



**Универзитет у Новом Саду  
Пољопривредни факултет  
Департман за фитомедицину и заштиту животне средине**

Кандидат  
Дипл. инж. Милица Мачкић

Ментор  
Проф. др Војислава Бурсић

**ОДРЕЂИВАЊЕ ОСТАКА ПЕСТИЦИДА У  
ЗЕМЉИШТУ ГОЛФ ТЕРЕНА**

Мастер рад

Нови Сад, 2022.

## КОМИСИЈА ЗА ОДБРАНУ И ОЦЕНУ МАСТЕР РАДА

---

**др Војислава Бурсић, ванредни професор**

Научна област: Фитофармација

Универзитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет  
-Ментор-

---

**др Душан Маринковић, доцент**

Научна област: Фитофармација

Универзитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет  
-Председник-

---

**др Ранко Чабиловски, ванредни професор**

Научна област: Агрохемија

Универзитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет  
-Члан-

*Захваљујем се много свом ментору, проф. др Војислави Бурсић и др Горици Вуковић на несебичној помоћи, корисним саветима и сарадњи. Својој породици, хтела бих да одам велико признање на љубави, подршци и могућности да остварим свој циљ.*

## САДРЖАЈ

1. УВОД.....	1
2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ.....	3
2.1 ТРАВЊАЦИ НА ГОЛФ ТЕРЕНУ .....	3
2.2 ПЕСТИЦИДИ .....	6
2.3 СУДБИНА ПЕСТИЦИДА У ЗЕМЉИШТУ .....	7
2.4. ЕКСТРАКЦИЈА ПЕСТИЦИДА У ЗАВИСНОСТИ .....	12
ОД КАРАКТЕРИСТИКА ЗЕМЉИШТА.....	12
3. ЗАДАТАК И ЦИЉ РАДА.....	14
4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ РАДА .....	15
4.1 ХЕМИКАЛИЈЕ И РЕАГЕНСИ .....	15
4.2 ОПРЕМА И ПРИБОР.....	15
4.3 ПРИПРЕМА ОСНОВНИХ И РАДНИХ РАСТВОРА .....	16
4.4 ПАРАМЕТРИ ВАЛИДАЦИЈЕ.....	17
4.5 УЗОРКОВАЊЕ УЗОРАКА ЗЕМЉИШТА.....	19
4.6 ЕКСТРАКЦИЈА ПЕСТИЦИДА ИЗ УЗОРАКА.....	21
4.7 УСЛОВИ ХРОМАТОГРАФСКОГ РАЗДВАЈАЊА .....	22
5. РЕЗУЛТАТИ РАДА И ДИСКУСИЈА.....	23
5.1 ВАЛИДАЦИОНИ ПАРАМЕТРИ .....	24
5.2 АНАЛИЗА УЗОРАКА.....	29
6. ЗАКЉУЧАК.....	38
7. ЛИТЕРАТУРА.....	40
ПРИЛОГ .....	44

## ОДРЕЂИВАЊЕ ОСТАКА ПЕСТИЦИДА У ЗЕМЉИШТУ ГОЛФ ТЕРЕНА РЕЗИМЕ

У раду је примењена валидована мултирезидуална LC-MS/MS метода одређивања флудиоксона, тиаклоприда, фенпропиморфа, боскалида, ципродинила, прохлораза, тебуконазола, пропиконазола, 2,4-D, пираклостробина, бентазона, трифлуксистробина, имазамокса, имазетапира, дикамбе, пендиметалина, халоксифопа и 2,4,5-T у земљишту у складу са SANTE/12682/2019 документом. Валидована метода је примењена за анализу дванаест узорака земљишта са травњака голф терена у Жабљу и Београду. На оба голф терена имазамокс је детектован у највећој концентраци (2,28 mg/kg у Београду и 2,22 mg/kg у Жабљу), док су имазетапир и хелоксифоп били присутни у свим узорцима земљишта у Жабљу, а хексифоп и имазетапир у земљишту у Београду. Детекције пестицида су износиле 37,5% од анализираних узорака земљишта у Београду, док је 33,3% детекција било изнад вредности од 0,1 mg/kg. У Жабљу је било детектовано 54,17% остатака пестицида од укупних могућих, а 17,95% детекција је било изнад 0,1 mg/kg.

## DETERMINATION OF PESTICIDE RESIDUES IN GOLF COURSE SOIL SUMMARY

A validated multiresidual LC-MS/MS method for the determination of fludioxonil, thiacloprid, pyraclostrobin, fenpropimorph, boscalid, cyprodinil, prochloraz, tebuconazole, propiconazole, 2,4-D, bentazone, trifloxystrobin, pefloxistrobe and 2,4,5-T in soil according to SANTE/12682/2019 was done. The validated method was applied for the analysis of twelve soil samples from the golf course lawns in Žabalj and Belgrade. Imazamox was detected in the highest concentration levels on both golf courses (2.28 mg/kg in Belgrade and 2.22 mg/kg in Žabalj), imazethapyr and heloxyfop were present in all soil samples in Žabalj while heloxifop and imazethapyr were found in all soil samples in Belgrade. The pesticide detections were in 37.5% of the analyzed soil samples from Belgrade, while 33.3% of detections were above the 0.1 mg/kg. In Žabalj 54.17% of the total possible pesticide residues was detected, out of which 17.95% was above 0.1 mg/kg.

# 1. УВОД

Потреба за уређењем простора око објеката становања одувек је била присутна код људи. Саставни део уређених простора је квалитетан и леп травњак. Затравњене површине су такође коришћене за спорт и рекреацију. Голф је један од ретких спортова чије се површине за игру савршено уклапају у постојећи природни амбијен и чине једне од најлепших паркова природе. Заснивање, мере одржавања и неге травњака голф терена изискују велику бригу о одржавању травњака, а посебно на деловима терена на којима се активно игра. Зато се у САД-у развила посебна индустрија која подразумева производњу и одржавање специфичних травњака и других покривача земљишта, који су укључени у спортске активности, декорацију и рекреацију (Ерић и Ћупина, 2016).

Штетни организми травњака као што су корови, гљиве и бактерије као проузроковачи болести, неки инсекти и други деструктивни организми веома негативно могу да утичу на естетску и функционалну вредност травњака. Ови организми представљају неповољне факторе за узгој травњака. Када се штеточине спомињу, неизбежна је употреба пестицида како би квалитет травњака остао на високом нивоу. Правилно коришћење пестицида као део доброг програма заштите обезбеђује травњак какав захтевају голф терени (Turgeon, 2008).

Ефективна контрола штеточина не значи њихову потпуну елиминацију. То једноставно значи смањење претходне популације или њене активности на ниво који не оштећује травњак или утиче на његов квалитет. Присуство неколико инсеката на травњаку не захтева тренутну употребу инсектицида, али услед пренамножења популације инсеката употреба средстава за заштиту биља је неминовна. Проблеме које изазивају поједине штетни организми који се константно јављују и изазивају неповратне штете, тако да је превентивни приступ заштите неопходан. Пример су проузроковачи пегавости и пепелница које се на делу травњака око рупе, услед интезивних услова одржавања, стварају идеални услови за њихово стално присуство. Историја ових болести показује да наносе велике штете уколико се превентивно не третирају фунгицидима (Turgeon, 2008). Међутим, већина штеточина треба да се посматра до појаве симптома који указују на неопходност примене хемијског третмана.

Након апликације пестицида, идеално би било када би они остали на месту третирања и обавили улогу за коју су намењени те након тога, деградирани у мање штетне метаболите. Међутим, у стварности се ови процеси не одвијају баш тако (Asensio-Ramos et al., 2010). Под утицајем кретања ваздуха или воде молекули преосталог пестицида испаравају у атмосферу, испирају се у дубље слојеве земљишта или се спирају линеарно по површини земљишта (Ђурковић, 2011).

Све наведено указује на неопходност праћења судбине пестицида приликом одржавања трављака голф терена. Одређивање остатака пестицида у земљишту под теренима за голф, као крајњи циљ истраживања, представља полазну основу за процену у којој мери су играчи голфа, током боравка на терену, изложени негативном деловању остатака пестицида.

## 2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

### 2.1 ТРАВЊАЦИ НА ГОЛФ ТЕРЕНУ

Порастом животног стандарда човек настоји да у свом окружењу има што више уређеног простора и зеленила, чију основу чине травњаци, те тако налази излаз из бетонског сивила. Са друге стране, окретањем људи ка здравом животу и спорту, расте интересовање за заснивањем квалитетног травњака за посебне намене као што су травњаци игралишта, паркова, окућница и других простора.

Жеља за учествовањем у спорту у којем нема јурњаве нити стреса, довела је до тога да све већи број људи жели да игра голф. Број голф терена се последњих година повећава. На пример, процењује се да у Сједињеним Америчким Државама има приближно 16.000 голф терена. У земљама југоисточне Азије, Тајланду, Млезији, Индонезији и на Филипинима популарност голфа довела је до ширења голф туризма где су голф терени постали централни део многих пројеката развоја хотела и одмаралишта. У Малезији је и сада тренд да се голф терени користе као саставни део стамбених пројеката (Tahir, 2010).



Слика 1. Nacional Sultan Golf Club



У просеку само 24% површине типичног голф терена се користи и одржава према одређеним критеријумима као део захтева за играње. Осим различитих типова физичких структура које се могу изградити на лицу места, већина остале површине голф терена се одржава слабијим интензитетом и тежи се задржавању изгледа којег је природа створила (Слика 1).

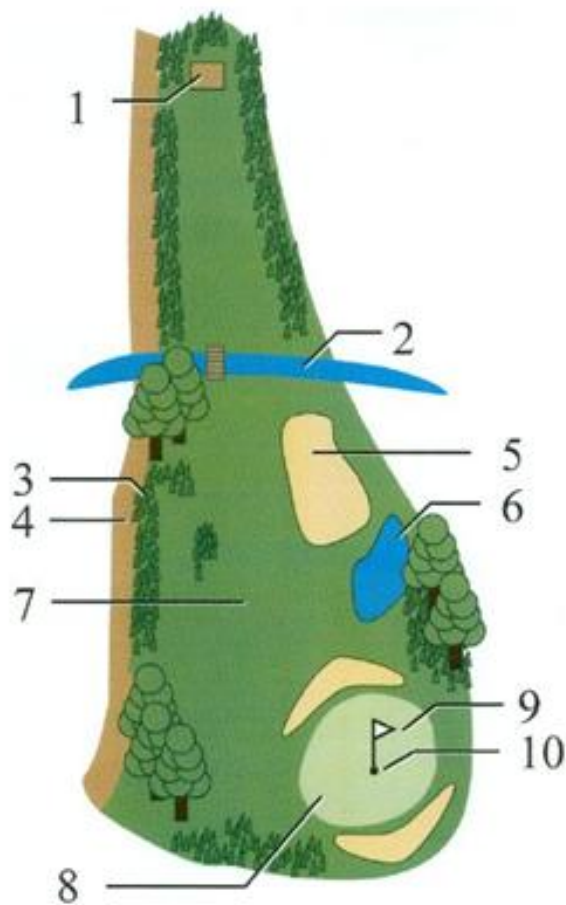
Планирани и одржавани терени за голф нуде разноврсне функционалне користи за целокупну заједницу, поред физичких и менталних здравствених користи које пружа сама игра. Голф терени доводе до:

- смањења топлоте у урбаним срединама кроз процеса хлађења (транспирације) травњака,
- спречавања ерозије земљишта,
- смењења буке и загађења ваздуха,
- пружа повољно станиште биљном и животињском свету,
- смањења популације штеточина попут крпеља, који су често преносиоци разних људских и животињских болести,
- замењују раст многих алергених коровских биљака (Beard, 2018).

Травњаци на голф теренима су врло захтевни било да је реч о заснивању новог или одржавању постојећег. Посебно се мора водити рачуна о деловима терена на којима се активно игра голф (Слика 2). То су пре свега старт (tee box), стаза (fairway) и површина око рупе (green).

**Старт** или пуцалиште је назив површине са којих се ударају почетни ударци. Овај део игралишта је доста мали (500-600 m<sup>2</sup>), али веома изложен оштећењима приликом првог ударца и кретањем играча по њему. Зато је на овом делу терена травњак густ, високе покривности и толерантан на гажење и ниско кошење. Следећи део травњака је **стаза** која је уједно и највећа травната површина голф терена. Чини 40% површине терена и налази се између старта и дела у којем је рупа. Може да износи неколико хиљада m<sup>2</sup>. По овом делу травњака голф играчи се крећу пешке или возилима и изводе своје ударце током игре. Стаза је често разних конфигурација терена (равна, валовита, брежуљкаста) и слична је фудбалским теренима по захтевима за негу и одржавање. Најважнији део голф игралишта,

по коме се често оцењује квалитет травњака терена, је део где се завршава игра убацивањем лоптице у рупу. Тај део је **површина око рупе**. Лаганим ударцима, лоптица се котрљајући по најфинијем травњаку убације у рупу, тако да нема оштећења травњака штапом испуцавањем лоптице као у претходним деловима терена. Али због врло честог ниског кошења, као и великог интезитета гажења, овај део травњака захтева највећу меру неге (Ћирић и сар., 2016).



**Слика 2.** Делови голф терена: 1. старт, 2. водени хазард, 3. површина око стазе, 4. стаза за аутиће, 5. песак, 6. водени хазард, 7.стаза, 8. површина око рупе, 9. позиција заставице, 10. рупа (Salgot et al., 2012)

С обзиром на високе и специфичне захтеве травнати делови голф терена, морају имати највећи могући третман у нези и одржавању. Поред функционалности, морају да задовоље и естетску улогу. Уопштено говорећи, травњаци се скоро свакодневно наводњавају и често

хране ђубривима у циљу подстицања раста биљака. Поред тога, на травњаку се користе средства за заштиту биља у дозвољеним количинама у контроли штете проузроковане инсектима, коровом и болестима које преносе гљивице, бактерије, вируси и друге штеточине. Све ове мере неге су потребне да би се одржала висококвалитетна травна површина за игру (Beard, 2018).

Пре употребе пестицида, на травњаку треба да се уочи да ли су оштећења која су изазвана штеточинама у довољним мерама велика да би се морало аплицирати одговарајуће средство за заштиту биља. У неким случајевима, оштећења која су настала на травњаку могу бити изазвана комбинацијом више фактора као што су недостатак храњива, воде, висока температура и друго. Пажљиво праћење симптома и благовремена примена одговарајућих пестицида могу спречити значајно пропадање травњака уз мању потрошњу пестицидних препарата и очување животне средине (Turgeon, 2008).

## **2.2 ПЕСТИЦИДИ**

У последњих шездесет година, од тзв хемијске револуције, пестициди су заједно са вештачким ђубривима постали најтраженији производи у пољопривреди. Пестициди представљају средства намењена за спречавање, сузбијање или контролу штетника зоогеног порекла (инсекти, прегљеви, пужеви, нематодe, глодари) укључујући и векторе хуманих и анималних болести. Исто тако пестицидима се контролишу фитопатогени микроорганизми, проузроковачи биљних болести, гљивичног, бактеријског и виралног порекла, као и нежељене врсте биљака (корова), који изазивају штету у време вегетације, производње, прераде, складиштења, транспорта пољопривредних култура и намирница (Шовљански и Лазић, 2007).

Правилна и правремена примена, као и одговарајући избор пестицидних препарата, обезбеђује сигурну заштиту од штеточина, високе приносе, здрав усев, висококвалитетан састав и уштеду у радној снази. За разлику од већина загађујућих материја које се у спољну средину уносе без одређеног циља, средства за заштиту биља се примењују намерно са

циљем да помогну човеку у борби против штетних биолошких агенаса који се могу појавити током производног процеса (Стајковац и сар., 2009).

Тренутно постоји више од 1055 активних материја регистрованих као пестициди, формулисани у облику различитих пестицидних препарата (Julien, 2015). Најзначајније групе пестицида су хербициди, фунгициди и инсектициди. Са становишта загађености земљишта, највећи значај имају хербициди који се примењују преко земље, мање фунгициди и инсектициди који у земљиште могу доћи посредно (Ковачевић и сар, 2011). Од целокупне примењене количине пестицида, само 10-15% доспе до циљаног организма. Остатак испарава у ваздух, или се испира у земљиште или воду.

У развијању нових пестицида тежи се ка синтези једињења која ће имати потпуну ефикасност и селективност, довољну дужину задржавања и повољне токсиколошке и екотоксиколошке карактеристике, како би имали што мањи нежељени утицај на животну средину у целини (Радивојевић и сар., 2009).

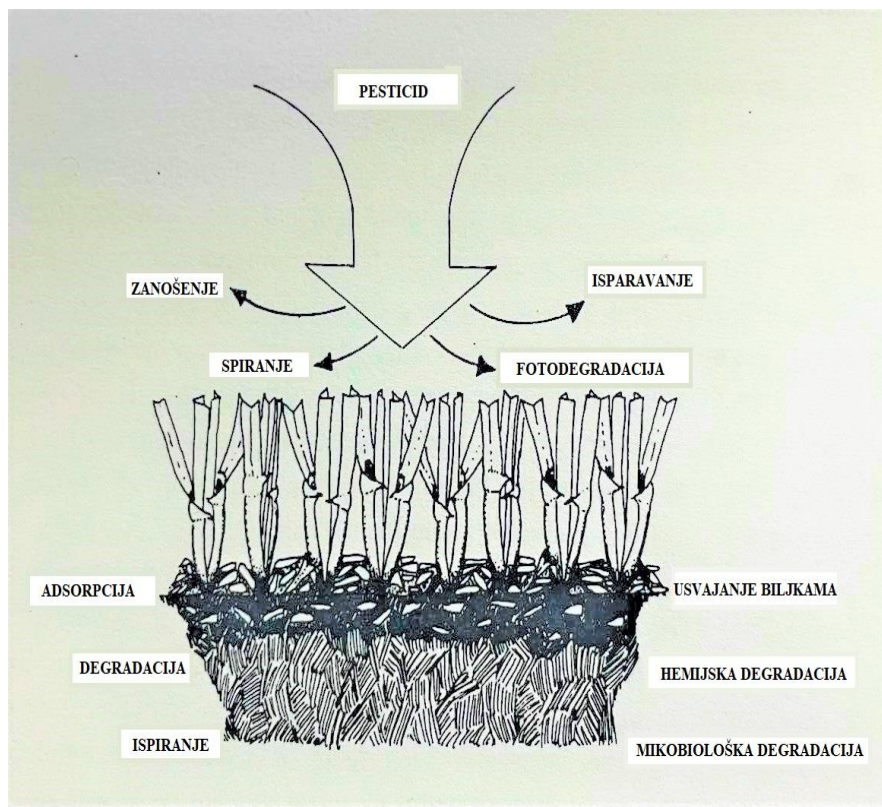
Пестициди у земљишту доспевају директним или индиректним путем. Директним путем као последица контролсане, намерне примене при сузбијању штетних организама у/на земљишту. Ова примена спроводи се различитим формулацијама, пре и током сетве, сетвеним материјалом, с минералиним ђубривима, у време вегетације и друго. Индиректним путем доспевање се дешава заливањем или наводњавањем водом контаминираном пестицидима, површинским и подземним водама, као и спирањем са третираних биљака. У земљиште доспева пестицид намењен биљкама у зависности од величине, површине, грађе и врсте биљака, афинитета хемијског средства према биљној површини, као и технике примене. На површину земљишта доспева у биљци метаболисан, делом разграђен пестицид. Такође, пестициди могу доспети у земљиште приликом заносења при третирању суседних култура, авио третманима, струјом ветра или кишом (Sánchez-Bayo, 2021).

### 2.3 СУДБИНА ПЕСТИЦИДА У ЗЕМЉИШТУ

Након апликације пестицида, његова судбина у животној средини зависи од фактора спољне средине. Ови процеси су комплексни и динамични, а зависе од климатских

(температура, влажност и ветрење), абиотичких фактора земљишта (текстура, минерали, глине и вредност рН) и биотичких фактора земљишта (микробиолошка маса и биолошка разноврсност) (Граховац, 2016). Изложеност пестицидима играча голфа или људи који су у близини може бити директна кретањем кроз или додиривањем травњака или индиректна заношењем пестицида у ваздуху или воденим путевима, подземним водама и остацима у земљишту (Jeffery Doherty, 2017). Због потенцијалне дужине трајања и ефеката које могу произвести, најзначајнији процеси кретања и трансформације пестицида су они који се дешавају у земљишту. Без обзира да ли у земљиште доспевају директним или индиректним путем, даља судбина пестицида у овом матриксу, зависи ће од међусобног дејства низа сложених процеса (Ђуровић, 2011).

На судбину пестицида у животној средни утичу процеси који се могу груписати у три целине (Слика 3): адсорпциони процеси (везивање пестицида за минералну и органску материју земљишта), деградациони процеси (хемијска, фотохемијска и микробиолошка) и транспортни процеси (испаривање, испирање, спирање и усвајање од стране биљака).



Слика 3. Процеси који утичу на судбину пестицида у животној средини (Turgeon, 2008)

### Адсорпција пестицида

Под адсорптивном способношћу земљишта подразумева се особина да везује разне чврсте, течне и гасовите супстанце или да увећава њихову концентрацију на површини колоида. При томе треба имати у виду да се у земљишту дешавају и апсорпциони процеси који подразумевају везивање пестицида за течну фазу тј. земљишни раствор, који између осталог садржи и растворену органску материју. Познато је да се до 80% од унесених количина пестицида адсорбује у површинском слоју и тако искључује кретање пестицида по профилу земљишта. У адсорбованом стању већина пестицида се практично не подвргава разлагању и дужина њиховог живота значајно се продужава (Јањић, 2005). Ово заузврат одговара и повећању резидуа пестицида. То значи да се накупљају веће количине пестицида после више апликација.

Способност пестицида да се адсорбује за честице земљишта и њихова тенденција да се десорбује са истог, сматра се значајним чиниоцем који утиче на контаминацију земљишта и подземних вода. На процес адсорпције утичу разни фактори који се односе на карактеристике земљишта (минерални састав, садржај органске материје, хемијски састав земљишног раствора) и физичко-хемијске карактеристике пестицида (структура молекула, наелектрисање, растворљивост). Земљишта са високим садржајем органске материје и глине, имају велик потенцијал за сорпцију пестицида (Ћућуз, 2016).

Адсорпциона моћ утиче на способност премештања пестицида дуж профила земљишта, на његову биоактивност, постојаност, биоразградњу, испирање као и на процес испаравања. Адсорпција пестицида за честице земљишта се може сматрати као први корак који води до њихове хемијске деградације. Често се један или више корака деградације одвијају хемијским путем, док се следећи кораци одвијају микробиолошки (Børgesen et al., 2015).

С обзиром да се детоксикациони механизми, као што су мобилност, деградација (пре свега микробиолошка) и усвајање пестицида биљкама тј. циљаним организмима, односе само на слободну фракцију молекула пестицида, може се сматрати да је адсорпција најважнији процес који одређује судбину пестицида у земљишту (Tiryakil and Temur, 2010).

### Деградација пестицида

Један од главних процеса губитка пестицида након њихове примене је трансформација. Активне материје примењених средстава за заштиту биља након доспевања у земљиште подложни су бројним биотским или абиотским процесима разградње при чему долази до промене хемијске структуре.

Хемијска деградација (абиотичка трансформација) представља разлагање молекула пестицида механизмима у које нису укључени живи организми, при чему су тип и брзина хемијске трансформације, киселост, температура, влажност и састав земљишта, степен адсорпције молекула пестицида за земљишне честице, главни фактори који утичу на степен деградације. Најчешће укључује реакције као што су: хидролиза, јонизација и/или оксидација/редукција.

Микробиолошка деградација (биотичка трансформација) пестицида се дешава под утицајем присутних организама (гљиве, бактерије и други специфични организми) у земљишту (Граховац, 2016). Неки микроорганизми у земљишту способни су да разлажу органске пестициде користећи их као извор енергије и биогених елемената. Током микробиолошке деградације пестицида пожељно је да крајњи процес детоксикације буде комплетна минерализација у једноставна неорганска једињења као што су угљен диоксид и вода. С друге стране, пестициди који су сами по себи мање или више токсичне супстанце, могу штетно да делују на популацију микроорганизма и да доведу до заустављања њиховог развоја, смањења бројности, осиромашења таксономског састава, стварања заједница са нижим степеном разноврсности и смањеном физиолошком активношћу (Радивојевић и сар., 2007).

### Транспортни процеси

Са агрономског аспекта идеално би било да након апликације пестицид остане на месту третирања и обави улогу за коју је намењен, те да се након тога губи са места третирања и деградира у мање штетне метаболите, међутим у пракси се ови процеси одвијају другачије (Asensio-Ramos et al., 2010). Транспортни процеси се односе на миграцију пестицида у спољној средини. Структура земљишта заједно са његовом текстуром (глина, муљ, садржај песка) значајно утичу на транспорт пестицида. Тако на пример земљишта са мањим



садржајем глине и већим садржајем песка омогућују брже кретање воде и растворљивих пестицида заједно са њим. Међутим, знатно је спорије кретање воде, као и растворљивих пестицида у води, кроз слојеве земљишта са већим садржајем глине и органске материје, што може бити један од разлога њиховог лакшег везивања (Fishel, 2005).

После примене средстава за заштиту биља, молекули пестицидне материје извесно време остају на месту апликације, а затим под утицајем кретања ваздуха или воде испаравају у атмосферу, испирају у дубље слојеве земљишта или се спирају латерално по површини земљишта (Ђуровић, 2011).

Транспортни процеси обухватају: испаравање, испирање, спирање и усвајање од стране биљака. Испаравање пестицида са земљишта или са третираних биљних површина представља процес конверзије пестицида из течне у гасовиту фазу. Зависна је првенствено од напона паре али и од низа других фактора као што су: температура, влажности површинског слоја земљишта, струјање ваздуха, сорпциона својства једињења према датом земљишту. Испирање пестицида подразумева вертикално премештање једињења кроз земљишни профил. Овај процес је од изузетног значаја са аспекта заштите животне средине, јер пестициди који се лако премештају у дубље слојеве постају потенцијални загађивачи подземних вода. На интензитет наведеног процеса утичу растворљивост датог једињења у води, његова склоност да се сорбује за земљишне честице, састава земљишта, учесталост и количине падавине и друго. За мобилност пестицидних материја кроз земљишни профил, превасходно је њихова растворљивост у води.

Спирање пестицида представља хоризонтално премештање молекула пестицида по површини земљишта. Овај процес долази до изражаја у случају када је акумулација воде на површини земљишта већа од њеног кретања у дубље слојеве земљишта. Количина пестицида који учествује у овом транспортном процесу зависи од географске карактеристике терена, влажности, климатских фактора (трајање и количина падавина, температура), текстура земљишта и физичко-хемијских особина пестицида (растворљивост, адсорпција...). Усвајање од стране биљака зависи од физичко - хемијских карактеристика пестицида и земљишта (вредност рН, температура, садржај воде и органске материје), биљне врсте и фазе раста биљака (Ђуровић, 2011).



### Перзистентност пестицида

Перзистентност је временски период у којем неки пестицид остаје у земљишту у активном облику, док његове непромењене резидуе могу, али и не морају бити доступне биљци (Константиновић, 2011). Хемијске карактеристике пестицида, попут ниског степена растворљивости у води, а високог у мастима, стабилност на фотооксидацију и низак напон паре су главни елементи који одређују не само ефикасност већ и перзистентност пестицида у животној средини (Kim and Smith, 2001). Перзистентност пестицида често се изражава биолошким полураспадом ( $DT_{50}$ ). Вредност за време полураспада пестицида је важна за разумевање потенцијалног утицаја пестицида за животну средину.  $DT_{50}$  је дужина времена потребног да се разгради половина првобитне количине пестицида. Што је дуже време полураспада, то је већа могућност за његово кретање пестицида (Ћућуз, 2016). На основу перзистентности пестициди се деле на: неперзистентни пестицид са  $DT_{50}$  мањим од 30 дана, умерено перзистентни пестицид са  $DT_{50}$  од 30 до 100 дана и перзистентни пестицид са  $DT_{50}$  већим од 100 дана. Са агрономског аспекта време полураспада је веома важан параметар, који даје информације о преосталим количинама пестицида који би могли проузроковати нежељене ефекте на наредни усев.

Интензивна примена средстава за заштиту биља поред предности често је праћена низом недостатака и неповратним последицама за животну средину. Пошто су пестициди, сами по себи, више или мање токсичне супстанце, њихово присуство у животној средини делује на здравље људи и квалитет животне средине (Радивојевић и сар., 2007).

## **2.4. ЕКСТРАКЦИЈА ПЕСТИЦИДА У ЗАВИСНОСТИ ОД КАРАКТЕРИСТИКА ЗЕМЉИШТА**

Данас постоји велик број доступних, једноставних, брзих и селективних метода одређивања пестицида у земљишту. У поређењу са одређивањем остатака пестицида у узорцима воде и хране, екстракција пестицида из земљишта је компликованија због саме сложености земљишта као матрикса (Fenoll, 2006).

Интеракција земљиште-пестицид може бити веома јака, што отежава издвајање пестицида из овог матрикса. Екстракција органских једињења из узорака земљишта је тешка услед

њихове јаке интеракције са компонентама матрикса, углавном органском материјом и глином (Ivdra et al., 2014; Baloš et al., 2019).

Постоје различите методе екстракције пестицида, које се успешно могу примењивати уз постизање високих приноса екстракције. У последњих неколико деценија, најзаступљенија метода је QuEChERS, која преставља акроним за брзу, једноставну, јефтину, ефикасну, робусну и сигурну методу. Настала је из потребе да се уштеди време припреме узорка, смањи количина токсичних органских растварача и са тим у вези допринесе очувању животне средине. Првенствено је уведена као техника екстракције пестицида из воћа и поврћа (Anastassiades et al., 2003), али је њена примена проширена и на веома компликоване матриксе попут земљишта.

Смернице SANTE/12682/2019 документа, истичу да се анализа екстракта у циљу квантификације анализата, може радити гасном хроматографијом (GC) или данас све заступљенијом, течном хроматографијом (LC) које су повезане са масеном спектрометријом (MS) (Kruve et al., 2008; Бурсић и сар., 2021). За одређивање пестицида и других супстанци, могу бити различити масени спектрометри попут једноструког (MS) или троструког квадруполо (MS/MS), јонског трепа, TOF (time of flight) или орби-трепа. Типичне јонизационе технике су удар електрона (Electron ionisation - EI), хемијска јонизација (Chemical ionization-CI), хемијска јонизација под атмосферским притиском (Atmospheric pressure chemical ionization - APCI) или електро-спреј јонизација (Electrospray ionisation - ESI). QuEChERS метода у основној форми обухвата два корака:

1. течну микро екстракцију помоћу ацетонитрила као растварача, уз додавање соли у циљу формирања границе раздвајања фазе и подешавања вредности pH;
2. пречишћавање матрикса коришћењем сорбената;

Након ова два корака, следи течна (LC) или гасна (GC) хроматографска анализа.

QuEChERS метода је једна од најпопуларнијих техника за детекцију остатака пестицида у различитим матриксама (Вуковић и сар., 2021). Ова метода представља јефтин и прихватљив приступ екстракције, која задовољава потребе мултирезидуалне анализе одређивања остатака пестицида.

### 3. ЗАДАТАК И ЦИЉ РАДА

Задатак рада је валидација мултирезидуалне методе течне хроматографије са тандем масеном спектрометријом (LC-MS/MS) одређивања флудиоксона, тиаклоприда, фенпропиморфа, боскалида, ципродинила, прохлораза, тебуконазола, пропиконазола, 2,4-D-a, пираклостробина, бентазона, трифлуксиробина, имазамокса, имазетапира, дикамбе, пендиметалина, халоксифопа и 2,4,5-T-a у земљишту узоркованом са голф терена, у Београду и Жабљу. Метода за квантификацију пестицида ће бити валидована у складу са смерницама DG SANTE/12682/2019, наиме одредиће се лимит детекције (LOD), лимит квантификације (LOQ), селективност, поновљивост, линеарност, калибрација, ефекат матрикса, принос екстракције и прецизност.

Циљ рада је да се на основу упоређивања детектованих вредности остатака пестицида са важећим прописаним законских нормама у оквиру Службеног гласника 23/94, односно Правилника о дозвољеним количинама опасних и штетних материја у земљишту и води за наводњавање и методама њиховог испитивања, као и Уредбом о граничним вредностима загађујућих, штетних и опасних материја у земљишту (Сл. гласник РС 30/2018 и 64/2019), провери количина присутних остатака пестицида у земљишту голф терена како би се у оквиру неких других истраживања поставила полазна тачка утврђивања утицаја детектованих остатака пестицида на здравље голфера.

## 4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ РАДА

### 4.1 ХЕМИКАЛИЈЕ И РЕАГЕНСИ

У раду су коришћени: аналитички стандарди пестицида флудиоксонил, тиаклоприд, фенпропиморф, боскалид, ципродинил, прохлораз, тебуконазол, пропиконазол, 2,4-D, пираклостробин, бентазон, трифлуксистробин, имазамокс, имазетапир, дикамба, пендиметалин, халоксифоп и 2,4,5-Т произвођача Dr Ehrenstorpher и Syngenta.

Чистоће аналитичких стандарда су приказане у Табели 1.

Карбофуран-D3, концентрације 10 µg/mL, Dr Ehrenstorpher

Ацетонитрил, (Ultra) Gradient HPLC Grade, J.T.Baker C/N 9017 (Netherlands)

Метанол, (Ultra) Gradient HPLC Grade, J.T.Baker C/N 8402 (Netherlands)

Мравља киселина, 98-100%, Honeywell, Fluka C/N 33015

Сирћетна киселина, 100%, Merck (Darmstadt, Germany)

Дејонизована вода, Thermo Scientific, Barnstead Gen Pure UV, Germany

Кит за екстракцију, QuEChERS EN Buffered Extraction kit, Agilent Bond Elut C/N 5982-7650

Кит за пречишћавање, QuEChERS Dispersive SPE kits for Fatty Samples Agilent Bond Elut C/N 5982-5156.

### 4.2 ОПРЕМА И ПРИБОР

Аналитичка вага, AS 120.R2 PLUS Radwag

Ултразвучно купатило, Vabsonic, модел: SB-6LT, Ниш, Србија

Кивете за центрифугирање од 15 и 50 mL

Центрифуга, Hermle Labor Technik, модел: Z207A, Germany

Млин, MRC Laboratory Equipment, UK

Вортекс мућкалица, Velp Scientific, Italy

Хоризонтална мућкалица, LbX instruments, Lin-Pro

Течни хроматограф Agilent 1290 са Agilent 6470 LC/TQ Triple Quadrupole

Колона: Zorbax Eclipse Plus XDB-C18, 2,1x50mm, 1.8µm; Agilent P/N 959757-902

Мембрански филтери, Econofilter, pore size: 0,2 µm, diameter: 13mm; Agilent P/N 5190-5265

Стаклене вијале, 2 mL, 100/pk, Agilent P/N 5182-0716

Сонда за узорковање земљишта до дубине од 30 cm и кофа за хомогенизовање узорака.

### 4.3 ПРИПРЕМА ОСНОВНИХ И РАДНИХ РАСТВОРА

Припрема основних раствор

Аналитички стандарди свих испитиваних пестицида су производи dr. Ehrenstorfer-a.

Основни и радни раствори су припремани растварањем пестицида у ацетонитрилу HPLC чистоће (J.T.Baker).

**Табела 1.** Припрема основних раствора пестицида

Пестцид	Чистоћа (%)	Одвага (g)	V (mL)	C (mg/mL)
Флудиоксонил	99,8	24,7361	25	0,9875
Тиаклоприд	99,9	25,4725	25	1,0179
Фенпропиморф	99,6	29,0071	25	1,1556
Боксалид	99,5	25,2431	25	1,0047
Ципродинил	99,9	24,3265	25	0,9720
Прохлораз	99,6	24,2759	25	0,9671
Тебуконазол	98,8	26,3382	25	1,0409
Пропиконазол	99,8	25,2584	25	1,0083
2,4-D	97,5	28,0001	25	1,0920
пириклостробин	98,2	26,0352	25	1,0227
Бентазон	99,4	25,4100	25	1,0103
Трифлуксистробин	99,9	25,3752	25	1,0140
Имазамокс	98,3	29,6200	25	1,1646
Имазатапир	99,9	24,3375	25	0,9725

Дикамба	99,6	23,9999	25	0,9561
Пендиметалин	98,4	27,5731	25	1,0853
Халоксифоп	99,2	26,3238	25	1,0445
2,4,5-Т	99,1	24,7326	25	0,9804

Основни раствори стандарда пестицида су припремани растварањем основног стандарда у 25 mL ацетонитрила (концентрација  $\approx 1$  mg/mL).

Радни раствори смеше пестицида концентрације 10 и 1  $\mu\text{g/mL}$  су добијени одмеравањем одређене запремина основних стандардних раствора у нормални суд од 10 mL. Стандарди концентрација 10 и 1  $\mu\text{g/mL}$  су коришћени за обогаћивање узорка приликом постављања валидационих параметара у складу са SANTE/12682/2019 документом. Припремљени основни стандарди су чувани у замрзивачу на  $-18$  °C, а радни раствори у фрижидеру на 4 °C.

#### 4.4 ПАРАМЕТРИ ВАЛИДАЦИЈЕ

##### LOD и LOQ

LOQ је одређена експерименталним путем обогаћивањем бланк узорка уз постављање лимита квантификације свих пестицида на 0,01  $\mu\text{g/kg}$ . Анализа узорка је рађена према описаној QuEChERS методи, а граница детекције (LOD) је одређена помоћу MassHunter softvera, на основу односа сигнал/шум  $\leq 5$ . LOD је израчунат на основу односа површине пика и стандардне девијације шума у хроматограму за најнижу концентрацију спајкованог узорка.

LOD претставља најмању концентрацију која се датом методом може утврдити, али не и квантификовати са задовољавајућом поузданошћу. LOQ претставља најмању концентрацију која се датом методом може одредити са задовољавајућом тачношћу и прецизношћу.

Границу детекције и квантификације могуће је одредити на више начина. Један од начина одређивања је да се LOD и LOQ могу дефинисати као концентрације при којима је сигнал битно различит од шума (Једначина 1).

Тада је:

$$\text{LoD} = x_{\text{beg}} + 3 s, \text{ или само: } \text{LoD} = 3 s \quad \text{Једначина (1)}$$

$$\text{LoQ} = x_{\text{beg}} + 10 s, \text{ или само: } \text{LoD} = 10 s$$

Где су:

$s$  – стандардна девијација добијена анализом 5-10 независних слепих проба или узорак са ниском концентрацијом анализата

$x_{\text{beg}}$  - позадински сигнал или шум (background signal, или noise).

Прецизност методе у услову поновљивости (% RSD<sub>r</sub>) (inter day-precision) и репродуктивности (% RSD<sub>r</sub>) (inter day-precision) је испитивана у обогаћеним бланк узорцима у четири понављања на три концентрациона нивоа током истог и различитих дана.

#### Линеарност

Линеарност испитиваних пестицида у земљишту је постављена коришћењем пет калибрациона нивоа, наиме 0,01; 0,02; 0,05; 0,1 и 0,2 µg/mL. Сва одређивања су рађена у два понављања. Због одређивања утицаја матрикса калибрација је рађена у мобилној фази и у матриксу узорка (метода стандардног додатка на узорак). Калибрација стандардног додатка је рађена додавањем стандардне смеше стандарда у узорак пре екстракције, након чега су узорци припремани на исти начин као и реални узорци. Потребно је истаћи да је у сваки узорак додато по 100 µL интерног стандарда пре почетка испитивања.

#### Принос екстракције

Принос екстракције је испитан обогаћивањем узорак земљишта који није садржавао остатке пестицида. Узорци су обогаћивани на два концентрациона нивоа, односно на нивоу лимита квантификације и на средини калибрационог опсега (0,01 и 0,05 µg/mL) у шест понављања, додавањем радног раствора мешавине пестицида у бланк узорак.

#### Поновљивост методе

Поновљивост методе је испитана припремањем једног узорка у шест понављања на истом концентрационом нивоу. Добијени резултати су статистички обрађени помоћу Microsoft

Excel 2013 и добијена вредност %RSD је упоређена са критеријумом прописаним SANTE/12682/2019 користећи Horowitz-ову једначину. Добијена вредност RSDr, RSDR, (%) се пореди са израчунатом RSD (%), односно теоријском релативном стандардном девијацијом (AOAC Peer-Verified Methods Program Manual On Policies And Procedures) (Једначина 2):

$$RSDR < 2(1-0,5\log C)$$

$$RSDr < 2(1-0,5\log C) * 0,67 \quad \text{Једначинаа (2)}$$

Где су:

RSDR – Релативна станардна девијација унутар лабораторијске репродуктивности

RSDr - Релативна станардна девијација поновљивости

#### 4.5 УЗОРКОВАЊЕ УЗОРАКА ЗЕМЉИШТА

Узорковање земљишта је урађено сондом са дубине до 30 cm. По десет појединачних узорака сваког локалитета је стављано прво у кофу ради хомогенизације, а потом је просечан узорак пребачен у PVC кесу запремине три литре. Сваки узорак је обележен и транспортован до лабораторије (Табела 2). Како је потребно увек радити са чистим алатом, приликом преласка на други локалитет (следећег дела голф терена), сонда и кофа су добро очишћени, тако да на њима није било остатака земљишта од претходно узетог узорка.

**Табела 2.** Обележавање узорака

Голф клуб Београд		Голф клуб Центар, Жабалъ	
Број узорка	Опис узорка	Број узорка	Опис узорка
1.	Tee box 1	7.	Tee box 1
2.	Green 3	8.	Green 9
3.	Staza 7, zeleno	9.	Staza 9
4.	Green 7	10.	Green 8
5.	Tee box 7	11.	Tee box 2
6.	Staza 7, žuto	12.	Staza 3

Узорковано је дванаест узорака земљишта (са стаза, „tee box“-а и „green“-а) са голф терена у Београду (Слика 4.) и Жабљу (Слика 5.). По доношењу у лабораторију, узорци су расути



у танком слоју на чистој подлози од филтер хартије и ваздушно осушени. Након сушења, земљишни узорци су самлевени у млину до финог праха.



Слика 4. Тачке узорковања на мапи голф терена у Београду

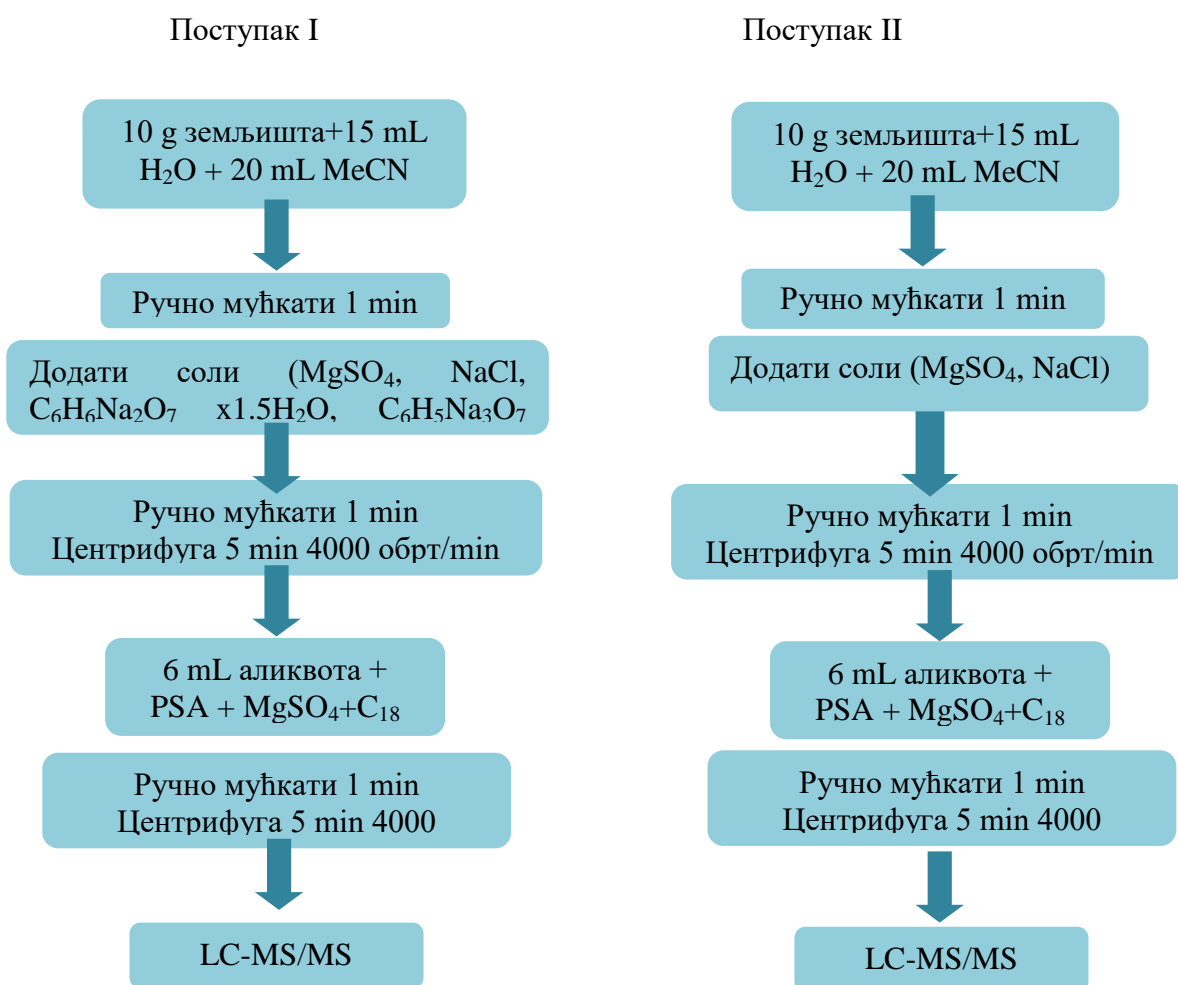


Слика 5. Тачке узорковања на мапи голф терена у Жабљу

#### 4.6 ЕКСТРАКЦИЈА ПЕСТИЦИДА ИЗ УЗОРАКА

Екстракција пестицида из узорака земљишта је урађена QuEChERS методом. Пестициди флудиоксонил, тиаклоприд, фенпропиморф, боскалид, ципродинил, прохлораз, тебуконазол, пропиконазол, пираклостробин, бентазон, трифлуксистробин, имазамокс, имазетапир, дикамба, пендиметалин, халоксифоп и 2,4,5-Т су екстраховани поступком I, док је 2,4-D екстрахован по поступку II (Схема 1).

**Схема 1.** Поступак екстракције (поступци I и II) и пречишћавања екстракта земљишта



## 4.7 УСЛОВИ ХРОМАТОГРАФСКОГ РАЗДВАЈАЊА

LC-MS/MS је радио у режиму као што је табеларно приказано у тексту:

Јонски извор	AJS ESI
Тип јонизације	+ (poz.)
Проток и температура гаса	10 L/min/200 °C
Притисак на испаривачу	30 psi
Опсег мерења маса	m/z 70-2000
Напон капиларе	23000V(+)
Аутосемплер	Agilent 1290Multisampler, модел G7167B
Запремина ињектовања узорка	$V_{inj}=2\mu L$
Бинарна пумпа	Agilent 1290Flexible Pump, модел G7104A
Мобилна фаза:	А:0,1% HCOOH у MeOH; В: 0,1% HCOOH у води
Проток:	0,25 mL/min
Градијент:	0 мин-90%B 1,5 мин- 90%B 8 мин-10%B 9 мин-95%B 10 мин-10%B
Време трајања анализе:	15 мин
Термостат и температура колоне	Agilent 1290 Multicolumn Thermostat, Модел G7116B, 35 °C

## 5. РЕЗУЛТАТИ РАДА И ДИСКУСИЈА

Пре него што се приступи квалификацији и квантификацији пестицида, неопходно је поставити аквизиционе параметре масеног спектрометра.

Хроматографска техника раздвајања, примењена у раду је LC-MS/MS, која подразумева серијски повезане анализаторе. Најчешће се користе два анализатора између којих се налази ћелија за фрагментацију у којој се јони узорка бомбардују молекулима интерног гаса при чему долази до фрагментације јона (MRM). Тада се дефинишу енергија фрагментације (Frag, V) и енергија колизионе ћелије (CE) при којима ће одговор испитиваног пестицида бити највећи за дате услове (Табела 3). Енергија фрагментације испитиваних анализата се кретала од 20 до 30 V.

**Табела 3.** MRM прелази са ретенционим временима (Rt) дела испитиваних пестицида

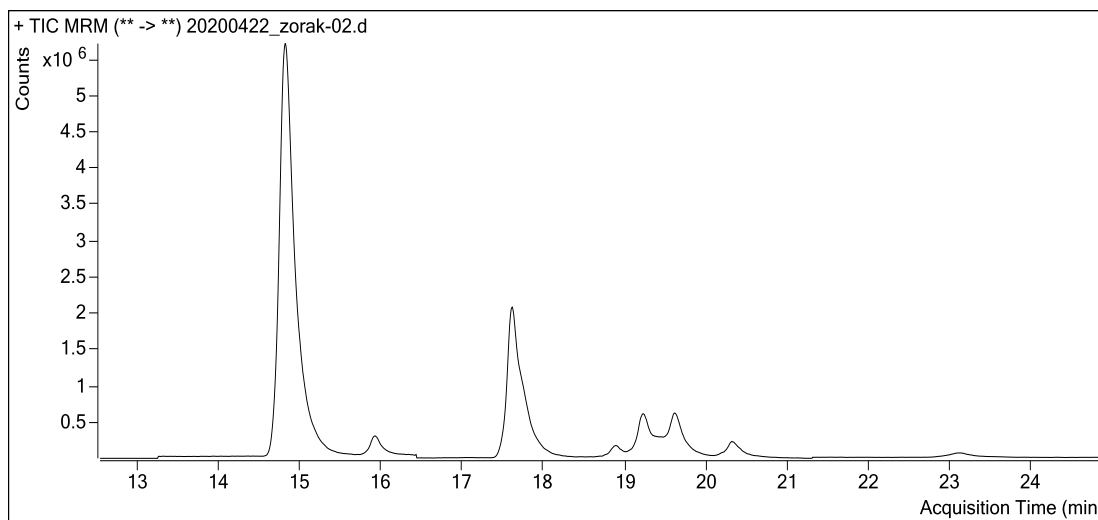
Пестцид	M (g/mol)	Прекурсор јон m/z	Продукт јон m/z	CE (V)	RT (min)
Флудиоксонил	248,19	247	126 169	10 25	17,5
Тиаклоприд	252,72	253	126 186	20 50	14,3
Фенпропиморф	303,48	304,3	147,1 130	32 45	15,9
Боскалид	341,21	343	307,1 279	20 20	17,6
Ципродинил	225,29	226,1	93 108	30 30	17,8
Прохлораз	376,66	376	308 266	40 45	18,9
Тебуконазол	307,82	308,1	70 125	25 35	19,3
Пропиконазол	342,22	342,1	159	42	19,5

			69	26	
2,4-D	221,04	299	161 163	10 30	7,7
Пираклостробин	342,22	388,1	194 163	10 25	19,7
Бентазон	240,28	241	132 197	25 30	2,3
Трифлуксистробин	408,37	409,1	186,1 206,1	26 20	20,2
Имазамокс	305,34	304,2	260 217,2	31 26	2,2
Имазатапир	261,0	288,1	244,1 201,2	35 70	5,4
Дикамба	221,03	219	175 177	5 5	6,5
Пендиметалин	281,30	282,1	212,1 194	10 30	23,14
Халоксифоп	300,4	360	288,1	20 35	7,8
2,4,5-T	183,42	252,9	194,9	30 60	6,6
Карбофуран-ДЗ	219,23	225,1	123 165	15 25	14,8

### 5.1 ВАЛИДАЦИОНИ ПАРАМЕТРИ

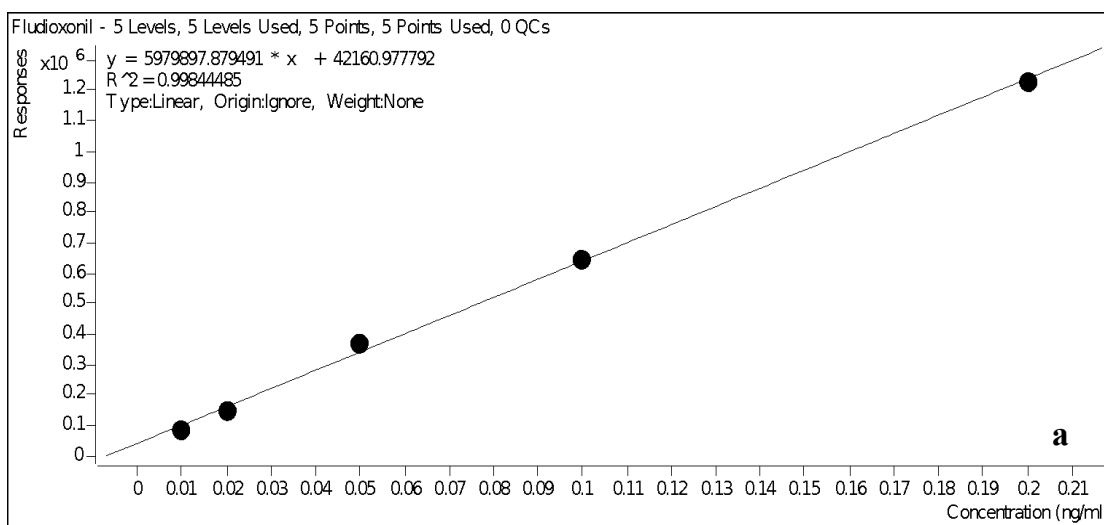
#### Линеарност

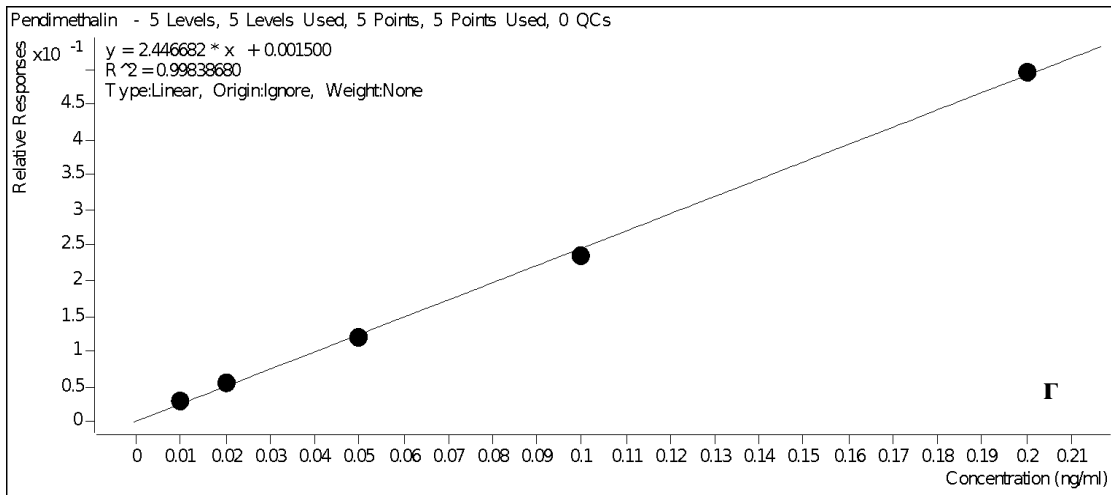
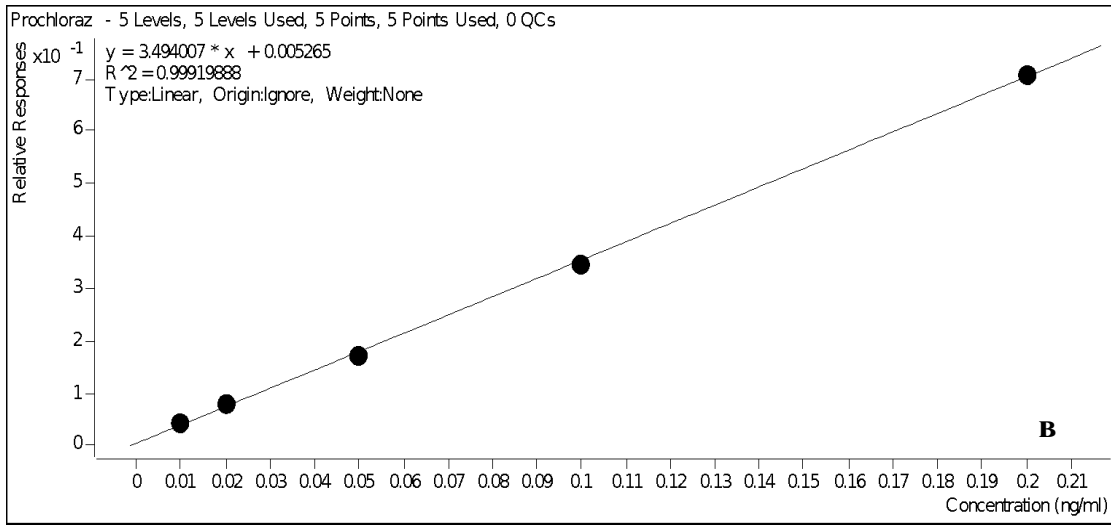
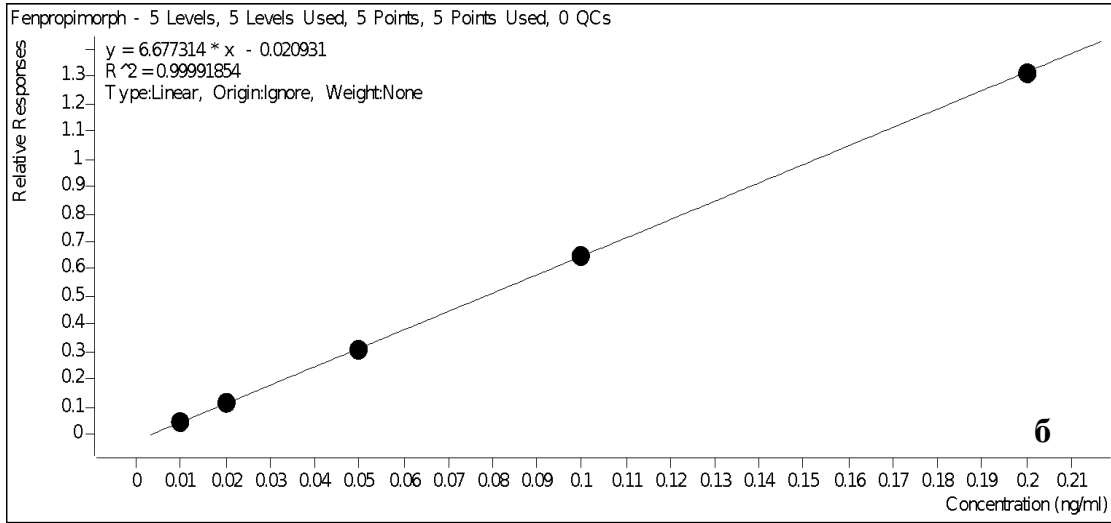
Како би се направиле калибрационе криве сваког испитиваног пестицида, врши се хроматографско снимање (LC-MS/MS) радних стандарда различитих масених концентрација. Током истраживања калибрациони опсег свих испитиваних пестицида, указао је линеарност у интервалу од 0,01 до 0,2  $\mu\text{g/mL}$ . На слици 6. приказан је обогаћен узорак земљишта на калибрационом нивоу од 0,01  $\mu\text{g/mL}$ .

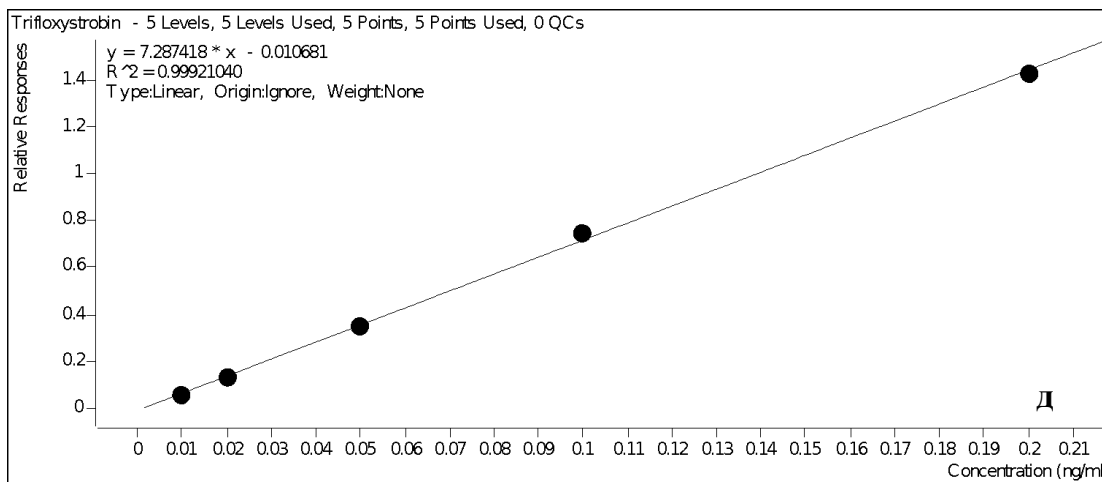


Слика 6. Обогаћен узорак мешавином пестицида на нивоу 0,01 µg/mL

Добијени коефицијенти корелације калибрационих крива ( $R^2$ ) су приказани у табели 4. Калибрационе криве појединих пестицида су приказане на слици 7.







Слика 7. Калибрационе криве (а – флудиоксонил, б – фенпропиморф, в – прохлораз, г – пендиметалин и д – трифлуксистробин)

На основу нагиба калибрационих кривих у растварачу и матриксу израчунат је утицај матрикса на одговор детектора за испитиване анализе (> 15%). Закључено је да се за квантификацију пестицида у земљишту мора користити калибрација у матриксу да би се суперпонирао овај ефекат.

#### LOD и LOQ

Вредности за границе детекције су израчунате помоћу калкулатора „CalculateSignal-to-Noise“ у оквиру QualitativeMussHunterB.03.01 програма (Agilent Technologies, 2010) на основу односа стандардне девијације висине пика и висине шума у хроматограмима за најниже вредност и калибрационог стандарда смеше пестицида у матриксима. За све испитиване пестициде, математички су израчунате вредности LOD, док је постављена вредност LOQ износила 0,01 mg/kg.

#### Тачност и прецизност

Као параметар тачности је испитиван принос екстракције (Rec, %) обогаћивањем контролног узорка (бланк узорак земљишта) на два нивоа обогаћења (0,01 и 0,05 µg/mL) у шест понављања.

Просечни приноси екстракције су приказани у Табели 4.



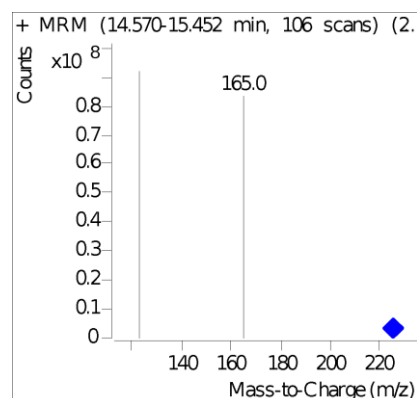
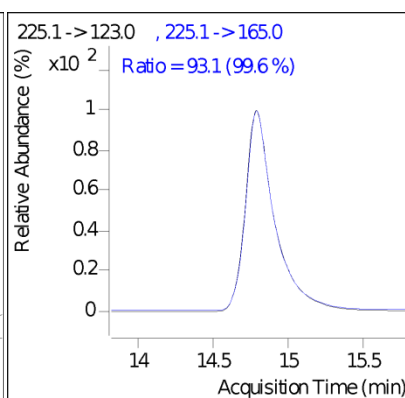
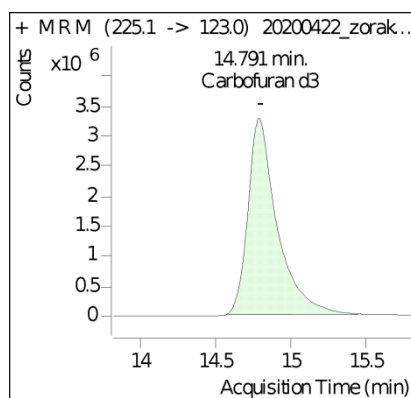
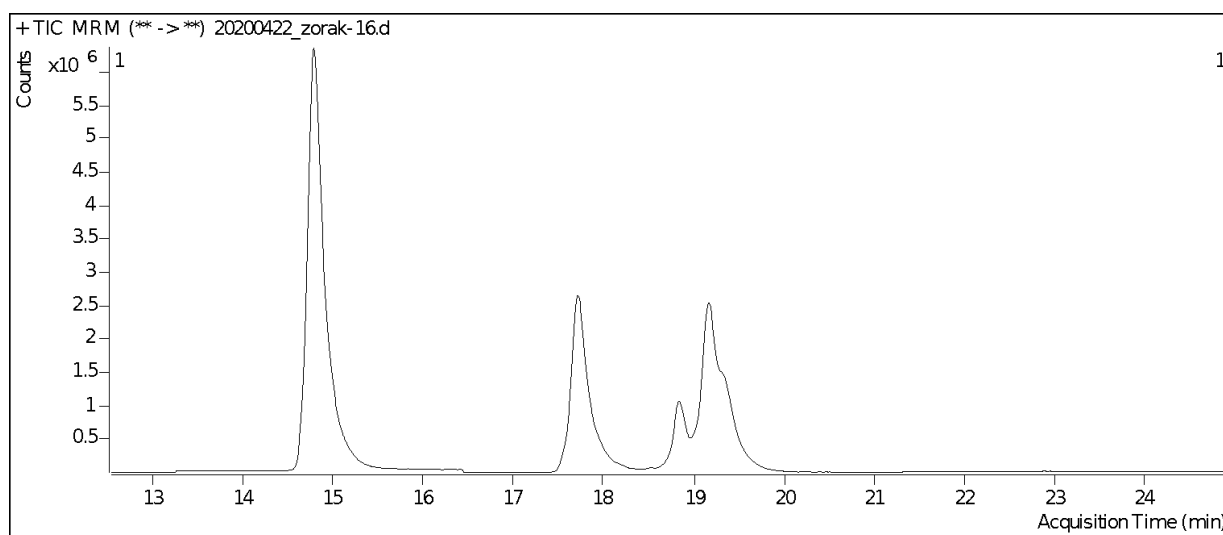
Табела 4. Основни валидациони параметри

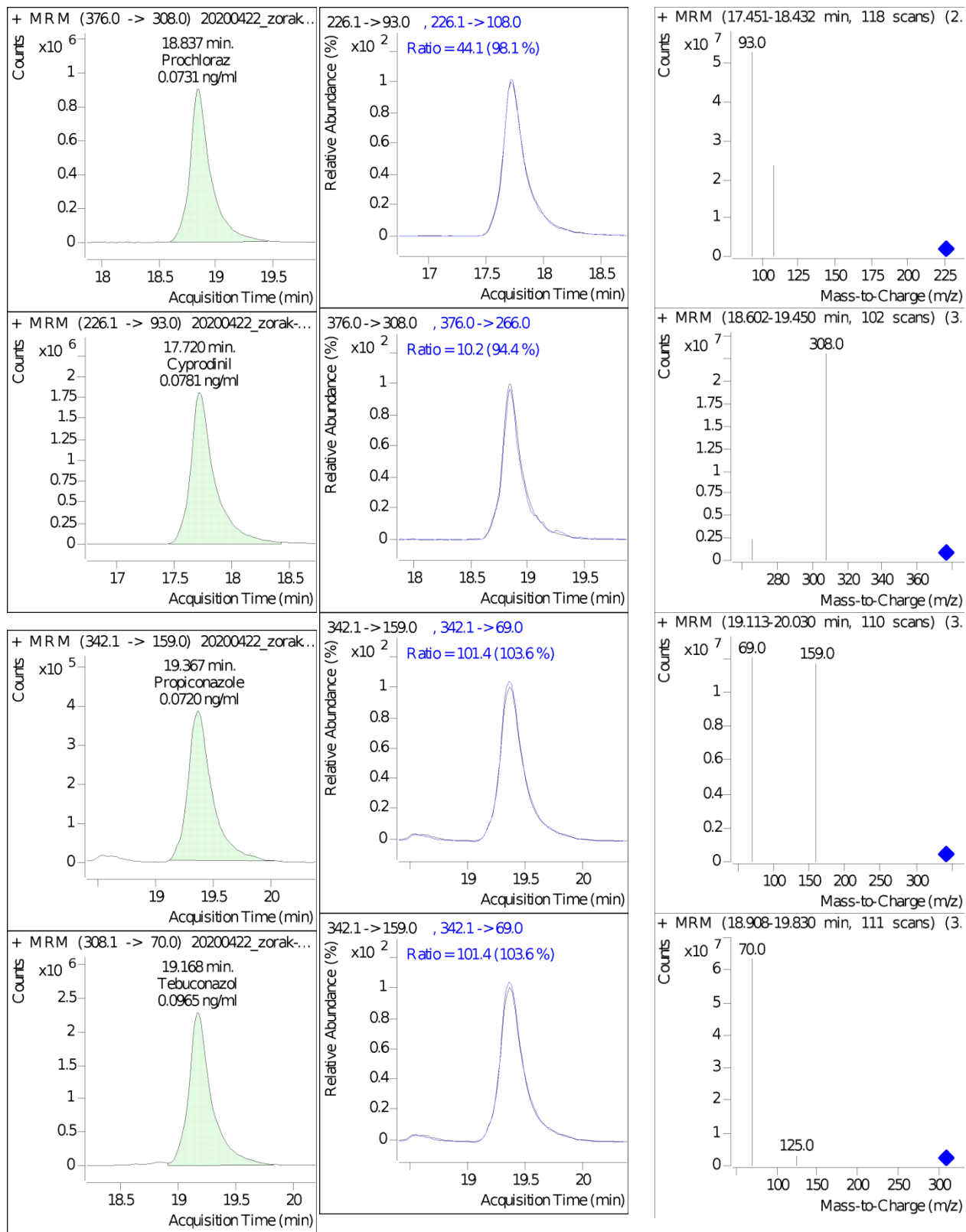
Пестцид	R <sup>2</sup>	Једначина калибрације	Просечан принос екстракције ± RSD, %
Флудиоксонил	0,9984	$y = 5979897,879x + 42160,978$	94,2±6,19
Тиаклоприд	0,9975	$y = 0,033316x + 0,001953$	92,1±4,97
Фенпропиморф	0,9999	$y = 6,677314x - 0,020931$	98,4±12,04
Боксалид	0,9648	$y = 0,446628x + 0,236931$	70,2±14,25
Ципродинил	0,9994	$y = 7,238997x + 0,035254$	81,7±11,77
Прохлораз	0,9992	$y = 3,494007x + 0,005265$	82,3±12,34
Тебуконазол	0,9998	$y = 6,164773x + 0,12867$	90,7±10,19
Пропиконазол	0,9990	$y = 1,657032x + 0,006547$	91,2±9,91
2,4-D	0,9964	$y = 37621,91742x + 15,946660$	91,8±10,32
Пириклостробин	0,9933	$y = 3,900001x + 0,019490$	79,3±7,44
Бентазон	0,9995	$y = 95296,87789x + 933060,54$	97,2±6,98
Трифлуксистробин	0,9992	$y = 7,287418x - 0,010681$	76,9±7,49
Имазамокс	0,9931	$y = 27365,6706x + 14242,7260$	79,4±8,7
Имазатапир	0,9926	$y = 10693,934x + 246,720274$	90,1±11,43
Дикамба	0,9722	$y = 21267,3659x + 24,649462$	100,3±4,95
Пендиметалин	0,9983	$y = 2,446662x + 0,001500$	80,6±9,15
Халоксифоп	0,9934	$y = 9882,767879x - 450,573018$	89,9±6,99
2,4,5-T	0,9964	$y = 43328,64619x + 24,649462$	91,6±5,79

## 5.2 АНАЛИЗА УЗОРАКА

Валидована мултирезидуална анализа остатака пестицида у земљишту травњака голф терена је примењена у анализи реалних узорака узоркованих директно са два голф терена у Србији.

На основу добијених хроматограма (Слика 8) и калибрационих крива, извршена је квантификација пестицида детектованих у узорцима земљишта (Табела 5 и 6). На слици су приказани ТИС и МRM хроматограми детектованих пестицида у присуству карбофурана-Д3 као интерног стандарда.





Слика 8. ТИС и MRM хроматографи узорка земљишта голф терена у Београду (Green 7)

**Табела 5.** Детекција пестицида (mg/kg) анализираних узорака земљишта голф терена у Београду

Пестицид	Tee box 1	Green 3	Стаза 7 *зелено	Green 7	Tee box 7	Стаза 7 *жуто
Флудиоксонил	< LOQ	0,011	< LOQ	0,030	< LOQ	< LOQ
Тиаклоприд	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Фенпропиморф	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Боксалид	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Ципродинил	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,071	< LOQ	< LOQ
Прохлораз	< LOQ	0,016	< LOQ	0,071	< LOQ	< LOQ
Тебуконазол	0,033	0,014	0,096	< LOQ	0,01	< LOQ
Пропиконазол	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,072	< LOQ	< LOQ
2,4- D	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Пираклостробин	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Бентазон	< LOQ	< LOQ	0,282	0,230	0,121	< LOQ
Трифлуксистробин	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Имазамокс	1,329	0,161	< LOQ	< LOQ	< LOQ	2,28
Имазатапир	0,251	0,041	0,031	0,11	0,237	0,044
Дикамба	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Пендиметалин	< LOQ	< LOQ	0,01	< LOQ	< LOQ	0,016
Хелоксифоп	0,067	0,048	0,012	0,011	0,065	0,051
2,4,5-Т	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ

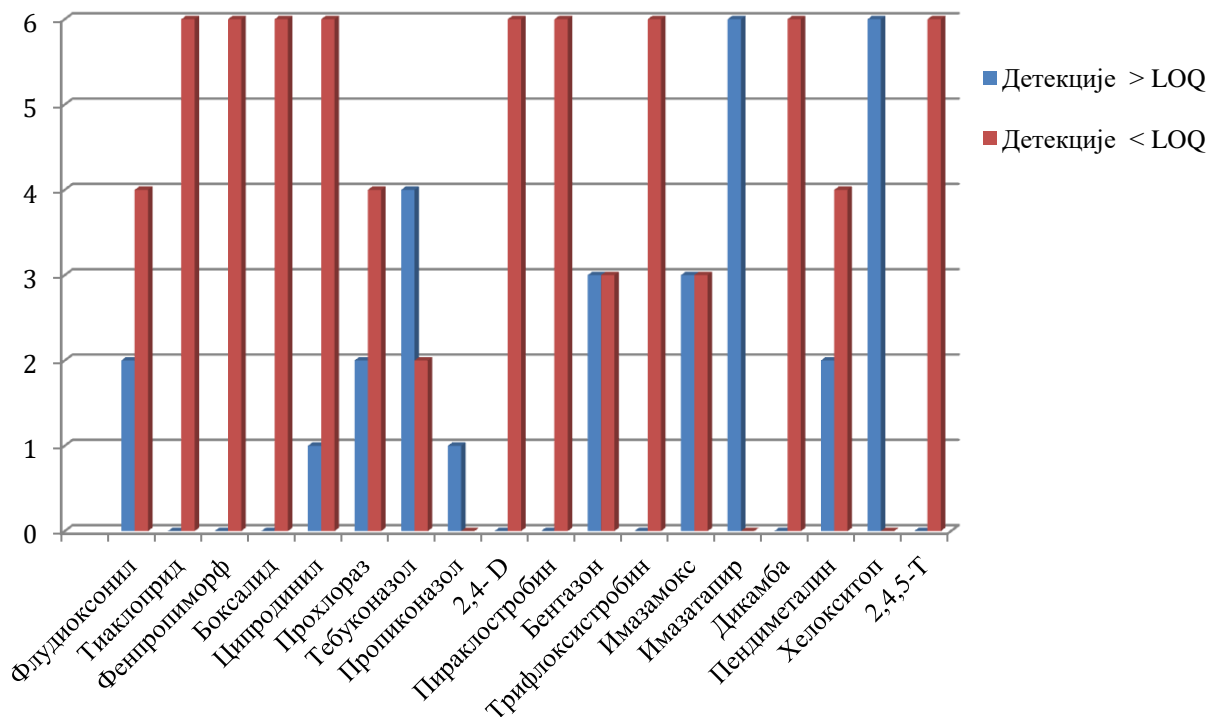
\*< LOQ - вредности испод лимита квантификације

Од укупно осамнаест испитиваних пестицида, осам није квантификовано, док су остали били детектовани у веома малим концентрацијама. На основу детекција, може се видети да је у периоду узорковања имазамокс имао највећу концентрацију (2,28 mg/kg), што је можда

довело до извесне фитотоксичности која се испољила жућењем дела стазе.

На графику један, су приказане детекције пестицида изнад и испод постављеног лимита квантификације од 0,01 mg/kg у земљишту голф терена узоркованог у Београду.

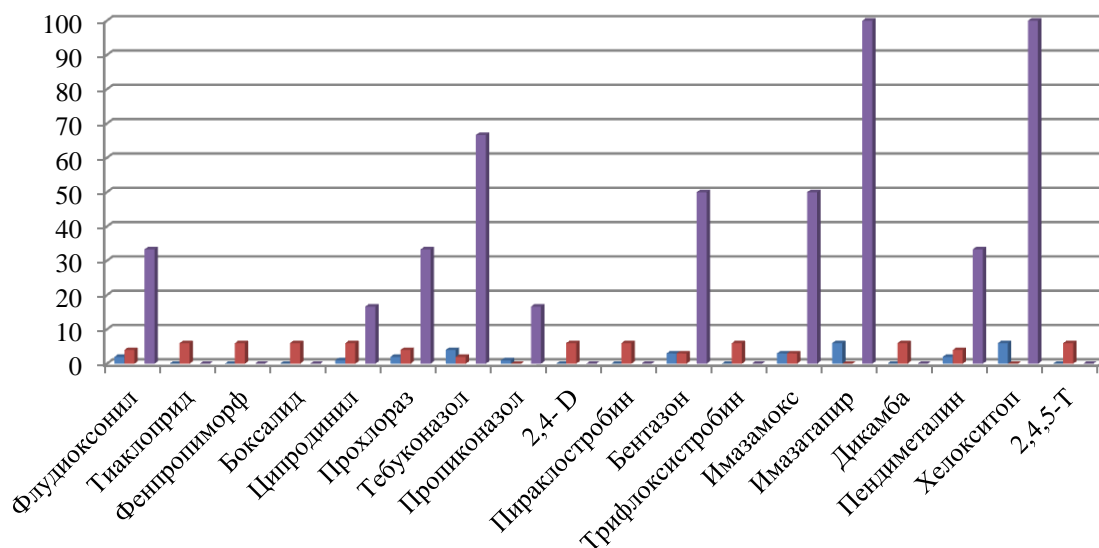
**График 1.** Детекције пестицида у односу на LOQ



Тиаклоприд, фенпропиморф, боксалид, 2,4-Д, пиракlostробин, трифлуксистробин, дикамба и 2,4,5- Т нису детектовани, односно детекције су им биле испод лимита квантификације.

Процентуално присуство детекција испитиваних пестицида у земљишту голф терена у Београду приказана је на графикону 2.

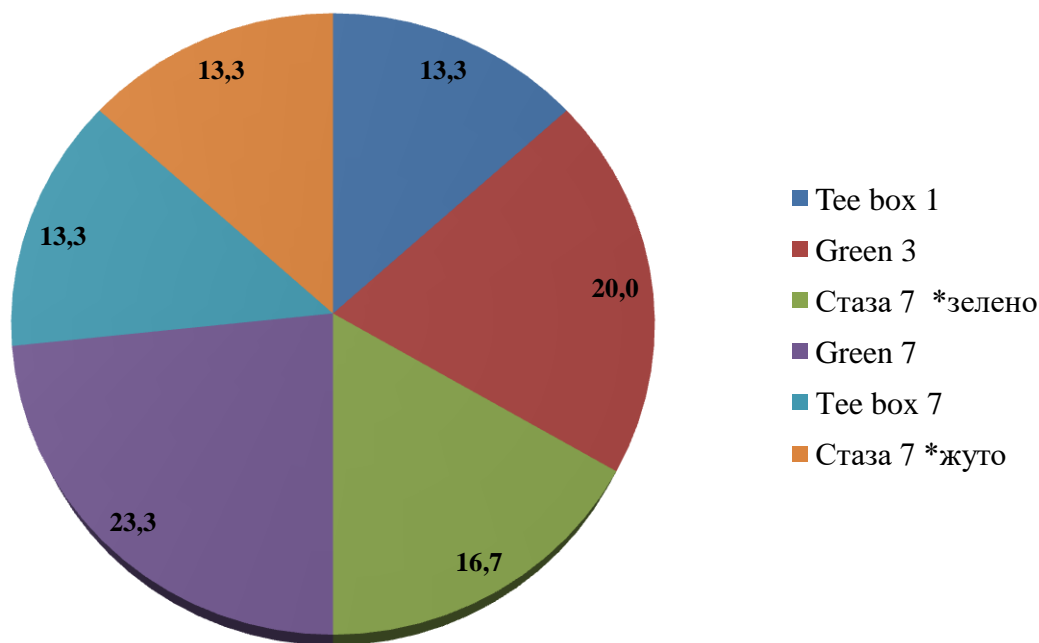
График 2. Присуство појединих пестицида у узорцима (%)



На графику се уочава да су хелокситоп и имазатапир били присутни у свим узорцима земљишта голф терена у Београду. Дикамба, 2,4,5-Т, трифлорксистробин, 2,4- D, боксалид, пиракlostробин, тиаклоприд и фенпропиморф нису детектовани у узорцима.

График 3. приказује процентуални удео свих детекција у зависности од места узорковања земљишта.

График 3. Контаминираност узорка (%)



**Табела 6.** Детекција пестицида (mg/kg) анализираних узорака земљишта голф терена у Жабљу

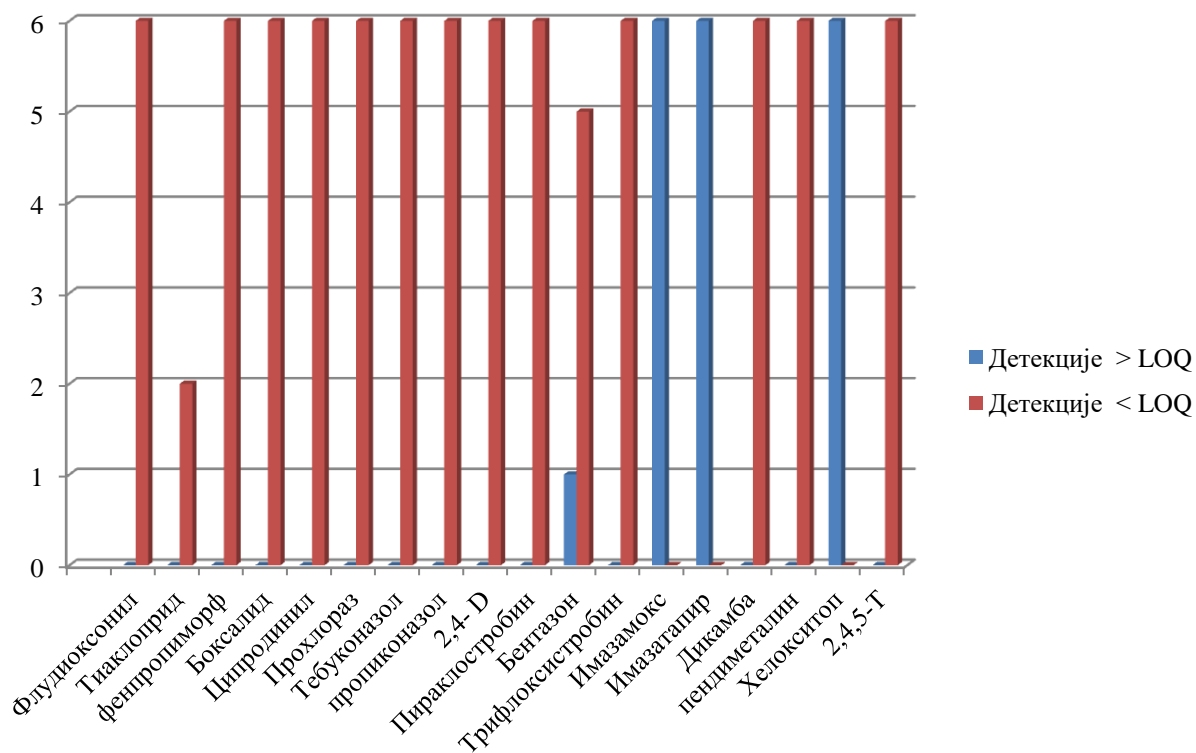
Пестицид	Tee box 1	Green 9	Стаза 9	Green 8	Tee box 2	Стаза 3
Флудиоксонил	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Тиаклоприд	< LOQ	0,026	0,004	< LOQ	< LOQ	< LOQ
фенпропиморф	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Боксалид	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Ципродинил	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Прохлораз	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Тебуконазол	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
пропиконазол	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
2,4- D	0,004	0,005	0,004	0,005	0,002	0,004
Пираклостробин	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Бентазон	< LOQ	0,217	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Трифлуксистробин	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002
Имазамокс	2,217	0,201	0,243	1,626	0,199	1,971
Имазатапир	0,027	0,033	0,049	0,031	0,034	0,043
Дикамба	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,006	< LOQ	< LOQ
пендиметалин	0,001	0,001	< LOQ	0,001	0,001	< LOQ
Хелоксифоп	0,070	0,096	0,048	0,047	0,048	0,051
2,4,5-Т	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,001

\*< LOQ - вредности испод лимита квантификације

Као и на претходној локацији, на голф терену у Жабљу детектовани пестицид са највећом концентрацијом био је имазамокс (2,217 mg/kg).

На графику 4 су приказане детекције пестицида изнад и испод постављеног лимита квантификације од 0,01 mg/kg у земљишту голф терена узоркованог у Жабљу.

График 4. Детекције пестицида у односу на LOQ

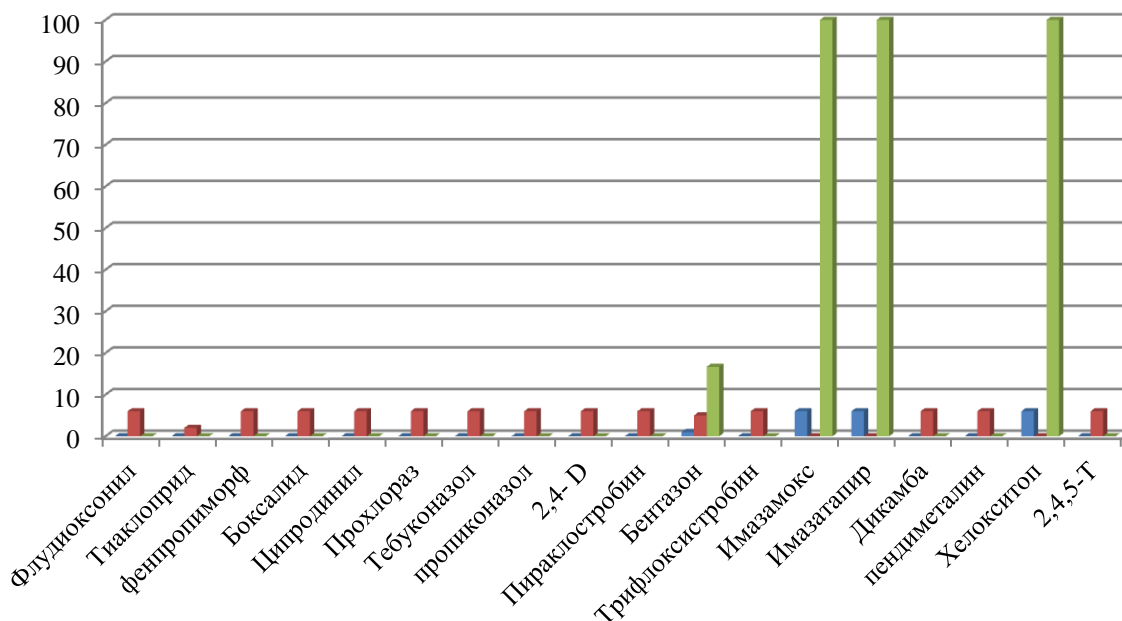


Графички приказ указује да су детекције четири пестицида биле изнад постављеног лимита квантификације (бентазон, имазамокс, имазетапир и хелоксифоп). У питању су хербициди од којих је имазетапир забрањен за употребу, односно одобрење његове примене је повучено одлуком Европске уније, а на основу Директиве ЕС/91/414 (ЕС/2004/129). Доступни подаци указују да се имазетапир фотолизом у земљишту разграђује до половине своје концентрације током 33 месеца, што указује на постојаност овог хербицида без обзира на тип земљишта, пољопривредну праксу и климатске услове (Sondhia et al., 2015). Остали детектовани пестициди су дозвољени за употребу у средствима за заштиту биља.

Процентуално присуство детекција испитиваних пестицида у земљишту голф терена у Жабљу, приказана је на графику 5.



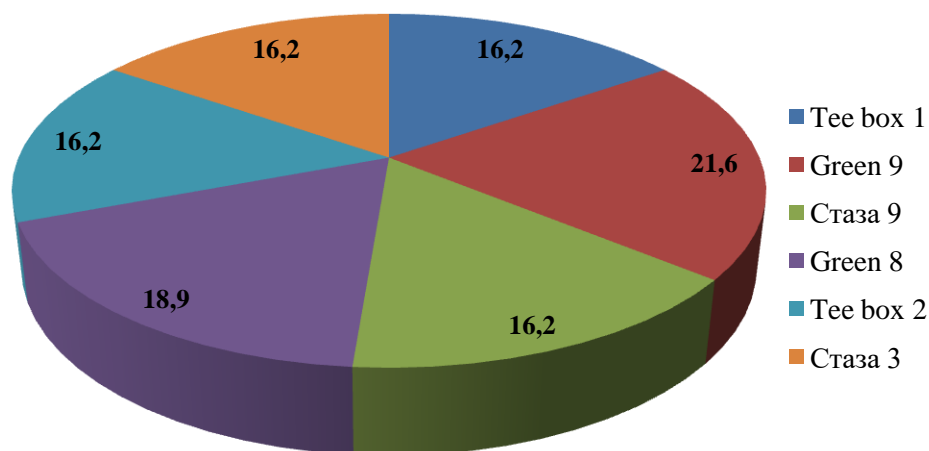
График 5. Присуство појединих пестицида у узорцима (%)



На основу графика се јасно уочава да су имазамокс, имазатапир и хелоксифоп били присутни у свим узорцима земљишта у травњаку голф терена у Жабљу. Флудиоксинил, фенпропиморф, боксалид, ципродинил, прохлораз, тебуконазол, пропиконазол и пиракlostробин нису били детектовани, односно детекција им је била испод лимита квантификације.

График 6. приказује процентуални удео свих детекција у зависности од места узорковања земљишта.

График 6. Контаминираност узорака (%)



У Аризони су изведена испитивања на 47 голф терена на средства за заштиту биља која се користе за заштиту травњака. Студије су показале да највећу категорију пестицида која се користе на овим теренима чине хербициди (83%), затим инсектициди (9,5%), па фунгициди (6,6) и регулатори раста са мање од 1% (Merrigan et al., 1996).

С обзиром да су највећи изазови у заштити травњака управо изазвани упорном појавом коровских биљака, честа примена хербицидних препарата објашњава присутност имазамокса, имазетапира и хелоксифопа у свим узорцима земљишта. Тако да се и резултати наших истраживања поклапају са литературно доступним подацима.

Детекције пестицида у анализираном земљишту не треба повезивати само са применом пестицида него и са контаминираном животном средином. Треба имати у виду да пестициди из воде у коју доспевају спирањем са површине, директним третманима, атмосферским падавинама, десорпцијом из акватичних организама и седимента, при неправилној технологији прскања и неправилним прањем прскалица и заштитне одеће, могу врло лако у зависности од физичко хемијских карактеристика, доспети у земљиште и гајене биљке (Muller et al., 2007).

Многи препарати за заштиту травњака се примењују преко система за наводњавање, што води до задржавања пестицидних једињења у система или њиховој каснијој мобилности на друге крајеве терена. Ово отвара ново поље за будућа истраживања у оквиру рада.

Правилником о дозвољеним количинама опасних и штетних материја у земљишту и води за наводњавање и методама њиховог испитивања, као и Уредбом о граничним вредностима загађујућих, штетних и опасних материја у земљишту (Сл. гласник РС 30/2018 и 64/2019), нису обухваћени испитивани пестициди тако да се на ова документа не можемо позивати у циљу потврде опасности детектованих остатака пестицида.

## 6. ЗАКЉУЧАК

На основу валидације LC-MS/MS методе мултирезидуалног одређивања осамнаест пестицида добијених резултата анализе остатака пестицида у земљишту травњака голф терена у Београду и Жабљу, може се закључити:

- У раду је примењена валидована мултирезидуална LC-MS/MS метода у складу са SANTE/12682/2019 документом, чији су основни параметри валидације након QuEChERS екстракције и пречишћавања износили:  $R^2$  свих испитиваних пестицида у калибрационом опсегу од 0,01 до 0,2  $\mu\text{g/mL}$ , био је изнад 0,99; утицај матрикса је био изнад 15%; за све пестициде математички су израчунате вредности LOD, док је постављена вредност LOQ износила 0,01  $\text{mg/kg}$ ; добијени приноси екстракције су се кретали у интервалу од 70-120% са RSD испод 20%.
- У земљишту голф терена у Београду, од осамнаест пестицида, детектовани су флудиоксонил, ципродинил, прохлораз, тебуконазол, пропиконазол, бентазон, имазамокс, имазатапир, пендиметалин и хелоксифоп у ниским концентрацијама.
- У земљишту голф терена у Жабљу детектовани су тиаклоприд, 2,4-D, бентазон, трифлуксиробин, имазамокс, имазатапир, дикамба, пендиметалин, хелоксифоп и 2,4,5-T у траговима.
- На оба голф терена имазамокс је детектован у највећој концентрацији (2,28  $\text{mg/kg}$  у Београду и 2,22  $\text{mg/kg}$  у Жабљу).
- Имазамокс, имазатапир и хелоксифоп били су присутни у свим узорцима земљишта у Жабљу, док су хексифоп и имазатапир детектовани у Београду.
- Имазатапир је забрањен за употребу Одлуком ЕС/2004/129. Детекције овог хербицида не указују на неминовну примену него на његову перзистентност као што је приказано у многим научним истраживањима.
- Детекције пестицида су износиле 37,5% анализираних узорака земљишта у Београду, док је 33,3% детекција било изнад вредности од 0,1  $\text{mg/kg}$ . Бентазон (0,282; 0,230 и 0,121  $\text{mg/kg}$ ) и имазатапир (0,251; 0,11 и 0,237  $\text{mg/kg}$ ) су имали три детекције, а имазамокс две (1,329 и 2,28  $\text{mg/kg}$ ) изнад поменуте вредности.
- У Жабљу је било детектовано 54,17% остатака пестицида од укупних могућих, а

17,95% су биле изнад 0,1 mg/kg (бентазон у концентрацији 0,217 mg/kg и имазамокс у свим узорцима у интервалу од 0,199 до 2,217 mg/kg).

- Највећи изазов у заштити травњака представља борба против коровске вегетације, зато не чуди детекција остатака хербицида у испитиваним узорцима.
- Детекције пестицида у анализираном земљишту не треба повезивати само са евентуалном применом пестицида него и са контаминираном животном средином. Тумачење резултата треба довести у везу са применом средства за заштиту биља преко система за наводњавање, где се честице пестицида задржавају, што отвара ново поље будућих истраживања.
- Анализе отварају врата испитивањима која би повезала изложеност играча голфа негативном деловању остатака пестицида приликом боравка на голф теренима.

## 7. ЛИТЕРАТУРА

1. Anastassiades M., Lehotay S. J., Stajnbaher D., Schenck F. J. (2003): Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce, *Journal of AOAC*, 86(2): 412-31.
2. Asensio-Ramos M., Hernandez-Borges J., Ravelo-Perez L.M, Rodriguez-Delgado M.A. (2010). Evaluation of a modified QuEChers method for extraction of pesticides from agricultural, ornamental and forestal soil, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396,2307-2319.
3. Baloš M., Bursić V., Vuković G., Đurović-Pejčev R., Zeremski T., Petrović A., Gvozdenc S., Stojanović T. (2019): Carbamate insecticides extraction depending on the soil properties, 25th International Symposium on Analytical and Environmental Problems, Szeged, Hungary, October 7-8, *Proceedings*, 54-58.
4. Børgesen, C. D., Fomsgaard, I.S., Plauborg F., Schelde, K., Henrik, N. (2015): FAte of pesticides in agricultural solis. Dca report No. 062. Aarhus University Departmant of Agroecology Blichers Allé 20 DK-8830 Tjele. Str 9.
5. Beard B. James (2018): *Turf Menagement for Golf Courses*. Second Edition. A Publication of The United States Golf Association.
6. Bursić V., Vuković G., Cara M., Kostić M., Stojanović T., Petrović A., Puvača N., Marinković D., Konstantinović B. (2021): Plant protection products residues assessment in the organic and conventional agricultural production. *Sustainability*, 13, 1075. <https://doi.org/10.3390/su13031075>
7. Vuković G., Stojanović T., Konstantinović B., Petrović A., Špirović Trifunović B., Marinković D., Bursić V. (2021): Skrivena opasnost prisustva korovskih vrsta: Tropanski alkaloidi u hrani i žitaricama, *Biljni lekar* 49(5), 655-665.
8. Ђуровић Р. (2010): Развој и примена метода микроекстракције у чврстој фази за одређивање пестицида у различитим типовима земљишта, Докторска дисертација, Факултет за физичку хемију, Универзитет у Београду.
9. Ђуровић Р. (2011): Процеси који одређују судбину пестицида у земљишту, *Пестициди и фитомедицина*, 26 (1), 9-22.

10. Ђуровић Р. (2011): Микроекстракција у чврстој фази () у одређивању остатака пестицида у узорцима земљишта. Пестиц. Фитомед. (Београд), 26(3). Стр. 177-184. DOI: 10.2298/PIF 1103177D. 2011.
11. EC/2004/129: Commission Decision of 30 January 2004 concerning the non-inclusion of certain active substances in Annex I to Council Directive 91/414/EEC and the withdrawal of authorisations for plant protection products containing these substances.
12. Fenoll J., Hellin P., Marin C., Martinez M., Flores P. (2006): Multiresidue Analysis of Pesticides in Soil by Gas Chromatography with Electron-Capture Detection and Gas Chromatography Mass Spectrometry Detection. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 76:361-372. Science+Business Media, Inc. DOI: 10.1007/s00128-006-0930-1.
13. Fisher F. M., Pesticide-Organism interaction (2005). PI-43 Document, Pesticide Information Office, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.
14. Ivdra N., Herrero- Martin S., Fischer A. (2014): Validation of user- and environmentally friendly extraction and clean-up methods for compound- specific stable carbon isotope analysis of organochlorine pesticides and their metabolites in soils. Journal of Chromatography A., Volume 1355, Pages 36-45. doi: 10.1016/j.chroma.2014.06.014
15. Jeffery Doherty (2017): Golfer Exposure to Pesticides. Doctoral Dissertation. University of Massachusetts Amherst. Pages 2,3.
16. Julien R.P (2015): Pesticides, Encyclopedia of Immigrant Health, pp 1187-1189
17. Јањић В. (2005): Фитофармација, Друштво за заштиту биља Србије, институт за истраживања у пољопривреди "Србија", Београд и Пољопривредни факултет, Бања Лука, стр. 149, 276.
18. Merrigan, Sheila D.; Baker, Paul; Коpec, David; Clark , Mark (1996): Arizona Golf Course Pesticide Use Survery; Collage of Agriculture and Life Science, University of Arizone; Extrenson Publication 895024.
19. Muller K., Magesan G.N., Bolan N.S. (2007): A critical review of the influence of effluent irrigation on the fate of pesticides in soil, Agriculture, Ecosystems & Environment, 120, 93-116.

20. Граховац, Н. (2016): Праћење остатака сулфенилуреа у земљишту у реалним условима применом високо-притицне течне хроматографије. Докторска дисертација. Универзитет у Новом Саду, Технолошки факултет.
21. Kim J., Smith A. (2001): Distribution of organochlorine pesticides in soils from SouthKorea, Chemosphere 43, 137-140.
22. Kruve A., Künnapas A., Herodes K., Leito I. (2008): Matrix effects in pesticide multi – residue analysis by liquid chromatography – mass spectrometry, Journal of Chromatography, Science Direct, 1187(1-2),58-66.
23. Константиновић Б. (2011): Основи хербологије и хербициди. Унервизитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет.
24. Ерић П., Тупина Б., Крстић Ђ., Вујић С. (2016): Травњаци. Унервизитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет.
25. Радивојевић Љ., Шантрић Љ., Станковић-Калезић Р. (2007): Пестициди у земљишту: деловање на микроорганизме. Пестициди и фитомедицин, 22, п. 11-24.
26. Стајкова, Ј., Амичић, Б., Биочанин, Ј. (2009): Пестициди и извори загађења у љивотној средини и значај ремедијације у санацији контаминације. 1st International Conference „Ecological safety in post-modern environment“ 26-27. Јун 2009. Бања Лука, РС, БиХ.
27. Службени гласник РС, бр. 30/2018, Уредба о граничним вредностима загађених, штетних и опасних материја у земљишту.
28. Службени гласник РС, бр. 64/2019, Уредба о граничним вредностима загађених, штетних и опасних материја у земљишту.
29. Службени гласник РС, бр. 23/94 , Правилник о дозвољеним количинама опасних и штетних материја у земљишту и води занаводњавање и методама њиховог испитивања.
30. SANTE/12682/2019, Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed.
31. Salgot M., Priestley G.K., Folch M. (2012): Golf course irrigation with reclaimed water in the mediterranean: A risk management matter, Water, 4. 389-429.
32. Sánchez-Bayo F. (2021): Indirect effect of pesticides on insects and other arthropods, Toxics. 9(8), 177-200.

33. Sondhia S., Khankhane P.J., Singh P.K., Sharma A.R. (2015): Determination of imazethapyr residues in soil and grains after its application to soybeans Journal of Pesticide Science, 40(3), 106–110.
34. Tahir M. Norhayati (2010): Chlorpyrifos and Malation residues in soils of a Terengganu Golf Course. A case of study. Department of Chemical Sciences, Faculty of Science and Tehnology.
35. Turgeon J. Alfred, J. M. Varas (2008): Turfgrass management. Eighth Edition. The Pannsylvania State University Pest Manggement 7, 255-257.
36. Tiryakil O., Temur C. (2010): The fate of Pesticide in the Environment Osman. J. boil. Environ. Sci. 4(10), 29-39 29.
37. Council Directive 91/414/EEC of 15 July 1991 concerning the placing of plant protection products on the market
38. Шовљански Р., Лазић С. (2007): Основи фитофармације. Унервизитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет.
39. Ђућуз М. (2016): Екстракција пестицида у зависности од карактеристика земљишта, Универзитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет.



## ПРИЛОГ

### Преглед табела

Табела 1. Припрема основних раствора пестицида .....	16
Табела 2. Обележавање узорака.....	19
Табела 3. MRM прелази са ретенционим временима (Rt) дела испитиваних пестицида.....	23
Табела 4. Основни валидациони параметри .....	28
Табела 5. Детекција пестицида (mg/kg) анализираних узорака земљишта голф терена.....	31
Табела 6. Детекција пестицида (mg/kg) анализираних узорака земљишта голф терена у Жабљу.....	34

### Преглед слика

Слика 1. Nacional Sultan Golf Club.....	3
Слика 2. Делови голф терена: 1. старт, 2. водени хазард, 3. површина око стазе, 4. стаза за аутиће, 5. песак, 6. водени хазард, 7.стаза, 8. површина око рупе, 9. позиција заставице, 10. рупа (Salgot et al., 2012) .....	5
Слика 3. Процеси који утичу на судбину пестицида у животној средини (Turgeon, 2008)...	8
Слика 4. Тачке узорковања на мапи голф терена у Београду .....	20
Слика 5. Тачке узорковања на мапи голф терена у Жабљу .....	20
Слика 6. Обогаћен узорак мешавином пестицида на нивоу 0,01 µg/mL .....	25
Слика 7. Калибрационе криве (а – флудиоксонил, б – фенпропиморф, в – прохлораз, г – пендиметалин и д – трифлуксистеробин).....	27
Слика 8. ТИС и MRM хроматограми узорака земљишта голф терена у Београду .....	30

### Преглед схема

Схема 1. Поступак екстракције (поступци I и II) и пречишћавање екстракта земљишта .....	24
---	----

### Преглед графика

График 1. Детекција пестицида у односу на LOQ .....	36
График 2. Присуство појединих пестицида у узорцима (%) .....	37
График 3. Контаминираност узорака (%) .....	37
График 4. Детекција пестицида у односу на LOQ .....	39
График 5 Присуство појединих пестицида у узорцима (%) .....	40
График 6. Контаминираност узорака (%) .....	40