjese spojeva čije se koncentracije razlikuju ovisno o čimbenicima kao što su sastav tla, klima i uvjeti žetve. Analitičke tehnike poput kromatografije (HPLC, GC), spektrometrije (MS, NMR) i metabolomike sada su ključne za karakterizaciju biljnih ekstrakata (Wolfender i sur., 2015.). Ovi pristupi osiguravaju konzistentnost od serije do serije i pružaju molekularne otiske prstiju za usklađenost s propisima.

Metabolomika u karakterizaciji biljaka: Moderne metabolomske platforme omogućuju istovremeno otkrivanje stotina metabolita, što omogućuje diferencijaciju kemotipova i identifikaciju novih bioaktivnih spojeva. To pruža sveobuhvatno razumijevanje fitokemijske varijabilnosti (Roessner & Dias, 2013).



Procjena sigurnosti

Unatoč općem mišljenju da su prirodni proizvodi inherentno sigurni, biljke mogu sadržavati otrovne spojeve, alergene ili antinutritivne čimbenike koji zahtijevaju pažljivu procjenu.

Toksikološki probir: Studije akutne, subkronične i kronične toksičnosti, i in vitro i in vivo, ključne su za osiguranje sigurnosti ljudi. Posebna pozornost potrebna je za alkaloidne, glikozide i druge potencijalno toksične metabolite (Ekor, 2014).

Alergeničnost: Određene biljke ili proteini biljnog podrijetla mogu izazvati imunološke odgovore. Za procjenu alergenskog potencijala koriste se napredne proteomske analize u kombinaciji s imunološkim testovima.

Antinutritivni čimbenici: Spojevi poput oksalata, fitata i tanina mogu ometati apsorpciju hranjivih tvari. Kvantitativno određivanje ovih tvari je ključno prije nego što se biljka može preporučiti za široku upotrebu (Gupta i sur., 2015.).

Usklađenost s propisima: Međunarodne smjernice (npr. WHO i EMA) naglašavaju potrebu za toksikološkom dokumentacijom i analizom rizika i koristi prije odobrenja za stavljanje proizvoda biljnog podrijetla na tržište.

Strategije prioritizacije

S obzirom na veliku raznolikost biljnih vrsta, određivanje prioriteta je ključno za usmjeravanje istraživačkih i razvojnih napora prema najperspektivnijim kandidatima.

Visok bioaktivni sadržaj: Biljke s visokim koncentracijama dobro karakteriziranih bioaktivnih spojeva imaju prioritet za razvoj. Na primjer, vrste bogate polifenolima često su meta zbog svojih antioksidativnih i protuupalnih svojstava.

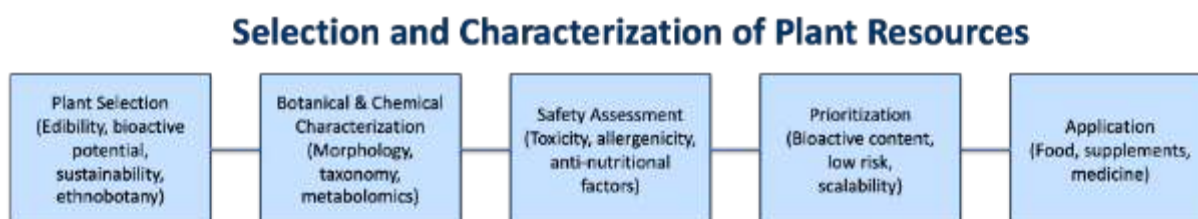
Profil niskog rizika: Vrste s povoljnim sigurnosnim profilom i minimalnim dokazima toksičnosti imaju veću vjerojatnost da će dobiti regulatorno odobrenje i prihvaćanje od strane potrošača.

Skalarna dostupnost: Prednost se daje biljkama koje se mogu uzgajati u velikim razmjerima u održivim uvjetima, čime se smanjuje ovisnost o ugroženim divljim populacijama (Cunningham, 2001.).

Integracija etnobotaničkih i farmakoloških podataka: Kombiniranje podataka o tradicionalnoj upotrebi s farmakološkom validacijom pruža racionalan okvir za određivanje prioriteta, pomažući u povezivanju kulturne baštine sa znanstvenim dokazima (Balick & Cox, 2022).



Sustavni odabir i karakterizacija biljnih resursa pruža znanstvenu i regulatornu osnovu za njihovu sigurnu i učinkovitu upotrebu u hrani, dodacima prehrani i lijekovima. Integracijom etnobotaničkog znanja, naprednog kemijskog profiliranja i strogih procjena sigurnosti, istraživači i dionici u industriji mogu dati prioritet biljnim vrstama s najvećim potencijalom za dobrobiti ljudskog zdravlja, a istovremeno osigurati održivost i sigurnost. Usvajanje standardiziranih kriterija i metodologija ne samo da poboljšava kvalitetu proizvoda, već i povećava povjerenje potrošača i globalnu usklađenost s propisima.



Slika 4.2 Shematski prikaz odabira i karakterizacije biljnih resursa

4. 3 Ekstrakcija i očuvanje bioaktivnih spojeva

Ekstrakcija i očuvanje bioaktivnih spojeva iz biljnih resursa predstavljaju ključni korak u transformaciji sirovih botaničkih materijala u sigurne i učinkovite prehrambene proizvode, dodatke prehrani i lijekovite pripravke. Bioaktivne molekule poput polifenola, flavonoida, karotenoida, vitamina, eteričnih ulja i alkaloida često su vrlo osjetljive na uvjete okoliša i obrade. Stoga se korištene metode moraju optimizirati ne samo zbog učinkovitosti i prinosa, već i zbog očuvanja kemijskog integriteta tih molekula. Ovaj odjeljak ispituje suvremene pristupe ekstrakciji, strategije očuvanja i mehanizme kako bi se osiguralo održavanje bioaktivnosti tijekom cijelog proizvodnog lanca.

Metode ekstrakcije

Ekstrakcija otapalom

Tradicionalna ekstrakcija otapalima ostaje jedna od najčešće korištenih metoda za izdvajanje bioaktivnih spojeva iz biljnih matrica. Voda i etanol općenito se smatraju sigurnim otapalima i često se primjenjuju u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Smjese etanola i vode posebno su učinkovite u ekstrakciji fenolnih spojeva, alkaloida i glikozida, a ujedno su manje toksične i ekološki prihvatljive u usporedbi s kloriranim otapalima (Azwanida, 2015). Međutim, nedostaci uključuju dugo vrijeme ekstrakcije, potrebu za velikim volumenima otapala i ograničenu selektivnost za visoko specifične spojeve.



Ekstrakcija superkritičnim fluidom (SFE)

Ekstrakcija superkritičnim fluidom, koja najčešće koristi ugljikov dioksid (CO_2), zelenija je i selektivnija tehnika. Superkritični CO_2 pokazuje jedinstvena svojstva, djelujući i kao plin i kao tekućina, što mu omogućuje učinkovito prodiranje u biljna tkiva uz istovremeno otapanje nepolarnih spojeva poput eteričnih ulja, karotenoida i sterola (Herrero i sur., 2010.). Njegove prednosti uključuju odsutnost toksičnih ostataka, smanjenu upotrebu otapala i mogućnost finog podešavanja selektivnosti podešavanjem temperature i tlaka. Međutim, potreba za specijaliziranom opremom i veći troškovi mogu ograničiti njegovu primjenu u malim operacijama.

Enzimaska ekstrakcija

Enzimatske metode oslanjaju se na specifične hidrolitičke enzime (npr. celulaze, pektinaze, proteaze) za razgradnju staničnih stijenki biljaka, čime se oslobađaju zarobljeni bioaktivni spojevi. Ova tehnika je posebno korisna za polisaharide, fenolne spojeve i proteine (Puri i sur., 2012.). Enzimaska ekstrakcija je blaga, čuva termolabilne spojeve i često poboljšava prinos u usporedbi s konvencionalnim pristupima. Glavna ograničenja su visoka cijena enzima i potreba za optimizacijom uvjeta za svaku biljnu matricu.

Komparativna perspektiva

Svaka metoda ekstrakcije predstavlja kompromis između prinosa, selektivnosti, održivosti i troškova. Ekstrakcija otapalom je jeftina, ali ekološki opterećujuća, dok je superkritični CO_2 održiv, ali skup. Enzimski pristupi predstavljaju kompromis, nudeći visoku selektivnost i očuvanje aktivnosti, ali zahtijevajući ulaganje u biokatalizatore. Sve se više usvajaju hibridne tehnike, poput ekstrakcije uz pomoć ultrazvuka ili mikrovalova, kako bi se povećala učinkovitost uz smanjenje upotrebe otapala i vremena (Chemat i sur., 2017.).

Strategije očuvanja

Nakon ekstrakcije, bioaktivni spojevi moraju se sačuvati u obliku koji ih štiti od degradacije tijekom obrade, skladištenja i konačne konzumacije. Očuvanje je posebno važno za polifenole, vitamine i hlapljiva ulja koja su sklona oksidaciji, hidrolizi ili isparavanju.

Tehnike sušenja

Sušenje smanjuje aktivnost vode, čime se stabiliziraju ekstrakti i sprječava rast mikroba. Konvencionalno sušenje vrućim zrakom je isplativo, ali često dovodi do značajne toplinske razgradnje spojeva osjetljivih na toplinu. Liofilizacija (liofilizacija) smatra se superiornijom za



očuvanje termolabilnih molekula poput vitamina C i flavonoida, jer uklanja vodu pod uvjetima niske temperature i tlaka, čime se minimiziraju kemijske promjene (Ratti , 2001.). Međutim, liofilizacija je energetski intenzivna i skupa, što ograničava njezinu industrijsku skalabilnost.

Enkapsulacija

Tehnologije enkapsulacije poput sušenja raspršivanjem, liposomskog hvatanja ili enkapsulacije nanočestica sve se više koriste za zaštitu bioaktivnih spojeva od oksidacije, svjetlosti ili fluktuacija pH vrijednosti. Enkapsulacija također poboljšava topljivost i bioraspoloživost spojeva poput polifenola i karotenoida (Gharsallaoui i sur., 2007.). Ova tehnika omogućuje kontrolirano oslobađanje i ciljanu dostavu u funkcionalnoj hrani ili nutraceuticima, iako složenost formulacije i dodatni koraci obrade mogu povećati troškove proizvodnje.

Kontrolirani uvjeti skladištenja

Pravilni uvjeti skladištenja, uključujući smanjenu izloženost kisiku, zaštitu od svjetlosti i kontrolu temperature, ključni su za očuvanje bioaktivnih spojeva. Na primjer, polifenolni spojevi podložni su oksidaciji kada su izloženi zraku, dok se karotenoidi razgrađuju pod utjecajem svjetlosti. Korištenje inertnih plinova za pakiranje (npr. ispiranje dušikom), neprozirnih spremnika i hlađenja može značajno produžiti rok trajanja (Shahidi & Ambigaipalan , 2015).

Održavanje bioaktivnosti

Očuvanje bioaktivnosti odnosi se na održavanje strukturnog integriteta i funkcionalnog kapaciteta osjetljivih spojeva tijekom obrade. Mnoge molekule biljnog podrijetla, poput vitamina, flavonoida i eteričnih ulja, nestabilne su pri visokim temperaturama, izloženosti kisiku ili mehaničkom naprezanju.

Zaštita polifenola i vitamina

Polifenoli, iako ih ima u izobilju u mnogim biljkama, osjetljivi su na oksidaciju, posebno u alkalnim uvjetima. Slično tome, vitamini poput vitamina C i vitamina E brzo se razgrađuju pod utjecajem topline i kisika. Napredne metode konzerviranja, uključujući enkapsulaciju u biopolimere ili emulzije, mogu ublažiti te gubitke i osigurati veću bioraspoloživost (Biesalski i sur., 2009.).

Očuvanje hlapljivih ulja

Eterična ulja i drugi hlapljivi spojevi skloni su isparavanju i oksidaciji tijekom skladištenja. Mikrokapsulacija i korištenje tamnih, hermetički zatvorenih spremnika učinkovite su strategije



za minimiziranje tih gubitaka. Osim toga, kombiniranje ekstrakcije s metodama konzerviranja - poput neposrednog liofiliziranja nakon ekstrakcije otapalom ili enzimske ekstrakcije - može znatno smanjiti razgradnju (Burt, 2004.).

Integriranje ekstrakcije i očuvanja

Moderni industrijski pristupi naglašavaju integraciju strategija ekstrakcije i konzerviranja u kontinuirani tijek rada. Na primjer, superkritična CO₂ ekstrakcija može se izravno povezati s enkapsulacijom, čime se smanjuje izloženost spoja zraku i svjetlosti tijekom obrade. Takvi integrativni sustavi ne samo da poboljšavaju ukupnu učinkovitost bioaktivnog oporavka, već i minimiziraju rizik od degradacije spoja prije formulacije konačnog proizvoda.

Ekstrakcija i očuvanje bioaktivnih spojeva ključni su za razvoj sigurnih, učinkovitih i održivih proizvoda na biljnoj bazi za prehrambenu, farmaceutsku i nutritivnu primjenu. Izbor metode ekstrakcije i strategije očuvanja izravno utječe na prinos spoja, selektivnost i stabilnost. Dok tradicionalna ekstrakcija otapalima ostaje prevladavajuća, nove tehnologije poput ekstrakcije superkritičnim fluidom, enzimskih metoda i enkapsulacije oblikuju budućnost prerade prirodnih proizvoda. Kako bi se osigurala maksimalna bioaktivnost, sve su potrebni integrirani sustavi koji kombiniraju učinkovitu ekstrakciju s robusnim očuvanjem. Uravnoteženje učinkovitosti, utjecaja na okoliš i troškova ostat će vodeće načelo u napretku ovog područja.

Extraction and Preservation of Bioactive Compounds



Slika 4.3 Shematski prikaz ekstrakcije za očuvanje bioaktivnih spojeva

4.4 Obrada za sigurnu konzumaciju

Osiguravanje sigurnosti i učinkovitosti biljnih resursa za ljudsku prehranu zahtijeva multidisciplinarni pristup koji integrira znanost o hrani, farmakognoziju i toksikologiju. Prerada nije samo pretvaranje sirovog biljnog materijala u upotrebljive oblike, već i sustavno uklanjanje ili smanjenje toksičnih, alergeničkih ili na drugi način nepoželjnih komponenti uz očuvanje bioaktivnih spojeva koji pružaju zdravstvene prednosti. Sigurna upotreba biljnih proizvoda stoga ovisi o robusnim metodama detoksikacije, strategijama formuliranja koje poboljšavaju isporuku i učinkovitost te strogim okvirima osiguranja kvalitete koji jamče ujednačenost i ponovljivost u svim proizvodnim ciklusima.



Metode detoksikacije

Mnoge biljne vrste prirodno akumuliraju antinutritivne čimbenike, otrovne metabolite ili onečišćujuće tvari iz okoliša poput ostataka pesticida i teških metala. Stoga su metode detoksikacije bitan preduvjet za sigurnu konzumaciju.

Termička obrada jedna je od najstarijih i najčešće primjenjivanih tehnika. Kontrolirano zagrijavanje može denaturirati toksične proteine (npr. lektine u mahunarkama), inaktivirati mikrobne kontaminante i smanjiti enzimsku aktivnost koja bi inače mogla dovesti do razgradnje bioaktivnih tvari (Martínez i sur., 2020.). Međutim, pretjerana toplinska izloženost riskira razgradnju termolabilnih spojeva poput vitamina C, karotenoida i polifenola, što zahtijeva optimizaciju kombinacija temperature i vremena.

Kemijska detoksikacija uključuje primjenu sigurnih sredstava (alkalne otopine, aktivni ugljen ili organske kiseline) za smanjenje toksičnih alkaloida, cijanogenih glikozida i ostataka pesticida (Awuchi i sur., 2020.). Iako su učinkovite, kemijske metode zahtijevaju pažljivu regulaciju kako bi se izbjeglo unošenje novih onečišćujućih tvari ili promjena senzorne i nutritivne kvalitete proizvoda.

Fermentacija nudi biološki održiv pristup detoksikaciji. Aktivnošću korisnih mikroba, fermentacija može smanjiti antinutritivne čimbenike poput fitata i oksalata, a istovremeno obogatiti matricu probioticima i metabolitima koji poboljšavaju probavljivost (Tamang i sur., 2020.). Tradicionalna fermentirana hrana ilustrira dvostruku prednost detoksikacije i funkcionalnog obogaćivanja, značajku koja se sve više koristi u razvoju nutraceutičkih proizvoda.

Strategije formuliranja

Osim detoksikacije, obrada također uključuje dizajniranje formulacija koje maksimiziraju učinkovitost, stabilnost i prihvaćanje od strane potrošača. Integriranje biljnih ekstrakata u funkcionalnu hranu, dodatke prehrani i pića zahtijeva pažljiv odabir pomoćnih tvari i nosača kako bi se održala bioaktivnost, a istovremeno osigurala okusnost i usklađenost.

Mikronizacija se često primjenjuje za povećanje površine bioaktivnih prašaka, čime se poboljšava topljivost i brzina otapanja u gastrointestinalnim tekućinama (Liu i sur., 2019.). To je posebno vrijedno za fitokemikalije slabo topljive u vodi poput kurkumina i resveratrola.

Tehnologije enkapsulacije (npr. liposomi, nanoemulzije, ciklodekstrinski kompleksi i polimerne nanočestice) široko se primjenjuju za zaštitu osjetljivih spojeva od oksidacije, ekstremnih pH vrijednosti i enzimске razgradnje tijekom skladištenja i probave (Ganesan i sur., 2018.).



Enkapsulacija također omogućuje kontrolirano oslobađanje i ciljanu isporuku bioaktivnih tvari u određene segmente gastrointestinalnog trakta, poboljšavajući i bioraspoloživost i terapijsku učinkovitost.

Osim toga, strategije formuliranja moraju se prilagoditi specifičnim potrebama potrošača, uključujući formulacije temeljene na spolu, pedijatrijske i gerijatrijske dodatke prehrani te intervencije specifične za određeno stanje, poput proizvoda za kardiovaskularno ili kognitivno zdravlje (Shahidi i Ambigaipalan, 2015.).

Povećanje bioraspoloživosti

Jedan od trajnih izazova u nutraceutskim proizvodima na biljnoj bazi je niska bioraspoloživost mnogih fitokemikalija, posebno polifenola, flavonoida i terpenoida. Stoga se koriste različite tehnike obrade kako bi se poboljšala apsorpcija i sistemska cirkulacija.

- Enzimatska prethodna obrada može hidrolizirati glikozidne veze u flavonoidima, oslobađajući aglikone koji se lakše apsorbiraju (Scalbert i sur., 2011.).
- Nanostrukturirani sustavi za dostavu poboljšavaju topljivost i štite spojeve od prerane razgradnje.
- Sinergijske formulacije - poput kombiniranja piperina s kurkuminom - mogu inhibirati metaboličke enzime i time povećati koncentraciju bioaktivnih spojeva u plazmi (Shoba i sur., 1998.).

Ovi pristupi ilustriraju važnost promatranja obrade ne samo kao mjere očuvanja već i kao čimbenika koji omogućuje terapijsku učinkovitost.

Osiguranje kvalitete

Osiguranje kvalitete (QA) temelj je vjerodostojnosti i sigurnosti proizvoda biljnog podrijetla. Ujednačenost, stabilnost i ponovljivost obilježja su pouzdane formulacije.

- Ujednačenost osigurava dosljednu raspodjelu bioaktivnih spojeva u svim serijama, smanjujući varijabilnost u doziranju i učinkovitosti.
- Testiranje stabilnosti ključno je za procjenu razgradnje fitokemikalija tijekom vremena pod različitim uvjetima skladištenja (svjetlost, temperatura, vlažnost) i za utvrđivanje pouzdanih tvrdnji o roku trajanja (EMA, 2016).



- Ponovljivost osigurava da se rezultati uočeni u laboratorijskoj proizvodnji održe i u industrijskoj obradi, što je čest izazov s obzirom na složenost biljnih matrica i sezonsku varijabilnost.

Moderni okviri osiguranja kvalitete uključuju kromatografsko otiske prstiju, spektroskopske analize i biološke testove za potvrdu identiteta, čistoće i potentnosti proizvoda biljnog podrijetla. Nadalje, pridržavanje dobre proizvođačke prakse (GMP) i međunarodnih farmakopejskih standarda osigurava usklađenost s propisima i sigurnost potrošača.

Prerada za sigurnu konzumaciju predstavlja ključnu fazu u lancu vrijednosti biljnih resursa, premošćujući jaz između sirovog botaničkog materijala i proizvoda spremnih za potrošače. Integracijom metoda detoksikacije, naprednih strategija formuliranja, poboljšanja bioraspoloživosti i robusnih praksi osiguranja kvalitete, istraživači i proizvođači mogu zaštititi i učinkovitost i sigurnost. Pritom se ne bave samo neposrednim nutritivnim i terapijskim ciljevima, već i širim imperativima povjerenja potrošača i usklađenosti s propisima.

4.5 Analitički pristupi za sigurnost i učinkovitost

Procjena sigurnosti i učinkovitosti biljnih resursa, bilo da se konzumiraju kao hrana, dodaci prehrani ili terapijski pripravci, kritično ovisi o robusnim analitičkim metodologijama. Ovi pristupi služe dvjema primarnim svrhama: prvo, osigurati da su onečišćujuće tvari poput teških metala, ostataka pesticida i mikotoksina odsutne ili unutar sigurnih granica; drugo, kvantificirati bioaktivne spojeve koji doprinose nutritivnim ili farmakološkim svojstvima proizvoda. Osim laboratorijskih ispitivanja, analitički rezultati moraju biti usklađeni i s međunarodnim regulatornim okvirima koji utvrđuju sigurnosne pragove, definiraju zahtjeve za označavanje i standardiziraju parametre kvalitete za zaštitu potrošača.

Detekcija onečišćujućih tvari

Teški metali

Kontaminacija teškim metalima predstavlja značajnu zabrinutost zbog svoje postojanosti i bioakumulativnog potencijala. Metali poput olova (Pb), kadmija (Cd), žive (Hg) i arsena (As) toksični su čak i pri niskim koncentracijama i mogu ugroziti ljudsko zdravlje kroničnom izloženošću (Jaishankar i sur., 2014.). Njihova prisutnost u biljnim proizvodima može biti posljedica onečišćenja okoliša, kvalitete vode za navodnjavanje ili kontaminacije tijekom prerade.



Analitičke metode koje se obično koriste za detekciju uključuju atomsku apsorpcijsku spektroskopiju (AAS), induktivno spregnutu plazmu-masenu spektrometriju (ICP-MS) i induktivno spregnutu plazmu-optičku emisijsku spektroskopiju (ICP-OES). ICP-MS se često smatra zlatnim standardom zbog svoje visoke osjetljivosti i kapaciteta detekcije više elemenata, što omogućuje kvantifikaciju do razina dijelova na milijardu (ppb) (Sarmanová i sur., 2016).

Pesticidi

Biljni resursi uzgajani u intenzivnim poljoprivrednim sustavima skloni su ostacima pesticida. Procjena sigurnosti ovih ostataka zahtijeva usklađenost s maksimalnim granicama ostataka (MRL) koje su utvrdile regulatorne agencije poput Europske agencije za sigurnost hrane (EFSA) i Američke agencije za hranu i lijekove (FDA). Plinska kromatografija-masena spektrometrija (GC-MS) i tekućinska kromatografija-masena spektrometrija (LC-MS) široko se koriste za analizu više ostataka, omogućujući istovremeno otkrivanje stotina molekula pesticida u tragovima (Fernandes i sur., 2020.).

Mikotoksini

Mikotoksini, koje proizvode gljive poput *Aspergillus* i *Fusarium*, spadaju među najopasnije onečišćujuće tvari u hrani i dodacima prehrani biljnog podrijetla. Aflatoksini, ohratoksin A i fumonizini posebno su zabrinjavajući zbog svojih kancerogenih, hepatotoksičnih i nefrotoksičnih svojstava (Eskola i sur., 2020.). Detekcija se oslanja na visokoučinkovitu tekućinsku kromatografiju (HPLC) s fluorescentnom ili masenom spektrometrijom, često u kombinaciji s imunoafinitetnim koracima čišćenja. Brze metode probira poput ELISA kitova također se koriste za rutinsko praćenje, iako zahtijevaju metode potvrdne kromatografije u regulatorne svrhe.

Kvantifikacija bioaktivnih spojeva

Sigurnost biljnih proizvoda ne može se odvojiti od učinkovitosti, koja ovisi o prisutnosti i koncentraciji bioaktivnih sastojaka. Stoga je kvantifikacija bitna za osiguranje konzistentnosti proizvoda, terapijskog potencijala i pravilnog označavanja.

Kromatografske tehnike

Visokoučinkovita tekućinska kromatografija (HPLC) ostaje temelj fitokemijske analize zbog svoje sposobnosti odvajanja, identificiranja i kvantificiranja širokog raspona spojeva, od



polifenola do alkaloida. U kombinaciji s diodnom detekcijom nizom (DAD) ili masenom spektrometrijom (LC-MS), HPLC pruža visoko specifične molekularne otiske prstiju složenih biljnih ekstrakata (Cuyckens i Claeys, 2004).

Plinska kromatografija (GC) je posebno prikladna za hlapljive spojeve poput eteričnih ulja i terpena, često u kombinaciji s detekcijom plamenom ionizacijom (FID) ili MS.

Spektrofotometrijski testovi

Iako manje specifični od kromatografskih metoda, spektrofotometrijski testovi ostaju vrijedni za rutinsku kontrolu kvalitete. Primjeri uključuju Folin - Ciocalteu test za ukupni sadržaj fenola, metodu aluminijevog klorida za flavonoide i DPPH ili ABTS testove za antioksidativni kapacitet (Singleton i sur., 1999.). Ovi testovi pružaju brze i isplative procjene bioaktivnosti, iako često zahtijevaju validaciju u odnosu na specifičnije tehnike.

Metabolomika

Nedavni napredak u metabolomici korištenjem nuklearne magnetske rezonancije (NMR) spektroskopije i LC-MS visoke rezolucije omogućuje holističko profiliranje biljnih metaboloma. Takvi pristupi ne samo da kvantificiraju poznate bioaktivne tvari, već otkrivaju i nove spojeve, omogućujući otkriće novih funkcionalnih sastojaka (Patti i sur., 2012.).

Usklađenost s propisima

Analitičke metode moraju u konačnici biti usklađene s regulatornim okvirima koji reguliraju dodatke prehrani, biljne lijekove i funkcionalnu hranu.

Standardi sigurnosti hrane

Organizacije poput EFSA-e, FDA-e i Komisije za Codex Alimentarius postavljaju stroge sigurnosne pragove za onečišćujuće tvari, uključujući dopuštene dnevne unose (PDI) za teške metale, MRL-ove za pesticide i maksimalno tolerirane razine za mikotoksine. Proizvodi koji prelaze te granice smatraju se nesigurnima i ne mogu se staviti na tržište.

Dodatni pravilnik

Dodaci prehrani moraju biti u skladu s dodatnim propisima koji se odnose na sastav, oblike doziranja i označavanje. Europska unija, na primjer, zahtijeva detaljne specifikacije vitamina, minerala i botaničkih ekstrakata koji se koriste u dodacima prehrani (Direktiva 2002/46/EZ). Slično tome, u Sjedinjenim Državama, Zakon o zdravlju i obrazovanju u vezi s dodacima



prehrani (DSHEA, 1994.) uređuje zahtjeve za označavanje, naglašavajući da se za dodatke prehrani ne može tvrditi da dijagnosticiraju, liječe ili izlječuju bolesti bez odobrenja FDA.

Označavanje i transparentnost za potrošače

Točno označavanje, utemeljeno na validiranim analitičkim podacima, ključno je za sigurnost i povjerenje potrošača. Oznake moraju navoditi identitet, koncentraciju i preporučenu dozu aktivnih sastojaka, a istovremeno moraju otkriti alergene, pomoćne tvari i potencijalne onečišćujuće tvari. Pogrešno označavanje ili patvorenje ne samo da krši regulatorne standarde, već može predstavljati i značajne zdravstvene rizike, što naglašava važnost analitičke provjere (Gafner i Bergeron, 2005.).

Analitički pristupi služe kao okosnica napora za osiguranje sigurnosti i učinkovitosti resursa biljnog podrijetla. Od osjetljivog otkrivanja onečišćujućih tvari poput teških metala, pesticida i mikotoksina do precizne kvantifikacije bioaktivnih spojeva, ove metode osiguravaju i zaštitu potrošača i terapijsku pouzdanost. Štoviše, pridržavanjem strogih regulatornih okvira i transparentnih praksi označavanja, proizvođači mogu osigurati da njihovi proizvodi zadovoljavaju međunarodne standarde, smanjiti rizike od kontaminacije i patvorenja te poticati povjerenje potrošača u globalna tržišta nutraceutika i bilja.



Slika 4.4 Shematski prikaz analitičkih pristupa za sigurnost i učinkovitost

4.6 Održivi i inovativni pristupi

Brzi rast potražnje za proizvodima biljnog podrijetla - od hrane i dodataka prehrani do lijekova i kozmetike - povećao je potrebu za održivim i inovativnim praksama u njihovom razvoju i korištenju. Tradicionalni pristupi nabavi i preradi biljnih resursa sve se više prepoznaju kao nedovoljni za osiguranje dugoročne ekološke ravnoteže, sigurnosti potrošača i učinkovitog korištenja prirodnih materijala. Istodobno, nove tehnologije mijenjaju način na koji se bioaktivni



spojevi ekstrahiraju, čuvaju i isporučuju, osiguravajući veću učinkovitost uz smanjene troškove zaštite okoliša. Ovo poglavlje istražuje održive i inovativne pristupe kapitalizaciji biljnih resursa, nakon čega slijedi sažetak najvažnijih lekcija.

Održivost u korištenju biljnih resursa

Odgovorno nabavljanje započinje odabirom biljnih vrsta na temelju njihovog ekološkog otiska i dostupnosti. Prekomjerna berba divljeg ljekovitog bilja može dovesti do gubitka bioraznolikosti i ugrožavanja vrsta, što se vidi u padu određenih traženih biljaka poput *Panax ginsenga* i *Echinacea purpurea* (Hamilton, 2004.). Stoga je uzgoj ljekovitog i nutraceutičkog bilja u skladu s dobrom poljoprivrednom praksom i praksom sakupljanja (GACP) ključan. Standardi koje je utvrdila Svjetska zdravstvena organizacija naglašavaju transparentnost u nabavi i sljedivost u cijelom lancu opskrbe (WHO, 2018.).

Minimiziranje otpada. Industrija prerade biljaka stvara značajne količine nusproizvoda, poput ljuski, kora, stabljika i istrošene biomase. Oni se često odbacuju, unatoč tome što sadrže vrijedne bioaktivne spojeve poput polifenola, vlakana i eteričnih ulja (Ayala-Zavala i sur., 2011.). Strategije valorizacije uključuju oporavak sekundarnih metabolita iz tih ostataka, što podržava model kružnog gospodarstva i smanjuje utjecaj na okoliš.

Pristupi kružnom gospodarstvu. Primjena načela kružnog gospodarstva na biljne industrije potiče integraciju otpada natrag u proizvodne cikluse. Na primjer, trop grožđa iz vinarstva može se ponovno preraditi za antioksidativne polifenole, dok se otpad od kore citrusa može iskoristiti za oporavak pektina i flavonoida (Reis i sur., 2017.). Takvi pristupi doprinose održivim poslovnim modelima, smanjuju ovisnost o sintetičkim aditivima i maksimiziraju punu vrijednost biljnih resursa.

Inovacije u razvoju proizvoda na biljnoj bazi

Nanotehnologija i napredni sustavi dostave. Jedan od najznačajnijih izazova u korištenju biljnih bioaktivnih tvari je njihova niska bioraspoloživost, posebno polifenola, karotenoida i flavonoida. Sustavi dostave na bazi nanočestica, poput liposoma, nanoemulzija i polimernih nanočestica, mogu poboljšati topljivost, zaštititi bioaktivne tvari od razgradnje i poboljšati kontrolirano oslobađanje (Wong i sur., 2019.). Takve inovacije proširuju klinički potencijal prirodnih proizvoda.

Formuliranje potpomognuto umjetnom inteligencijom i uvidi temeljeni na podacima. Umjetna inteligencija (UI) i strojno učenje sve se više primjenjuju za predviđanje interakcija biljnih



metabolita, optimizaciju formulacija i provjeru sigurnosnih profila. Integracijom etnofarmakološkog znanja s računalnim modelima, UI može ubrzati identifikaciju obećavajućih biljnih kandidata i preciznije voditi strategije formuliranja (Jiang i sur., 2020.).

Tehnologije zelene ekstrakcije. Tradicionalne metode ekstrakcije često se oslanjaju na velike količine organskih otapala, dugo vrijeme obrade i visoku potrošnju energije. Inovativne tehnologije zelene ekstrakcije, uključujući superkritičnu CO₂ ekstrakciju, ekstrakciju uz pomoć mikrovalova i ekstrakciju tekućinom pod tlakom, nude veću selektivnost, kraće vrijeme obrade i smanjeni utjecaj na okoliš (Chemat i sur., 2019.). Ove tehnologije ne samo da poboljšavaju učinkovitost, već su i usklađene s održivošću i potražnjom potrošača za ekološki prihvatljivim proizvodima.

Sažetak i ključne zaključke

Ključni uvidi

Održivost je nepregovaračka: odgovorno nabavljanje, valorizacija otpada i modeli kružnog gospodarstva ključni su za uravnoteženje ekološke zaštite s rastućom potražnjom za proizvodima biljnog podrijetla.

Inovacija potiče učinkovitost: Nanotehnologija, formulacija temeljena na umjetnoj inteligenciji i metode zelene ekstrakcije poboljšavaju bioaktivnu stabilnost, bioraspoloživost i ukupnu učinkovitost.

Integracija održivosti i inovacija: Buduće strategije trebale bi kombinirati ekološki osviještene prakse s naprednim tehnologijama kako bi se osigurala sigurnost i povjerenje potrošača.

Regulatorni okviri: Međunarodne smjernice (npr. WHO, EFSA, FDA) igraju ključnu ulogu u oblikovanju održivih praksi i osiguravanju standardizacije.

Zašto su ovi pristupi važni

Održive i inovativne metode osiguravaju da biljni resursi ostanu dostupni budućim generacijama, a istovremeno potrošačima danas pružaju sigurne, učinkovite i visokokvalitetne proizvode. Sinergija između održivosti i tehnoloških inovacija predstavlja put naprijed za modernu fitomedicinu, nutraceutike i funkcionalnu hranu.



4.7 Literatura

- Ayala-Zavala, JF, Rosas-Domínguez, C., Vega-Vega, V. i González-Aguilar, GA (2011.). Agroindustrijski potencijal nusproizvoda prerade voća i povrća. *Food Research International*, 44(7), 1866–1874.
- Azwanida , NN (2015). Pregled upotrebe metoda ekstrakcije u ljekovitom bilju, princip, snaga i ograničenja. *Medicinal & Aromatic Plants*, 4(3), 196.
- Awuchi , CG, Igwe , VS i Amagwula , IO (2020). Nutritivna vrijednost, fitokemija i toksičnost nekih vrsta lisnatog povrća koje se konzumira u Africi. *Journal of Food Quality*, 2020, 1–15.
- Balick , MJ i Cox, PA (2022). Biljke, ljudi i kultura: Znanost etnobotanike. CRC Press.
- Biesalski , HK, Dragsted , LO, Elmadfa , I. i dr. (2009). Bioaktivni spojevi: Definicija i procjena aktivnosti. *Nutrition*, 25(11–12), 1202–1205.
- Burt, S. (2004). Eterična ulja: Njihova antibakterijska svojstva i potencijalne primjene u hrani - pregled. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223–253.
- Chemat , F., Vian , MA i Cravotto , G. (2017). Zelena ekstrakcija prirodnih proizvoda: Koncept i principi. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7), 8615–8627.
- Chemat , F., Abert-Vian , M., Fabiano- Tixier , AS, Strube , J., Uhlenbrock , L., Gunjevic , V. i Cravotto , G. (2019). Zelena ekstrakcija prirodnih proizvoda: Koncept i principi. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9), 2005.
- Cunningham, AB (2001). Primijenjena etnobotanika: Ljudi, korištenje i očuvanje divljih biljaka. Earthscan.
- Cuyckens , F. i Claeys , M. (2004). Masena spektrometrija u strukturnoj analizi flavonoida. *Journal of Mass Spectrometry*, 39(1), 1–15.
- Dai, J. i Mumper , RJ (2010). Biljni fenoli: Ekstrakcija, analiza i njihova antioksidativna i antikancerogena svojstva. *Molecules*, 15(10), 7313–7352.
- Direktiva 2002/46/EZ Europskog parlamenta i Vijeća o dodacima prehrani. (2002.). Službeni list Europskih zajednica.
- Ekor , M. (2014). Rastuća upotreba biljnih lijekova: Problemi vezani uz nuspojave i izazovi u praćenju sigurnosti. *Frontiers in Pharmacology*, 4, 177.
- Eskola, M., Kos, G., Elliott, CT, Hajšlová, J., Mayar, S. i Krska, R. (2020). Kontaminacija usjeva za prehranu mikotoksinima diljem svijeta: Valjanost često citirane 'procjene FAO-a'. *World Mycotoxin Journal*, 13(2), 139–151.
- Fabricant, DS i Farnsworth, NR (2001). Vrijednost biljaka korištenih u tradicionalnoj medicini za otkrivanje lijekova. *Environmental Health Perspectives*, 109 (Dodatak 1), 69–75.



- Fernandes, VC, Lehotay , SJ, Mol, HG, van der Kamp, H. i Stolker , AA (2020). Razvoj metode višestrukih ostataka za analizu pesticida u biljkama. *Food Chemistry*, 310, 125–164.
- Gafner , S. i Bergeron, C. (2005). Izazovi kemijske analize botaničkih proizvoda i dodataka prehrani. *HerbalGram* , 67, 46–57.
- Ganesan, K., Xu, B. i Karthivashan , G. (2018). Bioaktivna enkapsulacija i kontrolirano oslobađanje: Trendovi i izazovi. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(2), 170–193.
- Gharsallaoui , A., Roudaut , G., Chambin , O., Voilley , A. i Saurel , R. (2007). Primjena sušenja raspršivanjem u mikrokapsulaciji sastojaka hrane: Pregled. *Food Research International*, 40(9), 1107–1121.
- Gupta, RK, Gangoliya , SS i Singh, NK (2015). Smanjenje fitinske kiseline i povećanje bioraspoloživih mikronutrijenata u žitaricama. *Journal of Food Science and Technology*, 52(2), 676–684.
- Hamilton, AC (2004). Ljekovito bilje, očuvanje i egzistencija. *Bioraznolikost i očuvanje*, 13(8), 1477–1517.
- Heinrich, M. i Jäger , AK (2015). *Etnofarmakologija*. John Wiley & sinovi.
- Herrero, M., Cifuentes, A. i Ibáñez, E. (2010). Subkritična i superkritična fluidna ekstrakcija funkcionalnih sastojaka iz različitih prirodnih izvora: biljke, nusproizvodi hrane, alge i mikroalge. *Food Chemistry*, 98(1), 136–148.
- Jaishankar , M., Tseten , T., Anbalagan , N., Mathew, BB i Beeregowda , KN (2014). Toksičnost, mehanizam i učinci nekih teških metala na zdravlje. *Interdisciplinarna toksikologija*, 7(2), 60–72.
- Jiang, J., Zhao, Y., He, S. i Liu, Y. (2020). Umjetna inteligencija u istraživanju prirodnih proizvoda: Trendovi i perspektive. *Fitomedicina*, 79, 153337.
- Lange, BM i Ahlemeyer , J. (2019). Lanci vrijednosti na biljnoj bazi za održivi razvoj biogospodarstva . *Planta Medica* , 85(9–10), 733–746.
- Liu, W. i dr. (2019). Tehnike mikronizacije i nanonizacije za poboljšanje bioraspoloživosti slabo topljivih fitokemikalija. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 52, 642–651.
- Martínez, R., Torres, P. i Meneses , M. (2020). Utjecaj toplinske obrade na biljne bioaktivne tvari . *Food Chemistry*, 307, 125–138.
- Patti, GJ, Yanes , O. i Siuzdak , G. (2012). Inovacija: Metabolomika: vrhunac omične trilogije. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(4), 263–269.
- Puri , M., Sharma, D. i Barrow, CJ (2012). Ekstrakcija bioaktivnih tvari iz biljaka pomoću enzima . *Trends in Biotechnology*, 30(1), 37–44.



- Ratti , C. (2001). Vrući zrak i liofilizacija visokovrijednih namirnica: pregled. *Journal of Food Engineering*, 49(4), 311–319.
- Reis, SF, Rai, DK i Abu- Ghannam , N. (2017). Valorizacija agroindustrijskih ostataka za bioaktivne spojeve. *Trendovi u znanosti i tehnologiji hrane*, 63, 32–42.
- Roessner , U. i Dias, DA (2013). Metabolomski alati za otkrivanje prirodnih produkata. *Metaboliti*, 3(2), 255–272.
- Sarmanová , J. i dr. (2016). ICP-MS metode za određivanje elemenata u tragovima u hrani. *Food Additives & Contaminants*, 33(4), 553–564.
- Scalbert , A., Johnson, IT i Saltmarsh, M. (2011). Polifenoli: Antioksidansi i više. *American Journal of Clinical Nutrition*, 93(1), 1–5.
- Schippmann , U., Leaman , DJ i Cunningham, AB (2002). Utjecaj uzgoja i sakupljanja ljekovitog bilja na bioraznolikost: Globalni trendovi i problemi. *FAO*.
- Shahidi, F. i Ambigaipalan , P. (2015). Fenoli i polifenoli u hrani, pićima i začinima: Antioksidativna aktivnost i učinci na zdravlje. *Journal of Functional Foods*, 18, 820–897.
- Shoba, G., Joy, D., Joseph, T., Majeed, M., Rajendran, R., i Srinivas, PS (1998.). Utjecaj piperina na farmakokinetiku kurkumina kod životinja i ljudi dobrovoljaca. *Planta Medica*, 64(4), 353–356.
- Singleton, VL, Orthofer, R. i Lamuela-Raventós, RM (1999). Analiza ukupnih fenola i drugih oksidacijskih supstrata i antioksidansa pomoću Folin - Ciocalteu reagensa. *Methods in Enzymology*, 299, 152–178.
- Tamang, JP, Watanabe, K. i Holzapfel, WH (2020). Pregled: Raznolikost mikroorganizama u fermentiranoj hrani i pićima diljem svijeta. *Frontiers in Microbiology*, 11, 377.
- WHO. (2011). Metode kontrole kvalitete biljnih materijala. Ženeva: Svjetska zdravstvena organizacija.
- WHO. (2018). Smjernice WHO-a o dobrim poljoprivrednim i sakupljačkim praksama (GACP) za ljekovito bilje. Ženeva: Svjetska zdravstvena organizacija.
- Wolfender , JL, Marti, G., Thomas, A. i Bertrand, S. (2015). Trenutni pristupi i izazovi za profiliranje metabolita složenih prirodnih ekstrakata. *Journal of Chromatography A*, 1382, 136–164.
- Wong, KH, Abdul Kadir, H. i Ling, SK (2019). Nanotehnologija u biljnoj medicini: Implikacije za kliničku praksu. *Fitomedicina*, 54, 1–9.
- Zhou, Y., Zhang, Y. i Shi, H. (2019). Napredak u procjeni sigurnosti prirodnih proizvoda biljnog podrijetla. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(18), 2992–3007.

